

UNIVERZITET U BEOGRADU - HEMIJSKI FAKULTET



Mirjana D. Mosić

**UPOREDNA ANALIZA POLIFENOLNOG SASTAVA,  
ANTIOKSIDATIVNE I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI  
PČELINJEG POLENA I MEŠAVINA POLENA I MEDA**

- doktorska disertacija -

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE - FACULTY OF CHEMISTRY



Mirjana D. Mosić

**COMPARATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOL  
COMPOSITION, ANTIOXIDATIVE AND  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BEE POLLEN AND BEE  
POLLEN - HONEY MIXTURES**

- Doctoral Dissertation -

Belgrade, 2024.

Mentor:

**dr Dušanka Milojković-Opsenica**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

**dr Jelena Trifković**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

**dr Petar Ristivojević**, docent,  
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

**dr Slaviša Stanković**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane:

U Beogradu, \_\_\_\_\_ 2024.

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija realizovana je na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom dr Dušanke Milojković-Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta u Beogradu.*

*Ovim putem želim da izrazim veliku zahvalnost svojoj mentorki prof. dr Dušanki Milojković-Opsenici na podršci, razumevanju, prenetom znanju i angažovanju u svim fazama, od osmišljavanja do pisanja ove doktorske disertacije.*

*Takođe, neizmerno sam zahvalna prof. dr Jeleni Trifković za nesebičnu pomoć, usmeravanje i iskrene savete tokom celokupnog procesa izrade teze.*

*Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Petru Ristivojeviću na stalnom interesovanju, savetima i nesebičnoj pomoći pri izradi ove disertacije.*

*Takođe koristim priliku da se zahvalim prof. dr Slaviši Stankoviću na stručnoj pomoći i korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske teze.*

*Veliku zahvalnost na pomoći u pojedinim fazama eksperimentalnog rada upućujem mojim dragim kolegama dr Urošu Gašiću, doc. dr Olji Medić, dr Vukosavi Živković-Radovanović, Marku Joviću, Milici Jankov, dr Ivanki Ćirić, Nikoli Horvackom i Katarini Mitreski, kao i svim kolegama iz InovaLaba.*

*Na kraju, od srca HVALA mojoj porodici - suprugu Aleksandru, ćerkama Eleni i Katarini i sinu Nikoli - na bezgraničnom strpljenju i podršci da istrajem. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima.*

# UPOREDNA ANALIZA POLIFENOLNOG SASTAVA, ANTIOKSIDATIVNE I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI PČELINJEG POLENA I MEŠAVINA POLENA I MEDA

Cilj ove disertacije bio je definisanje specifičnog polifenolnog profila, njegovog uticaja na biološku aktivnost i vezu sa biljnim poreklom pčelinjeg polena i mešavina polena sa monofloralnim i polifloralnim medom. Primenom analitičkih tehnika u kombinaciji sa hemometrijskim metodama razvijene su pouzdane analitičke procedure za procenu autentičnosti pčelinjeg polena i preparata na bazi mešavina polena i meda s obzirom da za njih ne postoje definisani parametri kvaliteta.

Primenom sistema ultraefikasne tečne hromatografije (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC) u kombinaciji sa hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije, identifikovano je 27 jedinjenja iz klase glikozilovanih flavonoida, pri čemu je njih osam detektovano po prvi put u pčelinjem polenu. Uporedno spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola u medu, pčelinjem polenu i mešavinama, pokazalo je da pčelinji polen, kao dodatak, značajno poboljšava biološka svojstva meda. Takođe je određena i antibakterijska aktivnost svih uzoraka, difuzionom metodom u bunarićima, u odnosu na tri Gram-pozitivna i pet Gram-negativnih sojeva bakterija.

U okviru ove disertacije je, za procenu autentičnosti ispitivanih uzoraka na osnovu karakterističnih polifenolnih profila, razvijena i po prvi put primenjena metoda visokoefikasne tankoslojne hromatografije (*High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC). U uslovima normalno-fazne HPTLC u kombinaciji sa analizom slike hromatograma i multivarijantnim statističkim metodama, postignuto je grupisanje uzoraka pčelinjeg polena u odnosu na biljno poreklo, dok su uzorci mešavina meda i polena bili grupisani u odnosu na različit sadržaj pčelinjeg polena. Metodom reverzno-fazne HPTLC, po prvi put primenjenom u analizi pčelinjih proizvoda, određen je profil monofloralnog i polifloralnog meda obogaćenog pčelinjim polenom.

**Ključne reči:** pčelinji polen, med, mešavine polena i meda, polifenoli, antioksidativna aktivnost, antibakterijska aktivnost, HPTLC, UPLC, multivarijantna analiza

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Analitička hemija

# **COMPARATIVE ANALYSIS OF POLYPHENOL COMPOSITION, ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BEE POLLEN AND BEE POLLEN - HONEY MIXTURES**

The aim of this dissertation was to define the specific polyphenolic profile, its influence on biological activity and the connection with the plant origin of bee pollen and pollen mixtures with monofloral and polyfloral honey. By applying analytical techniques in combination with chemometric methods, reliable analytical procedures were developed for assessing the authenticity of bee pollen and preparations based on bee pollen-honey mixtures, given that there are no defined quality parameters for them.

Using an Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) system in combination with a high-resolution hybrid mass spectrometer, 27 compounds from the class of glycosylated flavonoids were identified, eight of which were detected for the first time in bee pollen. Comparative spectrophotometric determination of antioxidant activity and total phenolic content in honey, bee pollen and mixtures showed that bee pollen, as an additive, significantly improves the biological properties of honey. The antibacterial activity of all samples was also determined, using the well diffusion method, in relation to three Gram-positive and five Gram-negative bacterial strains.

As part of this dissertation, for the assessment of the authenticity of the tested samples based on characteristic polyphenolic profiles, the High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) method was developed and applied for the first time. Under the conditions of normal-phase HPTLC combined with chromatogram image analysis and multivariate analysis methods, grouping of bee-pollen samples in relation to plant origin was achieved, while samples of honey and pollen mixtures were grouped in relation to different content of bee pollen. The reversed-phase HPTLC method, applied for the first time in the analysis of bee products, was used to profile monofloral and polyfloral honey enriched with bee-pollen.

**Keywords:** bee-pollen, honey, polyphenols, bee pollen-honey mixtures, antioxidant activity, antimicrobial activity, HPTLC, UPLC, multivariate analysis

**Scientific area:** Chemistry

**Field of Academic Expertise:** Analytical Chemistry

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. OPŠTI DEO</b> .....   | <b>3</b>  |
| 2.1 Pčelinji polen.....   | 3         |
| 2.1.1 Proces nastajanja, prikupljanja i skladištenja pčelinjeg polena.....                                | 3         |
| 2.1.2 Hemijski sastav i nutritivna svojstva pčelinjeg polena.....   | 6         |
| 2.1.3 Bioaktivni potencijal pčelinjeg polena .....  | 9         |
| 2.1.3.1 Oksidativni stres i antioksidativna zaštita.....  | 9         |
| 2.1.4 Polifenolna jedinjenja pčelinjeg polena - poreklo, struktura i biološko dejstvo.....                | 10        |
| 2.1.4.1 Fenolne kiseline i uticaj njihove strukture na antioksidativnu aktivnost.....                     | 10        |
| 2.1.4.2 Flavonoidi i uticaj njihove strukture na antioksidativnu aktivnost.....                           | 12        |
| 2.1.4.3 Uticaj polifenola na antimikrobnu aktivnost pčelinjeg polena .....                                | 15        |
| 2.1.5 Pčelinji polen kao dodatak namirnicama .....  | 16        |
| 2.2 Mešavine pčelinjeg polena i meda .....  | 17        |
| 2.3 Metode ispitivanja .....  | 18        |
| 2.3.1 Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja .....   | 19        |
| 2.3.2 Prečišćavanje i koncentrovanje ekstrakta primenom čvrsto-tečne ekstrakcije.....                     | 19        |
| 2.3.3 Spektrofotometrijske metode.....  | 20        |
| 2.3.3.1 Određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja ( <i>Total Phenolic Content</i> , TPC) ..... | 20        |
| 2.3.3.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti ( <i>Radical Scavenging Activity</i> , RSA).....           | 21        |
| 2.3.4 Metode za testiranje antimikrobne aktivnosti.....   | 22        |
| 2.3.4.1 Difuziona metoda.....   | 22        |
| 2.3.4.2 Mikrodiluciona metoda.....  | 22        |
| 2.3.5 Metode tečne hromatografije.....  | 22        |
| 2.3.5.1 Ultraefikasna tečna hromatografija.....   | 22        |
| 2.3.5.2 Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) .....   | 26        |
| 2.3.6 Priprema slike hromatograma za statističku analizu .....  | 28        |
| 2.3.7 Obrada rezultata primenom statističkih metoda .....   | 29        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....   | <b>31</b> |
| 3.1 Reagensi i standardi.....   | 31        |
| 3.2 Uzorci pčelinjeg polena i meda .....  | 31        |
| 3.2.1 Priprema mešavina pčelinjeg polena i meda .....   | 31        |
| 3.2.2 Palinološka analiza uzoraka pčelinjeg polena .....  | 32        |
| 3.2.3 Određivanje fizičko-hemijskih parametara uzoraka meda .....   | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3 Priprava ekstrakata .....  | 36        |
| 3.3.1 Ekstrakti za mikrobiološku analizu .....   | 36        |
| 3.3.2 Ekstrakti za UHPLC-MS, HPTLC i spektrofotometrijske testove .....  | 36        |
| 3.3.2.1 Priprava smeše standardnih rastvora polifenolnih jedinjenja .....  | 36        |
| 3.4 Spektrofotometrijske metode .....  | 37        |
| 3.4.1 Određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja ekstrakata pčelinjeg polena, meda i smeša pčelinjeg polena i meda .....   | 37        |
| 3.4.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata pčelinjeg polena, meda i smeša pčelinjeg polena i meda .....                 | 37        |
| 3.5 UHPLC-LTQ Orbitrap MS .....  | 37        |
| 3.6 HPTLC metode.....  | 38        |
| 3.6.1 Određivanje polifenolnog profila uzoraka pčelinjeg polena primenom HPTLC metode..  | 38        |
| 3.6.2 Određivanje polifenolnog profila ekstrakata pčelinjeg polena, meda i smeša pčelinjeg polena i meda primenom HPTLC metode ..... | 39        |
| 3.6.3 Obrada slike hromatograma i statistička obrada podataka .....  | 40        |
| 3.7 Testiranje antimikrobne aktivnosti ekstrakata pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda .....                              | 40        |
| 3.7.1 Ispitivani sojevi bakterija.....   | 40        |
| 3.7.2 Medijumi za gajenje bakterija i uslovi rasta .....   | 41        |
| 3.7.3 Testiranje antibakterijske aktivnosti uzoraka difuzionom metodom.....  | 41        |
| 3.7.4 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).....   | 41        |
| <b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>  | <b>42</b> |
| 4.1 Analiza uzoraka pčelinjeg polena.....  | 42        |
| 4.1.1 Biljno poreklo uzoraka pčelinjeg polena .....  | 42        |
| 4.1.2 HPTLC polifenolni profil uzoraka pčelinjeg polena .....  | 43        |
| 4.1.3 Identifikacija flavonoidnih glikozida UHPLC–LTQ Orbitrap MS metodom .....  | 49        |
| 4.1.4 Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost uzoraka pčelinjeg polena.....                               | 60        |
| 4.2 Uporedna analiza pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda .....   | 63        |
| 4.2.1 Autentičnost uzoraka meda.....   | 63        |
| 4.2.2 Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti meda obogaćenog pčelinjim polenom .....                    | 65        |
| 4.2.3 Polifenolni profil meda obogaćenog pčelinjim polenom.....  | 72        |
| 4.2.3.1 Preliminarna HPTLC analiza ekstrakata meda, pčelinjeg polena i mešavina polena i meda .....                                  | 72        |
| 4.2.3.2 Primena NP HPTLC metode za analizu polifenolnog profila mešavina polena i meda .....   | 73        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.3.3 Razvoj i primena RP HPTLC metode za analizu polifenolnog profila mešavina polena i meda ..... | 73        |
| 4.2.3.4 Uporedna analiza rezultata NP i RP HPTLC metode .....   | 74        |
| 4.2.4 Hemometrijska evaluacija HPTLC podataka .....   | 75        |
| 4.2.5 Antimikrobna aktivnost pčelinjeg polena, meda i mešavina pčelinjeg polena i meda .....          | 78        |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>83</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>86</b> |
| <b>7. PRILOG .....</b>  | <b>97</b> |

## 1. UVOD

U današnje vreme raste svest ljudi o benefitima prirodne funkcionalne hrane, bogate ne samo esencijalnim nutrijentima već i biološki aktivnim jedinjenjima koja ispoljavaju terapeutska dejstva i shodno tome, pozitivno utiču na ljudsko zdravlje. Pčelinji proizvodi se, zahvaljujući svojim karakteristikama, mogu svrstati u funkcionalnu hranu, a njihovi blagotvorni efekti na ljudsko zdravlje su od davnina poznati čoveku (Weis et al. 2022). Med je nesumnjivo najpoznatiji pčelinji proizvod. Međutim, osim meda, postoji još nekoliko pčelinjih proizvoda koji se primenjuju u ljudskoj ishrani, a to su: pčelinji polen, propolis, perga (pčelinji hleb) i matični mleč. Dosadašnja naučna istraživanja govore u prilog činjenici da ishrana bogata pčelinjim proizvodima smanjuje rizik od nastanka mnogih bolesti kao što su infektivne, kancerske, kardiovaskularne, neurodegenerativne i druge, a takođe i pomaže u lečenju istih (El-Seedi et al. 2020; Iftikhar et al. 2022; Algethami et al. 2022). Poslednjih godina beleži se trend rasta plasmana na tržište različitih mešavina pčelinjih proizvoda, s ciljem da se potrošačima ponudi finalni proizvod poboljšanih karakteristika.

Iako potcenjen u odnosu na med, pčelinji polen postaje sve popularniji među potrošačima zbog visoke nutritivne vrednosti i višestruke biološke aktivnosti. Biološki efekti pčelinjeg polena u velikoj meri su uslovljeni prisustvom polifenolnih jedinjenja koja predstavljaju moćne prirodne antioksidanse. Polifenolna jedinjenja pružaju zaštitu vitalnih komponenata ćelije od oksidativnog oštećenja, neutralisanjem slobodnih radikala, utičući na taj način na prevenciju razvoja različitih fizioloških poremećaja (Manach et al. 2004). Rezultati dosadašnjih istraživanja sprovedenih u cilju karakterizacije pčelinjeg polena različitog biljnog porekla iz različitih zemalja i regiona poput Kine, Brazila, Rumunije, Španije, Južne Afrike, Saudijske Arabije i drugih, ukazuju na izraženu varijabilnost složenog polifenolnog sastava ovog proizvoda, uslovljenu njegovim biljnim i geografskim poreklom, kao i brojnim spoljašnjim faktorima u koje spadaju sastav zemljišta, klimatski uslovi i slično (Thakur and Nanda 2020). S obzirom na izraženu varijabilnost, nove informacije o polifenolnom profilu i biološkoj aktivnosti pčelinjeg polena neophodne su za doprinos uspostavljanju standarda kvaliteta ovog proizvoda, kao i za pospešivanje kliničkih studija kojima bi bila potkrepljena njegova lekovita svojstva. S tim u vezi, istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom usmerena su na optimizaciju postojećih i razvoj i primenu novih metoda analize polifenolnog sastava, kao važnog parametra kvaliteta, uzoraka pčelinjeg polena a takođe i mešavina pripremljenih dodavanjem pčelinjeg polena u med. S obzirom da su mešavine pčelinjeg polena i meda prisutne na tržištu i da za njih ne postoje definisani parametri kvaliteta, deo istraživanja je usmeren na razvoj brze metode analize za određivanje profila meda obogaćenog pčelinjim polenom. Testiranje antioksidativne i antimikrobne aktivnosti uzoraka planirano je s ciljem da omogući procenu uticaja polifenolne frakcije na određeno biološko dejstvo. Ovaj rad je takođe imao za cilj i potencijalno proširenje spektra sojeva bakterija osetljivih na pčelinji polen i iz tog razloga je planirano testiranje određenih sojeva za koje u literaturi nema podataka o njihovoj osetljivosti na uzorke pčelinjeg polena.

Deo ove disertacije predstavlja nastavak dosadašnjeg istraživanja pčelinjeg polena iz Srbije u kojem je bilo identifikovano nekoliko fenolnih kiselina i flavonoida (aglikona), s ciljem dodatne karakterizacije složenog polifenolnog profila, koja podrazumeva identifikaciju glikozilovanih flavonoida kao oblika u kojem se najčešće javljaju (Kostić 2015; Xiao 2015). Uprkos dokazanoj raznovrsnoj biološkoj aktivnosti glikozilovanih flavonoida, postoji potreba za više informacija jer je samo nekoliko pripadnika ove klase jedinjenja odobreno za kliničku primenu. S obzirom da je vrstom glikozilovanja uslovljeno biološko dejstvo, i da glikozidni deo igra važnu ulogu u apsorpciji glikozilovanih flavonoida, sve nove informacije o složenoj strukturi ovih jedinjenja su od velikog značaja (Xiao 2015; Shah et al. 2013). U cilju identifikacije flavonoidnih glikozida u analiziranim uzorcima pčelinjeg polena primenjena je ultra-efikasna tečna hromatografija (*Ultra- Performance*

---

*Liquid Chromatography, UPLC*) spregnuta sa Orbitrap masenom spektrometrijom (UPLC-LTQ Orbitrap MS). Ova savremena analitička tehnika je pogodna za pomenuta ispitivanja jer, u određenim slučajevima, nudi mogućnost razjašnjavanja složenih struktura molekula na osnovu njihovih hromatografskih i spektralnih karakteristika, bez korišćenja odgovarajućih standardnih jedinjenja.

Deo istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije usmeren je na procenu autentičnosti pčelinjeg polena u pogledu njegovog biljnog porekla. Biljno poreklo pčelinjeg polena utvrđuje se široko rasprostranjenom palinološkom analizom čiji su glavni nedostaci potreba za ekspertima iz oblasti morfologije polena i sveobuhvatnom kolekcijom različitih polenovih zrna. Pored toga, ova metoda ne daje informacije o kvalitetu polena u smislu njegove biološke aktivnosti, koja zavisi, pre svega, od polifenolnog sastava, a time ni o njegovoj komercijalnoj vrednosti. Za potrebe ove disertacije je, po prvi put, planirana optimizacija uslova za primenu normalno-fazne (NP) visokoefikasne tankoslojne hromatografije (HPTLC) u cilju procene autentičnosti analiziranih uzoraka pčelinjeg polena u pogledu biljnog porekla na osnovu polifenolnog profila. Prednosti HPTLC su takođe iskorišćene za razvoj brze i efikasne metode za određivanje profila meda obogaćenog pčelinjim polenom, s akcentom na uticaj različitog udela pčelinjeg polena na fenolni profil monofloralnog i polifloralnog meda. U te svrhe planirana je optimizacija uslova NP HPTLC za analizu složenih smeša polifenolnih jedinjenja sadržanih u mešavinama ova dva pčelinja proizvoda.

Iako se za analizu polifenolnih jedinjenja hromatografijom na koloni standardno primenjuje reverzno-fazna hromatografija, ne postoje izveštaji o primeni reverzno-fazne HPTLC za analizu polifenolnih jedinjenja iz pčelinjih proizvoda. U okviru ove disertacije je, po prvi put planiran razvoj i primena RP HPTLC metode za određivanje polifenolnih profila pčelinjeg polena i mešavina polena i meda. Ova metoda je i ekološki prihvatljivija, s obzirom da organski rastvarači, poput dihlormetana i *n*-heksana, kao komponente mobilne faze, bivaju zamenjeni etanolom.

Još jedna dodatna pogodnost za primenu HPTLC metode za analizu složenih prirodnih proizvoda jeste mogućnost "ekstrahovanja" informacija iz hromatograma analizom slike. Dalja obrada podataka, dobijenih na ovaj način, vrši se multivarijantnim statističkim metodama analize što potencijalno omogućuje procenu parametara kvaliteta koji utiču na biološka svojstva ispitivanih uzoraka i provere njihove usklađenosti sa specifikacijom kvaliteta, ili definisanje novih parametara za uspostavljanje standarda kvaliteta, s obzirom na sve veću prisutnost pčelinjih proizvoda na tržištu. Krajnji cilj procene veze između polifenolnog profila i bioloških svojstava ispitivanih uzoraka jeste predlaganje modela koji bi doprineli razvoju pouzdane analitičke procedure za procenu autentičnosti pčelinjeg polena i preparata dobijenih mešanjem pčelinjeg polena i meda, koji nalaze sve veću primenu u apiterapiji kao oblasti komplementarne medicine.

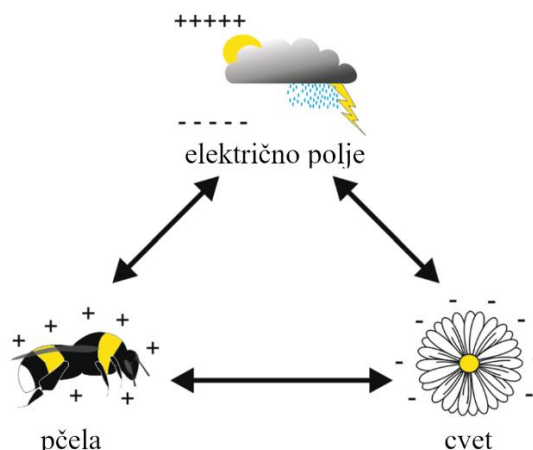
## **2. OPŠTI DEO**

### **2.1 Pčelinji polen**

#### **2.1.1 Proces nastajanja, prikupljanja i skladištenja pčelinjeg polena**

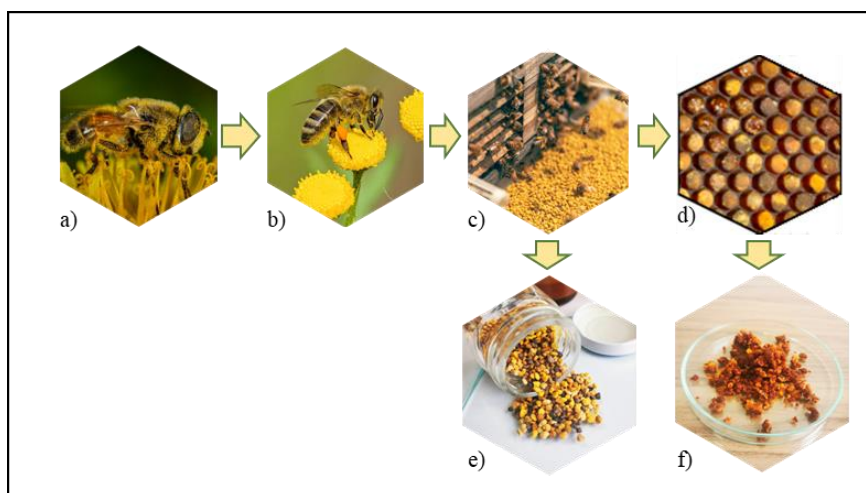
Polen medonosnih biljaka predstavlja osnovnu sirovinu koju pčele svojom aktivnošću transformišu u prirodni proizvod poznat pod nazivom pčelinji polen. Nakon sazrevanja i pucanja cvetnih prašnika dolazi do oslobađanja finog praha sastavljenog od nekoliko hiljada polenovih zrna različitih boja i oblika u zavisnosti od biljne vrste sa koje potiču. Polenova zrna se po veličini, koja je određena dužinom najduže ose, svrstavaju u jednu od šest klasa. Ova dužina kod veoma malih polenovih zrna iznosi  $<10 \mu\text{m}$ , dok za najveća polenova zrna, tzv. gigantska, dostiže vrednost i preko  $200 \mu\text{m}$ . Polenova zrna su muške reproduktivne ćelije, odnosno nosioci najboljih genetskih osobina jedne porodice biljaka. Karakteristična struktura polenovih zrna proizilazi iz potrebe za njihovim prenošenjem u procesu oprašivanja biljaka. Genetski materijal, sadržan u centralnoj živoj ćeliji, obavijen je dvoslojnim ćelijskim zidom koji ga štiti od bakterija i drugih negativnih faktora spoljašnje sredine (temperatura, promene pH vrednosti, ultraljubičasto zračenje). Unutrašnji deo ćelijskog zida ravnomerno obavlja čitavo polenovo zrno i naziva se intina. Hemijsku strukturu intine čine pektin i celuloza. Spoljašnji omotač, nazvan egzina, sastavljen je od hemijski inertnog biopolimera sporopolenina koji mu daje izuzetnu čvrstinu. Ornamentacija egzine specifična je za datu biljnu vrstu. Još jedna njena važna karakteristika je postojanje tzv. apertura (nedostajućih ili istanjenih delova egzine kroz koje klija polenova cev) čime je olakšan prolaz supstanci iz unutrašnjosti polenovog zrna u spoljašnju sredinu (Mačukanović-Jocić 2010).

Kroz istoriju se između pčele i cveta, kao primer složene koevolucione adaptacije, razvio odnos zasnovan na međusobnoj saradnji s ciljem da se zadovolje interesi obe strane. Proces oprašivanja je jako važan za biljke dok, s druge strane, polen i nektar medonosnih biljaka predstavljaju izvor hrane pčelama. Za prikupljanje i odnošenje polena u košnicu zadužene su pčele izletnice koje spadaju u grupu pčela letačica. Pčele se, prilikom pronalaženja izvora hrane, oslanjaju na čulo mirisa, vida, dodira i osećaja vlage (Nicholls and Hempel de Ibarra 2017). Nedavno je otkriven još jedan senzorni modalitet koji pčele koriste u date svrhe a to je, detekcija slabog elektrostatičkog polja koje nastaje između njih i cveta. Stavljajući u fokus proces prikupljanja i prenošenja polena od strane pčela, uočavaju se tri komponente zaslužne za nastanak elektrostatičke interakcije koja se uspostavlja između pčele i cveta a to su: atmosfersko električno polje, sposobnost pčela da kretanjem akumuliraju pozitivno naelektrisanje i sklonost biljaka da budu relativno negativno naelektrisane (Slika 1). Prilikom približavanja pčele cvetu jačaju elektrostatičke sile između njih. Formira se električno polje uticajnije od gravitacije, čime je omogućeno da se, pod dejstvom električnih sila, polen prenese sa prašnika na telo pčele (Slika 2 a) (D. Clarke, Morley, and Robert 2017).



**Slika 1.** Uzajamne interakcije pčele, cveta i atmosferskog električnog polja (D. Clarke, Morley, and Robert 2017).

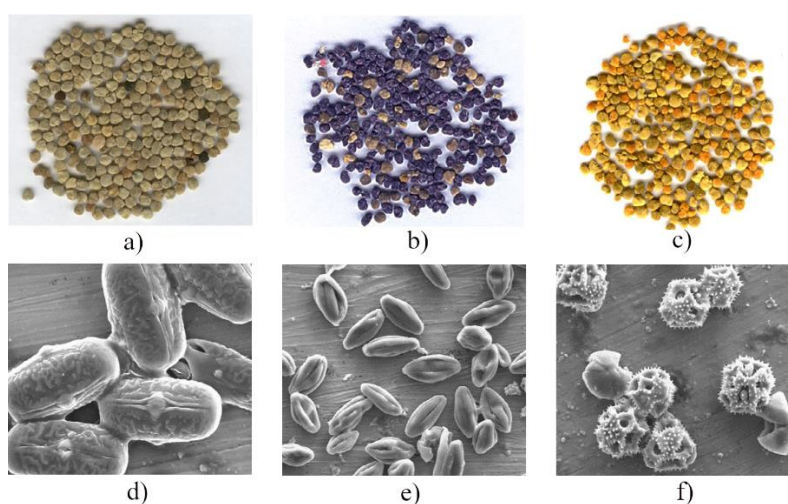
Kako bi polenov prah prenela do košnice, pčela ga najpre, pomoću četkica za prikupljanje polena, pozicioniranim na stopalima prednjih ekstremiteta, skida sa tela. Pritom ga natapa nektarom i sekretom pljuvačnih žlezda i oblikuje u granule koje zatim smešta u udubljena na spoljnoj strani zadnjih ekstremiteta, tzv. polenove korpice (*corbiculae*) (Slika 2 b). Ovako formirane granule se nazivaju pčelinjim polenom. Nakon odnošenja u košnicu, pčela skida granule iz polenovih korpica pomoću mamuzastih izraštaja na prednjim ekstremitetima, odlaže ih u ćelije saća i nakon toga zalije medom i voskom. Na taj način se stvaraju uslovi pod kojima se odvija mlečno-kiselinska fermentacija, što za posledicu ima konzerviranje pčelinjeg polena tj. nastajanje pčelinjeg hleba (perge), osnovnog izvora hranljivih supstanci za koloniju, čime je obezbeđen njen opstanak i razvoj (Slika 2) (Mačukanović-Jocić 2010).



**Slika 2.** Proces transformacije polena (cvetnog praha) u pčelinji polen i pergu (pčelinji hleb): a) oblikovanje granule pčelinjeg polena od strane pčele; b) prikupljanje pčelinjeg polena pomoću hvatača na ulazu u košnicu; c) pčelinji polen; d) sazrevanje pčelinjeg polena u saću; e) perga (pčelinji hleb)

Granule pčelinjeg polena se međusobno mogu razlikovati po boji, veličini i morfologiji, što odražava raznolikost biljnih vrsta dostupnih pčelama (Slika 3). Granula se obično sastoji od polena sakupljenog sa jedne vrste cvetova a ređe od malog broja različitih vrsta (M. G. R. Campos et al. 2008). Njena prosečna težina iznosi 7,5 mg - 8 mg i varira u zavisnosti od dostupnosti polena tokom prikupljanja. Efikasnost pakovanja cvetnog praha je određena oblikom i veličinom polenovih zrna tipičnih za određenu biljnu vrstu. Prikupljanjem polena anemofilnih biljaka (biljke prilagođene oprašivanju vetrom) koji je lagan i suv, pčele oblikuju krupnije, rastresitije granule, dok od cvetnog praha entomofilnih biljaka (biljke koje oprašuju insekti) formiraju manje i kompaktnije granule pčelinjeg polena.

U pojedinim uzorcima pčelinjeg polena detektovano je i prisustvo spora gljiva jer se povremeno dešava da ih pčele, zajedno sa cvetnim prahom, pokupe sa plesnivih biljaka. Kada je u pitanju boja granula pčelinjeg polena, uočeno je prisustvo gotovo svih nijansi žute, narandžaste, crvene, zelene, ljubičaste i smeđe boje. Oblik granula može biti: zvonast, cilindričan, trnovit ili trouglast (Komosinska-Vassev et al. 2015; Kieliszek et al. 2018).



**Slika 3.** Granule pčelinjeg polena različitih boja i mikroskopski prikaz različitih struktura egzine polenovih zrna: a) sive granule pčelinjeg polena biljne vrste *Vicia faba*, b) plavo-ljubičaste granule pčelinjeg polena biljne vrste *Phacelia tanacetifolia*, c) mešavina žutih granula pčelinjeg polena voćnih vrsta (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*) i svetlo-narandžaste granule vrste *Taraxacum officinale*, d) mikroskopski prikaz polenovih zrna vrste *Vicia faba*, e) mikroskopski prikaz polenovih zrna vrste *Phacelia tanacetifolia*, f) mikroskopski prikaz polenovih zrna vrste *Taraxacum officinale*. Preuzeto i adaptirano iz (M. G. Campos et al. 2021)

U cilju prikupljanja komercijalnih količina pčelinjeg polena, za potrebe primene ovog proizvoda u ljudskoj ishrani, konstruisani su tzv. hvatači pčelinjeg polena koji se montiraju na ulazu u košnicu (Slika 4). Vremenom su razvijeni različiti dizajni hvatača zasnovani na konceptu struganja granula pčelinjeg polena sa nogu pčela prilikom njihovog ulaska u košnicu. Nakon prolaska pčela kroz rešetkasti deo hvatača, granule polena padaju u posebnu fioku smeštenu u dnu košnice, odakle

se svakodnevno sakupljaju i tretiraju dalje, kako bi se maksimalno očuvao kvalitet proizvoda za plasman na tržište. Ova metoda prikupljanja pčelinjeg polena svoju širu primenu našla je krajem XIX veka i od tada je primetna povećana prisutnost ovog pčelinjeg proizvoda u ljudskoj ishrani (Bogdanov 2012; Mačukanović-Jocić 2010). Procenjuje se da pčelinje društvo može da prikupi od 50 g do 250 g pčelinjeg polena dnevno, dok na godišnjem nivou ta količina iznosi od 15 kg do 40 kg (Komosinska-Vassev et al. 2015; Carlos Zuluaga, Juan Carlos Serrato, and Marta Quicazan 2015).



**Slika 4 .** Različiti tipovi hvatača pčelinjeg polena

Kondicioniranje svežeg pčelinjeg polena i njegovo adekvatno skladištenje od presudne su važnosti za očuvanje nutritivne i funkcionalne vrednosti, s obzirom da se bioaktivni potencijal ovog proizvoda vremenom smanjuje (G. Conte et al. 2017). Svež pčelinji polen, zbog visokog prosečnog nivoa vlage koji je u opsegu od 20% do 30%, predstavlja sredinu pogodnu za razvoj mikroorganizama i pojavu nepoželjnih fermentacija koje uzrokuju njegovo propadanje. Kako bi se obezbedio optimalan nivo vlage primenjuju se različite tehnike sušenja pčelinjeg polena, kao što su: sušenje u struji toplog vazduha (do 40 °C), sušenje u vakuum sušarama, mikrotalasno sušenje i sušenje zamrzavanjem (liofilizacija). Poželjno je nivo vlage nakon sušenja držati u opsegu od 5% do 9% da bi proizvod mogao bezbedno da se koristi za potrebe ljudske ishrane. Osušeni pčelinji polen se dalje pakuje i nakon toga, po potrebi, koristi u granulisanom obliku ili samleven. Za očuvanje ukupnog polifenolnog sadržaja i antioksidativne aktivnosti pčelinjeg polena, liofilizacija se izdvojila kao najpogodnija metoda konzervisanja. Još jedan način konzervisanja koji se primenjuje u pčelarskoj praksi jeste i mešanje pčelinjeg polena sa medom (Kostić et al. 2020).

### **2.1.2 Hemijski sastav i nutritivna svojstva pčelinjeg polena**

Pčelinji polen je jedinstven prirodni proizvod koji sadrži supstance neophodne da se zadovolje sve nutritivne potrebe čoveka. Ugljeni hidrati, lipidi i proteini su tzv. makronutrijenti odnosno hranljive supstance koje obezbeđuju energiju u vidu kalorija. Drugu grupu hranljivih supstanci čine mikronutrijenti, vitamini i minerali, koji ne isporučuju kalorije ali su neophodni za funkcionisanje ljudskog organizma. Sadržaj hranljivih supstanci u pčelinjem polenu varira u zavisnosti od: geografskog porekla, biljnih vrsta sa kojih potiče, sezone prikupljanja, tipa zemljišta i klimatskih uslova (Giampieri et al. 2022).

Ugljeni hidrati su važne hranljive komponente sa najvećim udelom u pčelinjem polenu. Zastupljeni su u opsegu od 18,5% do 82,8% i potiču iz nektara i meda dodatog od strane pčela prilikom formiranja granula. Stoga, biljno i geografsko poreklo, kao i klimatski uslovi, jako utiču na sadržaj šećera pčelinjeg polena (Thakur and Nanda 2020). Prosečan sadržaj ugljenih hidrata u

uzorcima pčelinjeg polena iz Srbije, utvrđen od strane Kostića i saradnika, iznosio je  $75,51 \pm 4,25$  g/100 g, sa opsegom 64,2 g/100 g – 81,84 g/100 g (Kostić, Barać, et al. 2015). Najzastupljeniji ugljeni hidrati su monosaharidi sa prosečnim udelom od približno 94%. Pčelinji polen, za razliku od cvetnog polena, karakteriše visok sadržaj redukujućih šećera (Carpes 2009). Fruktaza i glukoza su najzastupljeniji monosaharidi, dok su od disaharida u najvećoj količini prisutni saharoza i maltoza. Polisaharidi celuloza i pektin, takođe prisutni u pčelinjem polenu, predstavljaju sastavne komponente dvoslojnog omotača polenovih zrna (egzina i intina). Ove supstance ne poseduju nutritivnu vrednost već imaju zaštitnu ulogu (Kieliszek et al. 2018).

Proteini, čiji prosečan udeo iznosi 10% do 40% u odnosu na suvi ostatak, su sledeći po zastupljenosti u pčelinjem polenu. Na sadržaj proteina u pčelinjem polenu utiče njegovo biljno poreklo, ali su takođe utvrđene i varijacije između polena istih biljnih vrsta sa različitih geografskih područja (Thakur and Nanda 2020). Prosečan sadržaj proteina u analiziranim uzorcima pčelinjeg polena iz Srbije iznosio je  $19,44 \pm 3,04$  g/100 g ( $14,81$  g/100 g –  $27,25$  g/100 g) (Kostić, Barać, et al. 2015). Visokoj hranljivoj vrednosti pčelinjeg polena doprinosi i prisustvo svih dvadeset esencijalnih i neesencijalnih amino-kiselina, pri čemu udeo esencijalnih amino-kiselina iznosi 12% do 45,02% ukupnog aminokiselinskog sadržaja (De-Melo and de Almeida-Muradian 2017). Sadržaj određenih amino-kiselina takođe može biti indikator svežine i adekvatnog sušenja i skladištenja pčelinjeg polena. S obzirom na činjenicu da biljno poreklo pčelinjeg polena utiče na aminokiselinski profil, pre svega u kvantitativnom smislu, neke od njih su predložene za markere biljnog i geografskog porekla ovog proizvoda. Prema dosadašnjim istraživanjima, u najzastupljenije amino-kiseline pčelinjeg polena spadaju glutaminska kiselina, prolin i asparaginska kiselina, dok je sadržaj leucina, lizina, treonina, histidina, tirozina i posebno triptofana, takođe značajan (Thakur and Nanda 2020; De-Melo and de Almeida-Muradian 2017).

Lipidi predstavljaju još jednu važnu nutritivnu komponentu pčelinjeg polena. Njihov prosečan udeo, prema dosadašnjim istraživanjima, iznosi 1% - 24% ukupnog suvog ostatka (Giampieri et al. 2022). U pčelinjem polenu su zastupljene različite klase lipida uključujući fosfolipide, sfingolipide, diacilglicerole i triacilglicerole. Takođe je utvrđeno prisustvo velikog broja masnih kiselina različitih dužina ugljeničnih nizova (od C4 do C20). Na sadržaj i raznolikost lipida pčelinjeg polena utiče njegovo biljno poreklo (Q. Li et al. 2017). Prosečan udeo lipidne frakcije u uzorcima pčelinjeg polena prikupljenog na teritoriji Srbije iznosio je  $2,66 \pm 1,23$  g/100 g, sa opsegom koji je obuhvatao vrednosti između 1,31 g/100 g i 6,78 g/100 g (Kostić, Barać, et al. 2015). Za zadovoljenje nutritivnih potreba čoveka posebno su važne nezasićene tj. esencijalne masne kiseline, od kojih  $\omega$ -3 masne kiseline čine od 8,07% do 44,1% ukupnih lipida, dok sadržaj  $\omega$ -6 masnih kiselina iznosi od 1,77% do 38,25% ukupnih lipida pčelinjeg polena. Među nezasićenim masnim kiselinama najzastupljenije su  $\alpha$ -linoleinska kiselina,  $\gamma$ -linoleinska kiselina i oleinska kiselina, dok se od zasićenih masnih kiselina palmitinska i miristinska prisutane u najvećoj količini (Giampieri et al. 2022).

Pored navedenih makronutrijenata (proteini, ugljeni hidrati i lipidi) koji predstavljaju osnovni izvor energije, pčelinji polen je takođe važan izvor mikronutrijenata: bioelemenata i vitamina. Ove supstance, prisutne u znatno manjim količinama, neophodne su za nesmetano odvijanje metaboličkih procesa u organizmu.

U pčelinjem polenu su prisutne obe grupe vitamina: liposolubilni i hidrosolubilni vitamini (Aylanc et al. 2021). Na osnovu dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da prosečan udeo liposolubilnih vitamina u pčelinjem polenu iznosi 0,1% (Giampieri et al. 2022). Najzastupljeniji među njima su vitamini A, D, E i vitamin K. Vitamin C i vitamini B grupe su najznačajniji predstavnici u vodi rastvornih vitamina i njihov prosečan sadržaj u pčelinjem polenu iznosi 0,3% (Giampieri et al. 2022).

Na mineralni sastav pčelinjeg polena utiče nekoliko faktora među kojima su njegovo biljno i geografsko poreklo, klima i sastav zemljišta (Kostić, Pešić, et al. 2015; Liolios et al. 2019). Na osnovu

---

dosadašnjih analiza mineralnog sastava brojnih uzoraka pčelinjeg polena širom sveta, potvrđeno je prisustvo više od 25 bioeleminata. Kalijum, kalcijum, fosfor, magnezijum i natrijum su makroelementi detektovani u pčelinjem polenu, dok među mikroelementima dominiraju cink, gvožđe, mangan, bakar i selen (Giampieri et al. 2022). Analizom mineralnog sastava pčelinjeg polena različitog biljnog porekla prikupljenog na teritoriji Srbije, po prvi put je utvrđeno prisustvo stroncijuma u ovom pčelinjem proizvodu (Kostić, Pešić, et al. 2015). Rezultati brojnih istraživanja takođe sugerišu da se mineralni sastav može koristiti kao biomarker biljnog i geografskog porekla pčelinjeg polena, što je veoma značajno s aspekta sprečavanja prevara u pčelarskoj industriji, odnosno falsifikovanja pčelinjeg polena nedeklarisanog porekla. Pored toga, mineralni sastav, a pre svega sadržaj teških metala u pčelinjem polenu, može predstavljati indikator stepena zagađenosti životne sredine (Valverde et al. 2023).

Na osnovu prosečnog sadržaja hranljivih supstanci pčelinji polen se svrstava u prirodni proizvod visoke nutritivne vrednosti (Tabela 1). Deluje kao crevni regulator koji pospešuje procese varenja i apsorpcije hranljivih supstanci. Pčelinji polen doprinosi povećanju fizičke spremnosti organizma u slučaju prekomernog fizičkog napora a takođe utiče i na poboljšanje moždanih funkcija. Primenjuje se, između ostalog, kod nedostatka apetita, odloženog razvoja i neuhranjenosti kod dece i odraslih. Prema tvrdnjama pojedinih nutricionista „ljudi zapravo mogu da žive jedući samo pčelinji polen” (Nogueira et al. 2012).

**Tabela 1.** Hemijski sastav pčelinjeg polena i preporučeni dnevni unos (Thakur and Nanda 2020)

| Hranjive supstance                                    | Količina (%)             | Prosečan RDI       | % RDI u 50 g pčelinjeg polena |
|---|--------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Ugljeni hidrati (fruktoza, glukoza, saharoza, vlakna) | 13,55                    | 320 <sup>b</sup>   | 3,33 – 15,34                  |
| Sirova vlakna   | 0,3 – 20                 | 30 <sup>b</sup>    | 1,00 – 60,03                  |
| Proteini  | 10 – 40                  | 50 <sup>b</sup>    | 18,01 – 73,37                 |
| Masti   | 1 – 13                   | 80 <sup>b</sup>    | 0,33 – 13,34                  |
| Kalijum   | 400 – 2000 <sup>a</sup>  | 2000 <sup>c</sup>  | 16,68 – 90,04                 |
| Fosfor  | 80 – 600 <sup>a</sup>    | 1000 <sup>c</sup>  | 6,67 – 53,36                  |
| Kalcijum  | 20 – 300 <sup>a</sup>    | 1100 <sup>c</sup>  | 1,67 – 23,34                  |
| Magnezijum  | 20 – 300 <sup>a</sup>    | 350 <sup>c</sup>   | 6,67 – 76,71                  |
| Cink  | 3 – 25 <sup>a</sup>      | 8,5 <sup>c</sup>   | 33,35 – 263,46                |
| Mangan  | 2 – 11 <sup>a</sup>      | 3,5 <sup>c</sup>   | 50,02 – 283,47                |
| Gvožđe  | 1,1 – 17 <sup>a</sup>    | 12,5 <sup>c</sup>  | 6,67 – 123,39                 |
| Bakar   | 0,2 – 1,6 <sup>a</sup>   | 1,2 <sup>c</sup>   | 13,34 – 120,06                |
| $\beta$ - karoten                                     | 1 – 20 <sup>a</sup>      | 0,9 <sup>c</sup>   | 100,05 – 2001                 |
| Tokoferol   | 4 – 32 <sup>a</sup>      | 13 <sup>c</sup>    | 26,68 – 220,11                |
| Niacin  | 4 – 11 <sup>a</sup>      | 15 <sup>c</sup>    | 23,34 – 66,70                 |
| Piridoksin  | 0,2 – 0,7 <sup>a</sup>   | 1,4 <sup>c</sup>   | 13,34 – 43,35                 |
| Tiamin  | 0,6 – 1,3 <sup>a</sup>   | 1,1 <sup>c</sup>   | 50,03 – 106,72                |
| Riboflavin  | 0,6 – 2 <sup>a</sup>     | 1,3 <sup>c</sup>   | 40,02 – 140,07                |
| Pantotenska kiselina                                  | 0,5 – 2 <sup>a</sup>     | 6 <sup>c</sup>     | 6,67 – 30,02                  |
| Folna kiselina  | 0,3 – 1 <sup>a</sup>     | 0,4 <sup>c</sup>   | 66,7 – 223,45                 |
| Biotin  | 0,05 – 0,07 <sup>a</sup> | 0,045 <sup>c</sup> | 100,05 – 140,07               |
| Askorbinska kiselina                                  | 7 – 56 <sup>a</sup>      | 100 <sup>c</sup>   | 6,67 – 50,025                 |

<sup>a</sup> Količina izražena u jedinicama mg/100 g, <sup>b</sup> RDI (preporučeni dnevni unos, eng. *Recommended Dietary Intake*) je izražen u g/danu, <sup>c</sup> RDI je izražen u mg/danu

### 2.1.3 Bioaktivni potencijal pčelinjeg polena

Istraživanja farmakološke aktivnosti pčelinjeg polena poslednjih decenija su u porastu. Otkrivena su brojna biološka dejstva ovog proizvoda među kojima su antioksidativno, antimikrobno, imunomodulatorno i hepatoprotektivno dejstvo (Yıldız et al. 2013; Medeiros et al. 2008; Pascoal et al. 2014). Sprovedene *in vitro* i *in vivo* studije, kao i klinička ispitivanja, ukazuju na njegov pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje, zahvaljujući visokom sadržaju specifičnih bioaktivnih supstanci čiji prosečan udeo iznosi oko 70% (Weis et al. 2022; Rzepecka-Stojko et al. 2015). Deo bioaktivnih supstanci potiče iz grupe nutrijenata (proteini, lipidi, ugljeni hidrati, vitamini). Međutim, terapeutskom dejstvu pčelinjeg polena umnogome doprinose i supstance iz grupe sekundarnih metabolita koje nemaju nutritivnu funkciju ali deluju kao antioksidansi. Polifenolna jedinjenja izolovana iz pčelinjeg polena su antioksidativne komponente koje predstavljaju važan parametar kvaliteta ovog proizvoda, što potvrđuju brojni objavljeni radovi o njihovom ukupnom sadržaju, biološkoj aktivnosti i pozitivnom uticaju na zdravlje (Giampieri et al. 2022; Mărgăoan et al. 2019; Weis et al. 2022).

#### 2.1.3.1 Oksidativni stres i antioksidativna zaštita

Oksidativni stres se nalazi u osnovi većine patoloških stanja organizama, kao i samog procesa starenja. Do oksidativnog stresa dovodi prekomerna proizvodnja slobodnih radikala - nestabilnih i reaktivnih molekulskih oblika sa jednim ili više nesparenih elektrona, koji trenutno reaguju sa dostupnim biomolekulima. Slobodni radikali izazivaju niz lančanih reakcija pri čemu dovode do oštećenja svih ćelijskih struktura, uključujući lipide (lipidna peroksidacija), proteine i DNK. U živim organizmima najznačajniju grupu slobodnih radikala čine vrste koje potiču od kiseonika, tzv. reaktivne kiseonične vrste (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Kiseonik je, bez sumnje, neophodan element za svaki živi organizam, međutim, reaktivne vrste kiseonika mogu delovati toksično ili mutageno. Reaktivni oblici kiseonika uključuju superoksid anjon-radikal ( $O_2^-$ ) i vodonik-peroksid,  $H_2O_2$ , kao i hidrosil-radikal ( $\cdot OH$ ). Poremećaj homeostaze između reaktivnih kiseoničnih vrsta i antioksidativnog odbrambenog sistema organizma dovodi do oksidativnog stresa. Svaki biološki sistem mora težiti izbegavanju okruženja sa prekomernim formiranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta s obzirom da one utiču na vitalne procese u živim bićima ali takođe utiču i na biološke karakteristike hrane, farmaceutskih i kozmetičkih preparata i drugih proizvoda (Działo et al. 2016; Halliwell et al. 1995).

Tokom evolucije razvijena je odbrana organizma od delovanja slobodnih radikala, zasnovana na primarnoj i sekundarnoj antioksidativnoj zaštiti, koja obuhvata enzimске i neenzimске antioksidanse. Da bi određena supstanca delovala kao antioksidans mora ispuniti dva uslova: prisutna u maloj koncentraciji u odnosu na supstrat podložan oksidaciji mora usporiti ili sprečiti reakciju oksidacije; nastali radikal mora biti stabilan kako bi se prekinula lančana reakcija. Superoksid-dizmutaza, katalaza i različite peroksidaze, zatim tripeptid glutation kao i proteini apoceruloplazmin, apotransferin i apoferitin, obezbeđuju primarnu antioksidativnu zaštitu. Sekundarna antioksidativna zaštita zasniva se prvenstveno na dejstvu proteolitičkih enzima. Međutim, jako je važno i delovanje neenzimskih komponenata sekundarne antioksidativne zaštite u koje spadaju prirodni endogeni produkti ćelija kao i polifenolna jedinjenja koja se u organizam unose putem hrane.

U slučajevima kada primarni endogeni sistem odbrane od ROS nije dovoljan, preporučuje se povećanje količine prirodnih antioksidanasa kroz ishranu ili spoljnu primenu kako bi se podigao nivo sekundarne zaštite. Primeni antioksidanasa poreklom iz prirodnih proizvoda se daje prednost u odnosu na sintetičke antioksidanse koji ispoljavaju neželjene efekte kada se konzumiraju *in vivo* (Xu et al. 2021).

### 2.1.4 Polifenolna jedinjenja pčelinjeg polena - poreklo, struktura i biološko dejstvo

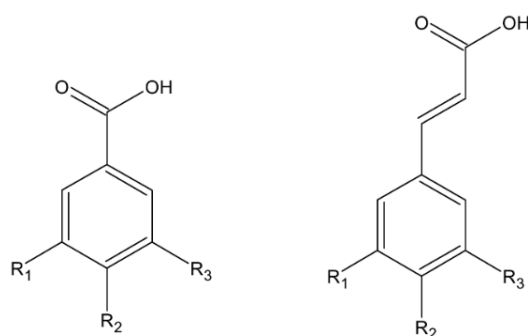
Pčelinji polen je bogat prirodnim antioksidansima tj. polifenolnim jedinjenjima koja potiču iz biljaka. Prosečan udeo polifenolnih jedinjenja u ovom prirodnom proizvodu kreće se od 3% do 5% (Rzepecka-Stojko et al. 2015; Mărgăoan et al. 2019). Varijacije u polifenolnom sastavu različitih uzoraka pčelinjeg polena posledica su različitih biljnih vrsta i geografskih područja sa kojih potiču, kao i klimatskih uslova, zemljišta i brojnih drugih faktora (Giampieri et al. 2022). Bez obzira na pomenute razlike sadržaj polifenolnih jedinjenja u pčelinjem polenu je značajan što je potvrđeno brojnim istraživanjima (Rzepecka-Stojko et al. 2015).

Polifenolna jedinjenja spadaju u sekundarne metabolite biljaka, široko rasprostranjene u biljnom svetu. Za razliku od primarnih metabolita (ugljeni hidrati, amino-kiseline, masne kiseline, nukleinske kiseline) sekundarni metaboliti biljaka nisu od energetskog značaja za biljke, te stoga ne učestvuju direktno u fazama rasta, razvoja i reprodukcije. Sintetišu se obično na kraju faze rasta biljaka u jako malim količinama u odnosu na primarne metabolite. Nije u potpunosti razjašnjena uloga svih sintetisanih sekundarnih metabolita, ali je za veliki deo ovih supstanci potvrđeno da vrše određenu funkciju u samoj biljci. Poznato je da polifenolna jedinjenja iz pčelinjeg polena mogu imati ulogu signalnih molekula na relaciji biljka - mikroorganizam. Deluju kao fitoaleksini (supstance sa antimikrobnim dejstvom) ili stimulansi za klijanje spora tj. mogu imati zaštitnu ili stimulativnu ulogu, u zavisnosti od vrste mikroorganizama i potrebe biljke. Polifenolna jedinjenja daju bogat ukus kao i boju cvetovima, voću i lišću. Njihova aroma može delovati kao atraktant za oprašivače ili, u suprotnom, kao repelent za štetočine. Pojedine biljne vrste u korenu sintetišu fitotoksične polifenole kako bi sprečile razvoj konkurentskih biljaka na tom području. Polifenolna jedinjenja predstavljaju i odgovor na faktore spoljašnje sredine. Biljke ih sintetišu u cilju zaštite od: ekstremno visoke temperature, hladnoće, prekomernog UV-zračenja. Takođe mogu predstavljati indikatore zagađenja životne sredine, a sve zahvaljujući posedovanju snažnog antioksidativnog kapaciteta za neutralizaciju slobodnih radikala.

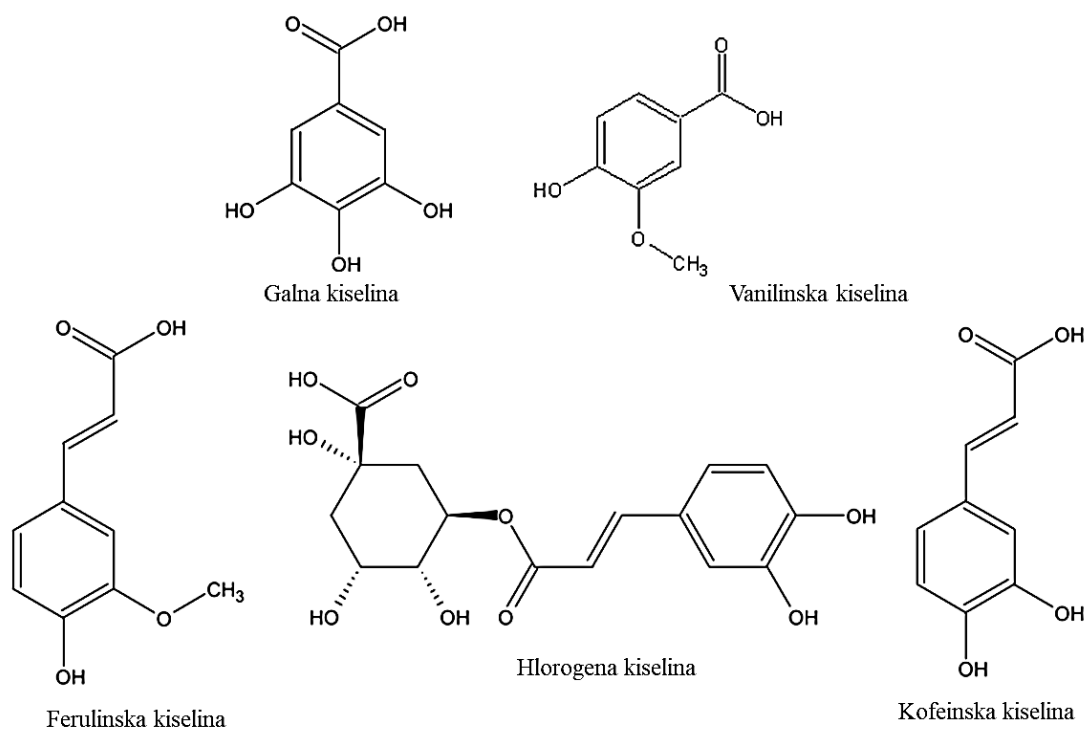
Širok spektar bioloških dejstava odražava i raznolikost struktura u okviru brojne grupe polifenolnih jedinjenja. Identifikovano je više od 8000 polifenola različitih struktura, od jednostavnih jedinjenja niske molekulske mase (fenolne kiseline), do kompleksnih derivata i polimernih struktura (tanini) (Tsao 2010). Posledica velikog broja jedinjenja i njihove raznolikosti jeste složena klasifikacija po različitim osnovama (strukтури, biosintetičkom poreklu, fiziološkom delovanju, rastvorljivosti). Predmet ove disertacije su polifenolna jedinjenja prisutna u pčelinjem polenu, koja su, na osnovu strukture, podeljena u dve grupe: fenolne kiseline i flavonoidi.

#### 2.1.4.1 Fenolne kiseline i uticaj njihove strukture na antioksidativnu aktivnost

Fenolne kiseline predstavljaju grupu biološki aktivnih derivata čiji sadržaj u pčelinjem polenu u proseku iznosi do 0,19% (Komosinska-Vassev et al. 2015). Njih karakteriše prisustvo aromatičnog prstena za koji je vezana karboksilna grupa. Benzoeva kiselina (sa C6-C1 osnovnim strukturnim skeletom) i cimetna kiselina (sa C6-C3 osnovnom strukturom) zajedno sa svojim derivatima (najčešće hidroksi-derivati i metoksi-derivati) čine dve najznačajnije grupe fenolnih kiselina pčelinjeg polena (Slika 5). Fenolne kiseline se uglavnom javljaju u obliku estara, amida i glikozida, a ređe u slobodnom obliku. Najzastupljeniji derivati benzoeve kiseline izolovani iz pčelinjeg polena su: siringinska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, vanilinska kiselina, galna kiselina; dok u najzastupljenije derivate cimetne kiseline spadaju: kofeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, sinapinska, protokatehuinska, i hlorogena kiselina (estar kofeinske kiseline i kininske kiseline) (Slika 6) (Aylanc et al. 2021).



Slika 5. Strukture derivata benzoeve (levo) i cimetne kiseline (desno)



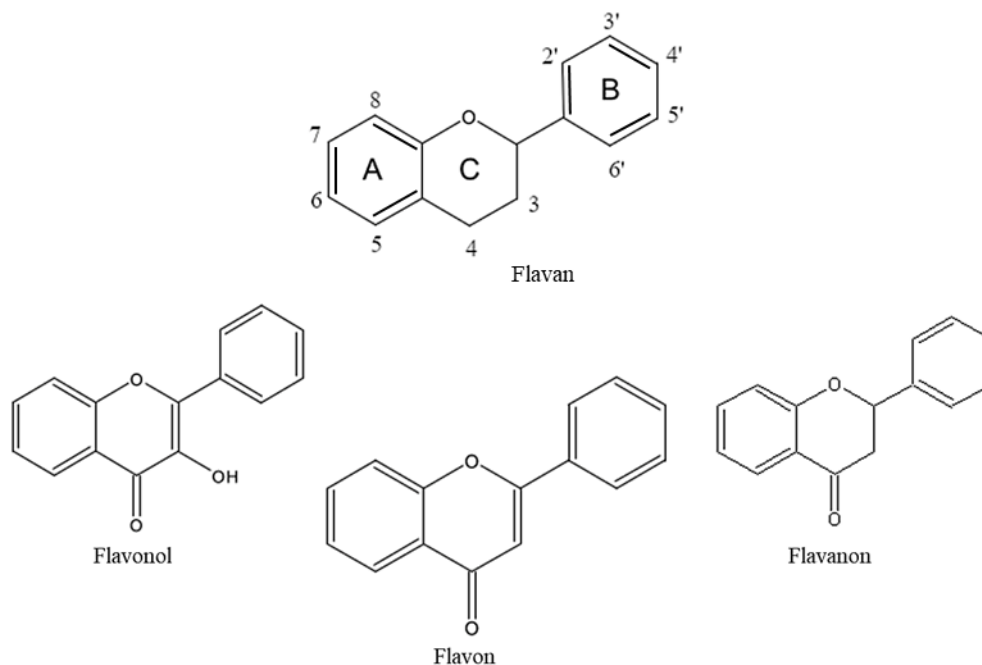
Slika 6. Fenolne kiseline iz pčelinjeg polena

Na sposobnost fenolnih kiselina da neutrališu slobodne radikale utiče njihova struktura, odnosno broj prisutnih funkcionalnih grupa, kao i njihov prostorni raspored. Monohidroksi-derivati benzoeve kiseline najbolje antioksidativno delovanje ispoljavaju u slučaju *meta*-supstitucije, dok su za aktivnost dihidroksi-derivata značajniji *orto*-položaj i *meta*-položaj. Galna kiselina, za čije fenolno jezgro su vezane tri hidroksilne grupe, ispoljava jače antioksidativno dejstvo u poređenju sa

dihidroksi-derivatima i monohidroksi-derivatima. Zamenom hidroksilnih grupa iz položaja 3 i položaja 5 metoksi-grupama, značajno se smanjuje antioksidativna aktivnost galne kiseline. Prisustvo etilenske grupe između fenolnog jezgra i karboksilne grupe, u derivatima cimetne kiseline, povećava njihovu sposobnost otpuštanja vodonika, zbog čega su derivati cimetne kiseline efikasniji antioksidansi u poređenju sa derivatima benzoeve kiseline. Takođe, uvođenjem hidroksilne grupe u *orto*-položaj ili u *para*-poziciju, dodatno se povećava njihovo antioksidativno dejstvo u odnosu na monohidroksi derivate. Zamenom hidroksilne grupe kofeinske kiseline metoksi-grupom, pri čemu nastaje ferulinska kiselina, povećava se antioksidativna aktivnost u lipidnoj fazi (Rzepecka-Stojko et al. 2015).

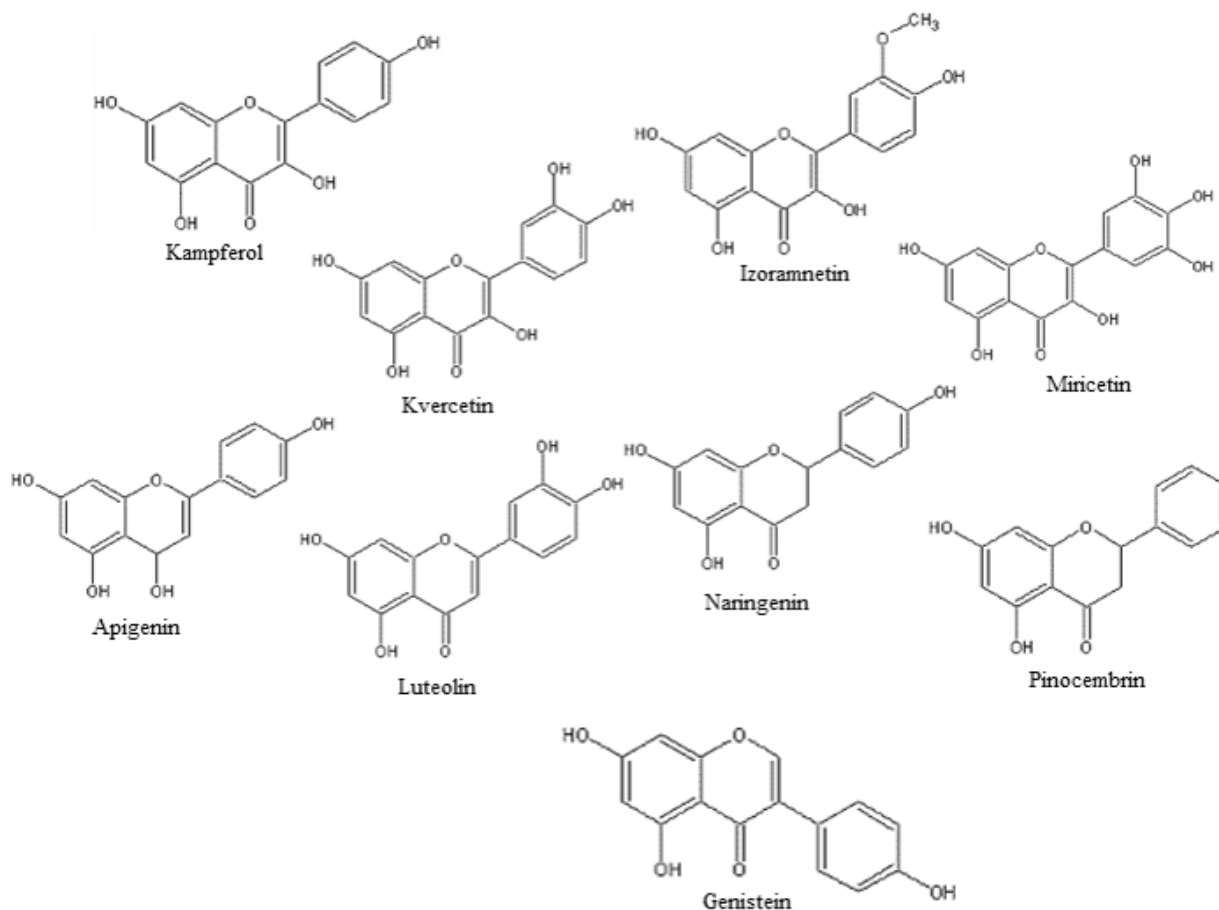
#### 2.1.4.2 Flavonoidi i uticaj njihove strukture na antioksidativnu aktivnost

Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu polifenolnih jedinjenja pčelinjeg polena, čiji ukupni sadržaj u proseku iznosi od 0,25% do 1,4% (Komosinska-Vassev et al. 2015). Osnovni strukturni skelet flavonoida čini difenilpropan (C6-C3-C6), odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol koji, gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena, prelazi u flavan (Slika 7). Na osnovu stepena oksidacije centralnog piranskog prstena flavonoidi su podeljeni na: flavanone, flavanole, flavone, flavonole, antocijanidine i izoflavone. Flavonoidi su u biljkama retko prisutni u slobodnom obliku. Uglavnom se javljaju u obliku glikozida u kojima je flavonoidni deo (aglikon), najčešće *O*-glikozidnom vezom u položaju 3 (ređe u položaju 7), vezan za šećernu komponentu prisutnu u obliku monosaharida ili oligosaharida. Glukoza je monosaharid koji se najčešće javlja vezan za flavonoide. Pored glukoze, često se kao strukturne jedinice glikozilovanih flavonoida javljaju: galaktoza, ramnoza, arabinoza i ksiloza. Hidroksi-derivati i metoksi-derivati flavonoida su takođe prisutni u biljkama, kao i acil-derivati sa funkcionalnim grupama vezanim za aglikon i/ili za glikozidni deo. Flavoni i flavonoli sadrže hidroksilne grupe vezane najčešće u položajima 3' i 4' u prstenu B, dok se ređe javljaju derivati sa hidroksilnom grupom vezanom samo u položaju 4' (Rzepecka-Stojko et al. 2015; Kazazić 2004).



**Slika 7.** Osnovne strukture flavonoida pčelinjeg polena

Analizirajući zastupljenost određenih grupa flavonoida u pčelinjem polenu, rezultati brojnih istraživanja ukazuju na jasnu dominaciju flavonola, posebno kampferola, kvercetina, izoramnetina, miricetina i njihovih glikozilovanih derivata. Sledeći po zastupljenosti su flavoni, posebno apigenin i luteolin zajedno sa svojim derivatima (Aylanc et al. 2021). Naringenin i pinocembrin su predstavnici flavanona identifikovanih u pčelinjem polenu dok je genistein, fitoestrogen izoflavonske stukture, takođe izolovan iz pčelinjeg polena. Osnovne strukture navedenih klasa flavonoida i strukture njihovih najznačajnijih predstavnika prikazane su na Slikama 7 i 8.

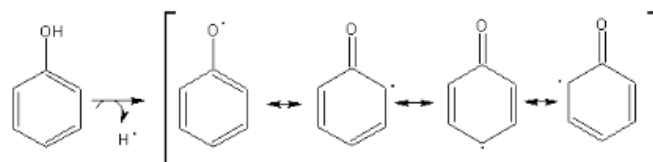


**Slika 8.** Flavonoidi prisutni u pčelinjem polenu

Najvažnija osobina flavonoida kao antioksidanasa jeste njihova sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala. Ona je zapravo rezultat sposobnosti donirnja atoma vodonika, pri čemu nastaju manje reaktivni fenoksi-radikali (reakcija 1):



Fenoksi-radikali su rezonantno stabilizovani tako da ne poseduju dovoljnu količinu energije za pokretanje lančane reakcije sa supstratom (Slika 9) (Spanget-Larsen et al. 2001; Radziszewski et al. 2001).

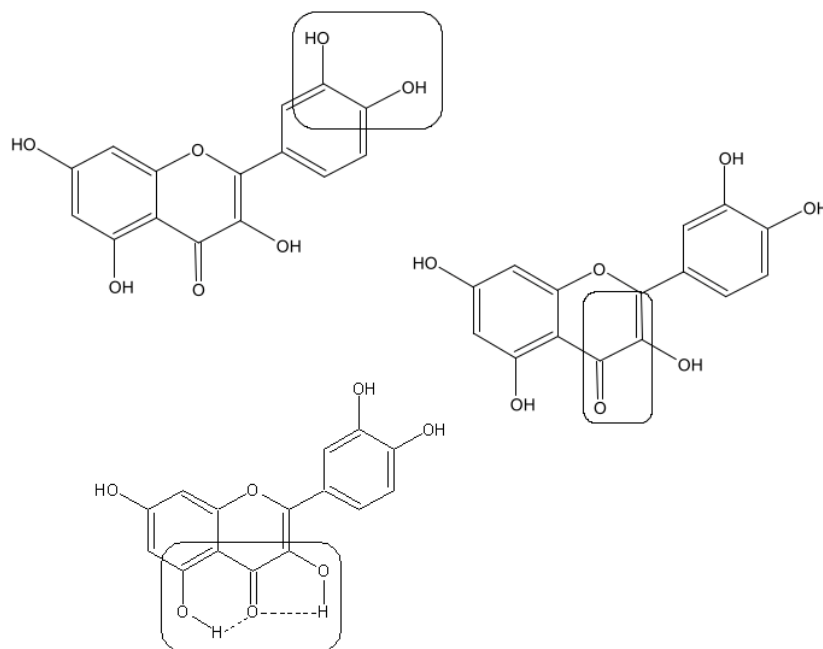


**Slika 9.** Rezonantno stabilizovan fenoksi-radikal

Još jedan mehanizam kojim flavonoidi postižu antioksidativni efekat uključuje heliranje metala (gvožđa ili bakra) koji katalizuju generisanje hidroksi-radikala u procesu lipidne peroksidacije.

Tri glavne strukturne karakteristike flavonoida koje omogućuju njihovo antioksidativno delovanje su:

- prisustvo hidroksilnih grupa u položajima 3'- i 4'- (kateholna struktura) u prstenu B, što omogućuje stabilizaciju nastalog radikala delokalizacijom elektrona
- postojanje 2,3-dvostruke veze konjugovane sa keto-grupom u položaju 4, čime je omogućena delokalizacija elektrona iz prstena B
- prisustvo hidroksilnih grupa u položaju 3 prstena C i položaju 5 prstena A koje omogućuju formiranje vodonične veze sa karbonilnom grupom iz položaja 4 (Slika 10) (Platzer et al. 2022).



**Slika 10.** Strukturne karakteristike flavonoida odgovorne za njihovo antioksidativno delovanje

Broj i pozicija hidroksilnih grupa, pre svega u prstenu B, imaju najveći uticaj na antioksidativnu aktivnost flavonoida. Reakcija metilovanja kao i glikozilovanje dovode do smanjenja antioksidativne aktivnosti flavonoida. Ovaj efekat se objašnjava narušavanjem planarnosti, čime je onemogućena konjugacija, a samim tim i stabilizacija fenoksi-radikala.

Raznoliko biološko dejstvo polifenolnih jedinjenja iz pčelinjeg polena, koje proističe iz njihovog antioksidativnog delovanja, utvrđeno je u brojnim studijama sprovedenim *in vitro* i *in vivo*. U nastavku su navedeni ishodi nekoliko odabranih istraživanja. *In vivo* studijom na životinjskim modelima potvrđeno je antiinflamatorno dejstvo pčelinjeg polena. Naime, polifenolna frakcija uticala je na smanjenje upalnog procesa šape pacova, izazvanog karagenanom, kroz inhibiciju proizvodnje ciklooksigenaze-2 i azot-monoksida (Maruyama et al. 2010). Hepatoprotektivni efekti pčelinjeg polena takođe su testirani *in vivo*, primenom kod pacova sa oštećenjima jetre izazvanim tetrahloometanom i tioacetamidom. Polifenolna jedinjenja uticala su na smanjenje nivoa malonil-aldehida i modulirala nivo katalaze, glutation-peroksidaze i superoksid-dizmutaze u krvi i mozgu i doprinela obnavljanju ćelija jetre (Yıldız et al. 2013). Antiaterosklerotične i hipolipidemijske aktivnosti polifenola pčelinjeg polena, u sinergiji sa ostalim bioaktivnim supstancama, deluju kardioprotektivno. S obzirom da ova jedinjenja deluju i kao hipoglikemijski agensi, pčelinji polen je prepoznat i kao proizvod sa antidijabetičkim potencijalom (Durazzo et al. 2021). Rezultati testiranja antiestrogene i antigenotoksične aktivnosti ekstrakata pčelinjeg polena ukazuju na smanjenje obima oštećenja humanih limfocita podvrgnutih određenim lekovima protiv raka, pri čemu je nivo aktivnosti uslovljen kumulativnim sadržajem polifenolnih jedinjenja. Ova činjenica ukazuje na mogućnost primene pčelinjeg polena u cilju zaštite od mutagenih efekata antikancerskih lekova kod hormonski-zavisnih karcinoma (Pinto et al. 2010). Pčelinji polen se primenjuje i kao dodatak ishrani za ublažavanje neželjenih efekata hemoterapije a uočen je takođe i njegov sinergistički efekat sa lekom za hemoterapiju, cisplatinom, koji se koristi za lečenje raka dojke (Wan Omar et al. 2016).

### 2.1.4.3 Uticaj polifenola na antimikrobnu aktivnost pčelinjeg polena

Prethodno objavljene studije pokazuju da pčelinji polen takođe poseduje i značajan antimikrobni potencijal, koji je uslovljen, između ostalog, prisustvom polifenolnih jedinjenja (Sawicki et al. 2022). Testirani etanolni i metanolni ekstrakti pčelinjeg polena ispoljili su antibakterijsku aktivnost prema nekoliko Gram-pozitivnih i Gram-negativnih patogenih sojeva (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophiles*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*), kao i antimikrobno dejstvo protiv različitih sojeva gljiva i kvasaca (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium verrucosum* i *Rhodotorula mucilaginosa*) (Giampieri et al. 2022). Iako je veliki broj antimikrobnih jedinjenja pčelinjeg polena identifikovan, način njihovog delovanja još uvek nije u potpunosti opisan. U Tabeli 2 naveden je određen broj polifenola sa antimikrobnim potencijalom i mehanizmi delovanja.

**Tabela 2.** Fenolna jedinjenja pčelinjeg polena sa antimikrobnim potencijalom i mehanizmi delovanja (Didaras et al. 2020)

| Naziv jedinjenja              | Mehanizam delovanja  |
|-------------------------------|--|
| Kvercetin - glikozidi         | Oštećuju ćelijski zid bakterija, utiču na transport i pokretljivost<br>Utiču na kontrolu biofilma kvasaca i gljiva |
| Kampferol - glikozidi         | Utiču na kontrolu biofilma kvasaca i gljiva<br>Izazivaju inhibiciju topoizomeraze IV                               |
| Miricetin                     | Inhibira DnaB helikazu <i>E. coli</i>  |
| Luteolin                      | Izaziva oštećenja ćelijskog zida bakterija   |
| Apigenin                      | Destabilizuje komponente ćelijskog zida  |
| Galangin                      | Utiče na agregaciju bakterijskih ćelija, izaziva oštećenja citoplazmatične membrane bakterija i gubitak kalijuma   |
| Ferulinska kiselina           | Oštećuje ćelijsku membranu bakterija, izmenjuje hidrofobnost površine  |
| Galna kiselina                | Oštećuje ćelijsku membranu bakterija, izmenjuje hidrofobnost površine  |
| Estri kofeinske kiseline      | Inhibira rast bakterija kroz mehanizam oksidativnog stresa   |
| <i>p</i> -Kumarinska kiselina | Omota funkciju ćelijske membrane, vezuje se za bakterijsku genomsku DNK  |

### 2.1.5 Pčelinji polen kao dodatak namirnicama

Postoje razni primeri obogaćivanja namirnica (proizvodi od mesa, mlečni proizvodi, pekarski proizvodi, konditorski proizvodi, sokovi) pčelinjim polenom u cilju poboljšanja njihovih nutritivnih i funkcionalnih svojstava. Istraživanja na temu primene pčelinjeg polena kao aditiva hrani posledica su aktuelnih trendova u prehrambenoj industriji koji teže da zadovolje zahteve sve većeg broja potrošača svesnih uticaja hrane na zdravlje. Pčelinji polen, kao bogat izvor prirodnih polifenolnih jedinjenja (antioksidanasa), može uticati na sprečavanje oksidativnog propadanja prehrambenih proizvoda. Proces lipidne peroksidacije jako utiču na kvalitet proizvoda u pogledu teksture i ukusa ali i mikrobiološke ispravnosti, takođe. Štaviše, smatra se glavnim razlogom kvarenja prehrambenih proizvoda tokom obrade i skladištenja. Istraživanja sprovedena sa ciljem procene uticaja dodatka pčelinjeg polena proizvodima od mesa, potvrdila su da je dodatak pčelinjeg polena doprineo usporavju oksidacije lipida, kao i inhibiciji rasta mikroba (Almeida et al. 2017; Turhan et al. 2017; Anjos et al. 2019). Autori Khider i saradnici analizirali su, po prvi put, uticaj dodatka pčelinjeg polena na fermentisane mlečne proizvode. Predmet istraživanja autora bio je jogurt sa dodatkom pčelinjeg polena a rezultati dobijeni analizom *in vitro* antimikrobne i antioksidativne aktivnosti potvrdili su potencijal pčelinjeg polena kao antioksidansa i antimikrobnog agensa koji doprinosi produžetku roka trajanja ispitivanog proizvoda (Khider et al. 2013). Rezultati isktraživanja, kojima su bili obuhvaćeni bezglutenski hleb, kao i biskvit, sa dodatkom pčelinjeg polena, ukazuju na povećanje antioksidativne aktivnosti i poboljšanje u sastavu biodostupnih polifenolnih jedinjenja u odnosu na kontrolne uzorke proporcionalno količini dodatog polena (P. Conte et al. 2020; Krystijan et al. 2015). Navedeni rezultati sugerišu da se pčelinji polen može uspešno koristiti kao prirodni antioksidans i antimikrobno sredstvo koje obebeđuje produžetak roka trajanja namirnica. Međutim, treba imati u vidu činjenicu

da dodatak pčelinjeg polena utiče na ukus, kao i na teksturu finalnog proizvoda, što je uslovljeno kako količinom dodatka polena tako i njegovim biljnim poreklom (Khider et al. 2013).

## 2.2 Mešavine pčelinjeg polena i meda

Kako bi zadovoljili sve veća očekivanja potrošača u vezi kvaliteta hrane, proizvođači su fokusirani na ponudu novih proizvoda nastalih mešanjem prirodnih izvora bioaktivnih jedinjenja u cilju dobijanja finalnog proizvoda poboljšanih karakteristika. Med, pčelinji polen, perga, matični mleč, propolis, pčelinji vosak i pčelinji otrov su bogati izvori bioaktivnih jedinjenja zbog čega pozitivno utiču na ljudsko zdravlje (Nainu et al. 2021). Na tržište se plasiraju kao pojedinačni proizvodi ali takođe i u obliku preparata, najčešće kao mešavine meda sa pčelinjim polenom, propolisom, matičnim mlečom, u raznim kombinacijama. Mešavine pčelinjeg polena i meda, koje su predmet ovog istraživanja mogu predstavljati vrlo efikasan način uvođenja pčelinjeg polena u ljudsku ishranu s obzirom da je pčelinji polen potcenjen u poređenju sa medom. Med, kao prirodni zaslađivač, ima dugu tradiciju i znatno širu primenu u ljudskoj ishrani. Karakterizacija mešavina pčelinjeg polena i meda kao i procena doprinosa obe komponente u smislu kvaliteta finalnog proizvoda mogla bi da utiče na to da, na ovaj način, pčelinji polen postane zastupljeniji u ishrani.

Med je, prema definiciji (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, “Službeni glasnik RS”, br. 101/2015), prirodna, slatka supstanca koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) preradom nektara biljaka, ili iz sokova sa živih delova biljaka, ili sakupljanjem ekskreta insekata koji se hrane sišući sokove sa živih delova biljaka, koje pčele sakupljaju, prerađuju i dodaju sopstvene specifične supstance, dehidriraju i odlažu u ćelije saća do sazrevanja. Na osnovu date definicije med, prema poreklu, može biti nektarski ili cvetni med, ukoliko ga pčele proizvedu od nektara odnosno sekreta koji izlučuju biljne žlezde (nektarije) unutar cveta. Ukoliko u sastavu meda dominira nektar određene biljne vrste onda se označava kao monofloralni, dok polifloralni med sadrži nektar više različitih biljnih vrsta. Medljikovac ili šumski med je specifična vrsta meda koja može poticati iz dva izvora: medljike ili medne rose. Medljika je slatka tečnost koju lisne i štitaste vaši izlučuju u vidu kapljica po listovima i drugim delovima biljaka, odakle ih pčele sakupljaju i prerađuju u med. U stvaranju medne rose ne učestvuju nektarske žlezde i biljne vaši, već ona predstavlja sladunjav sok koji luči lišće nekih četinarskih (jele (*Abies* spp.), smreke (*Picea* spp.), bora (*Pinus* spp.)) i listopadnih (hrasta (*Quercus* spp.), kestena (*Castanea sativa* Miller), bukve (*Fagus sylvatica* L.), leske (*Corylus* spp.)) vrsta drveća. Parametri kvaliteta meda kao prirodnog i vrednog proizvoda striktno su regulisani relevantnom zakonskom regulativom (Zammit Young and Blundell 2023).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja med je okarakterisan kao složena smeša najmanje 200 različitih supstanci (D. M. Milojković-Opsenica and Tešić 2017). Deo ovih supstanci je biljnog porekla dok neke od njih u med dodaju pčele. Određene supstance pak nastaju tokom zrenja meda u saću. Hemijski sastav meda, njegova senzorna svojstva kao i biološka aktivnost uslovljeni su njegovim biljnim poreklom. Međutim, određeni spoljni faktori poput sezonskih faktora životne sredine ili primenjena pčelarska praksa, odnosno način prerade, takođe mogu uticati na kvalitet meda. Zbog varijabilnosti usled uticaja navedenih faktora sastav meda do danas nije u potpunosti definisan i razjašnjen.

Med se pretežno sastoji iz ugljenih hidrata (~80%) i vode (~20%) (Tabela 3). Monosaharidi glukoza i fruktoza čine približno 75% ukupnih ugljenih hidrata prisutnih u medu. Med takođe sadrži i organske kiseline, proteine, amino-kiseline, enzime (dijastaza, invertaza, glukoza-oksidaza, katalaza), minerale, vitamine i polifenolna jedinjenja. Iako je sadržaj navedenih jedinjenja znatno niži (~2%) u poređenju sa sadržajem ugljenih hidrata, njihov uticaj na senzorna i biološka svojstva meda je značajan (Bogdanov et al. 2008). Med ispoljava širok spektar bioloških dejstava (antioksidativno, antiinflamatorno, antitumorno, imunomodulatorno, antimikrobno) što je potvrdimo brojnim naučnim

studijama u najvećoj meri objavljenim tokom protekle dve decenije (Zammit Young and Blundell 2023).

**Tabela 3.** Hemijski sastav meda (g/ kg) (Bogdanov et al. 2008)

|                          | Cvetni med |              | Medljikovac |              |
|--------------------------|------------|--------------|-------------|--------------|
|                          | prosečno   | min. – maks. | prosečno    | min. – maks. |
| Voda                     | 172        | 150 – 200    | 163         | 150 – 200    |
| Monosaharidi             |            |              |             |              |
| Fruktoza                 | 382        | 300 – 450    | 318         | 280 – 400    |
| Glukoza                  | 313        | 240 – 400    | 261         | 190 – 320    |
| Disaharidi               |            |              |             |              |
| Saharoza                 | 7          | 1 – 48       | 5           | 1 – 47       |
| Trisaharidi              |            |              |             |              |
| Melezitoza               | <1         |              | 40          | 3 – 220      |
| Erloza                   | 8          | 5 – 60       | 10          | 1 – 60       |
| Ukupni šećeri            | 797        |              | 805         |              |
| Minerali                 | 2          | 1 – 5        | 9           | 6 – 20       |
| Amino-kiseline, proteini | 3          | 2 – 4        | 6           | 4 – 7        |
| Kiseline                 | 5          | 2 – 8        | 11          | 8 – 15       |
| pH-vrednost              | 3,9        | 3,5 – 4,5    | 5,2         | 4,5 – 6,5    |

Mešavine meda i pčelinjeg polena se tradicionalno primenjuju za lečenje astme, bronhitisa, reumatizma i raznih vrsta infekcija (Küpeli Akkol et al. 2010). Obogaćivanje meda pčelinjim polenom utiče na parametre koji karakterišu njegov kvalitet, na polifenolni profil, biološka svojstva, kao i na senzorne karakteristike. Rezultati dosadašnjih istraživanja, koja su za cilj imala procenu uticaja dodatka pčelinjeg polena uzorcima meda, jasno ukazuju na povećanje sadržaja polifenolnih jedinjenja što je rezultovalo povećanjem antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, odnosno značajnim povećanjem lekovitog potencijala meda dodatkom polena (Özkök and Silici 2017; Juszczak et al. 2016; Lesław Juszczak and Robert Socha 2018; Küpeli Akkol et al. 2010). Utvrđeno je takođe da med u smeši sa pčelinjim polenom ima ulogu konzervansa tj. da pozitivno utiče na produžetak roka trajanja proizvoda. U prilog tome govore rezultati istraživanja u kojem je sprovedeno praćenje parametra  $a_w$  (aktivnost vode) u određenom vremenskom periodu u uzorcima pčelinjeg polena, kao i mešavina pčelinjeg polena i meda, pri čemu je uočeno njegovo povećanje u slučaju pčelinjeg polena, dok je za mešavinu meda i polena vrednost parametra  $a_w$  bila niža od početne. Specifičan fizičko-hemijski sastav meda (visoka koncentracija šećera, nizak sadržaj vlage, niska pH vrednost) ne čini ga medijumom pogodnim za proliferaciju mikroorganizama (Sagona et al. 2017). Pored proučavanja biološke aktivnosti smeša pčelinjeg polena i meda treba imati u vidu da na prihvatanje preparata od strane potrošača takođe utiču i njegove senzorne karakteristike: boja, tekstura i ukus (Habryka, Socha, and Juszczak 2021).

### 2.3 Metode ispitivanja

U okviru ove disertacije sprovedena je sveobuhvatna analiza bioaktivnih polifenolnih supstanci uzoraka pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda. Tokom analize praćeni su osnovni koraci standardnih procedura ustanovljenih na osnovu dosadašnjih istraživanja, u okviru kojih su primenjene određene modifikacije nastale iz potrebe prilagođavanja eksperimenata laboratorijskim uslovima (M. G. Campos et al. 2021). Date metode uključuju postupak ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, njihovo prečišćavanje i koncentrovanje, kao i dalju karakterizaciju primenom metoda tačne hromatografije i testova za određivanje biološke aktivnosti polifenolne frakcije. Deo

istraživanja je posebno bio usmeren ka optimizaciji uslova za primenu metode tankoslojne hromatografije u analizi polifenolnih jedinjenja uzoraka pčelinjeg polena i mešavina polena i meda. Navedenim metodama prethodila je melizopalinološka analiza uzoraka pčelinjeg polena kao i karakterizacija uzoraka meda određivanjem njihovih fizičko-hemijskih parametara kako je detaljno opisano u eksperimentalnom delu (M. G. Campos et al. 2021; Bogdanov, Martin, and Lüllmann 1997). Statistička obrada i analiza svih rezultata prikupljenih tokom izvođenja eksperimenata bila je primenjena u cilju donošenja konačnih zaključaka. U nastavku sledi pregled primenjenih analitičkih metoda.

### **2.3.1 Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja**

Analiza polifenolnih jedinjenja iz uzoraka pčelinjeg polena, meda i smeša polena i meda započeta je optimizacijom postupka ekstrakcije. Ekstrakcija je kritičan korak kojim je neophodno obezbediti izdvajanje željene komponente iz kompleksnog prirodnog matriksa u skladu sa naknadnim tehnikama koje će biti primenjene u daljoj analizi. Uticaj različitih tehnika ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda na hemijski sastav ekstrakata je dobro dokumentovan, čime je umnogome olakšan odabir odgovarajuće tehnike primenjene u okviru ove disertacije (Mosić et al. 2020). Uzimajući u obzir principe na kojima su date tehnike zasnovane, zatim njihove prednosti i ograničenja, kao i osobine matriksa uzoraka i fizičko-hemijska svojstva ciljanih, polifenolnih jedinjenja izabrana je ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (*Ultrasound Assisted Extraction*, UAE) tj. sonikacija. Primena ove metode je od posebnog značaja u slučaju uzoraka pčelinjeg polena posebno zbog karakteristične strukture zaštitnog omotača polenovih zrna. Uticaj energije ultrazvučnih talasa dovodi do poremećaja strukture egzine (spoljašnjeg zaštitnog omotača), usled postojanja apertura, odnosno njenog raslojavanja, čime je omogućeno oslobađanje sadržaja polenovih zrna i njegov kontakt sa ekstrakcionim sredstvom. Primenom ultrazvučnog kupatila omogućeno je tretiranje više uzoraka istovremeno čime je dodatno skraćen proces ekstrakcije. Zbog svojih karakteristika, ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka se smatra ekološki prihvatljivom tehnikom pogodnom za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja uz nisku potrošnju rastvarača i energije (Mosić et al. 2020). Primenom više ciklusa sonikacije, određenog trajanja, uz pogodan rastvarač, obezbeđena je efikasna ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz pčelinjeg polena i ostalih ispitivanih uzoraka (M. G. Campos et al. 2021; Stanković 2012).

### **2.3.2 Prečišćavanje i koncentrovanje ekstrakta primenom čvrsto-tečne ekstrakcije**

Čvrsto-tečna ekstrakcija (Solid Phase Extraction, SPE) označava razdvajanje komponenata iz tečne faze na čvrstom ekstrakcionom medijumu (sorbentu) smeštenom u SPE kolonu, tzv. kertridž. Sistem za SPE primenjuje se u svrhu pripreme ekstrakata za dalju analizu. Na ovaj način se postiže njihovo koncentrovanje i/ili prečišćavanje uklanjanjem kontaminanata i ometajućih supstanci iz višekomponentnih sistema, izbegavajući pritom upotrebu velikih količina organskih rastvarača što je ekonomski i ekološki opravdano. Proces se odvija u nekoliko faza, koje podrazumevaju:

- aktiviranje sorbenta pre upotrebe
- nanošenje poznate zapremine uzorka u kolonu, pri čemu dolazi do njegove adsorpcije
- ispiranje ometajućih jedinjenja adekvatnim rastvaračem
- desorpcija analita propuštanjem pogodnog rastvarača kroz kolonu.

Primenom SPE na ekstrakte pčelinjeg polena, meda i njihovih mešavina postiže se uklanjanje šećera iz polifenolne frakcije što olakšava njihovu dalju identifikaciju primenom metoda tečne hromatografije (M. G. Campos et al. 2021; Stanković 2012; Gašić 2017). Interakcije polifenolnih jedinjenja sa sorbentom (C18) zasnovane su na Van der Valsovim silama, čija jačina zavisi od

njihovih jonizacionih stanja i kontrolisana je podešavanjem pH vrednosti. Tipičan SPE sistem prikazan je na Slici 11. Pored toga što se uporedo može tretirati veći broj uzoraka, sistem je moguće povezati na vakuum, čime se dodatno skraćuje vreme analize.



Slika 11. SPE sistem

### 2.3.3 Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode našle su primenu u analizi polifenola zahvaljujući činjenici da ova jedinjenja apsorbuju zračenje iz oblasti ultraljubičastog/vidljivog (UV/Vis) dela spektra, pri talasnim dužinama od 200 nm do 800 nm, što je posledica prisustva aromatičnih prstenova u njihovom sastavu. Merenjem apsorbancije pri određenoj talasnoj dužini, dobijaju se podaci za izračunavanje koncentracije analita s obzirom da je, na osnovu Lamber-Berovog (*Lambert-Beer*) zakona, molarna koncentracija nekog jedinjenja direktno proporcionalna njegovoj apsorbanciji. Za merenje apsorbancije koristi se spektrofotometar, uređaj koji se sastoji iz: izvora zračenja, monohromatora, detektora i procesora signala. Zbog svoje jednostavnosti i niskih troškova, spektrofotometrija je metoda koja se često koristi za analizu polifenolnih jedinjenja u različitim proizvodima (prehrambenim, farmaceutskim, poljoprivrednim). U okviru ove disertacije spektrofotometrija je korišćena za određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja u ekstraktima svih uzoraka kao i za određivanje njihove antioksidativne aktivnosti.

#### 2.3.3.1 Određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja (*Total Phenolic Content*, TPC)

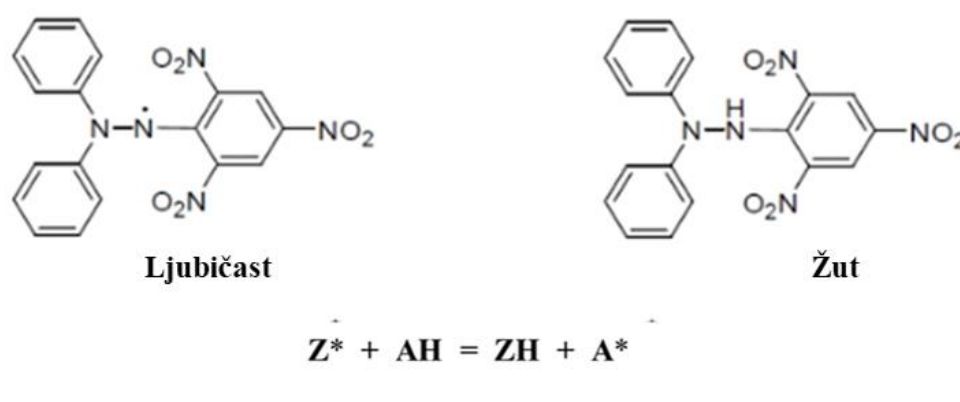
Ukupan sadržaj polifenola u ispitivanim uzorcima pčelinjeg polena, meda i smeša polena i meda određen je primenom Folin-Čikalteu (*Folin Ciocalteu*, FC) reagensa. FC test je prvobitno bio razvijen za detekciju i kvantifikaciju tirozina, a naknadno je modifikovan u cilju određivanja sadržaja polifenolnih jedinjenja u vinu. Zbog svoje jednostavnosti i ponovljivosti jako brzo je našao primenu u kvantifikaciji polifenola u različitim vrstama uzoraka, među kojima su svakako i pčelinji proizvodi (Platzer et al. 2021). FC reagens sastoji se od fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. U kontaktu rastvora reagensa sa polifenolnim jedinjenjima, u baznoj sredini, dolazi do njegove redukcije i formiranja plavo obojenog kompleksa sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 765 nm (reakcija 2):



Ukupan polifenolni sadržaj se obično izražava u vidu ekvivalenta standarda galne kiseline po gramu uzorka.

### 2.3.3.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti (*Radical Scavenging Activity, RSA*)

Antioksidativna aktivnost fenolne frakcije analiziranih uzoraka određena je DPPH testom. Ovim putem se na brz, jednostavan i jeftin način meri sposobnost jedinjenja da deluju kao hvatači slobodnih radikala ili donori vodonika. Metoda je našla široku primenu u merenju ukupnog antioksidativnog kapaciteta različitih namirnica (sokova, voća, povrća, začina, ulja, brašna), a takođe se može koristiti za kvantifikaciju antioksidanasa u složenim biološkim sistemima (Sanchez-Moreno 2002; Kedare and Singh 2011). Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom zasniva se na upotrebi obojenog i stabilnog slobodnog radikala, čija se boja menja u reakciji sa potencijalnim antioksidansom. Stabilnost 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala je posledica delokalizacije elektrona preko celog molekula. Primarno je uslovljena sternim smetnjama oko dvovalentnog atoma azota, ali delimično i elektrondonorskim uticajem difenilamino-grupe i elektronakceptorskim uticajem pikril-grupe. DPPH radikal, zbog postojanja delokalizacije elektrona, ne dimerizuje se i prisutan je u slobodnoj, monomernoj formi, kako u rastvoru tako i u čvrstom obliku. Još jedna posledica delokalizacije elektrona jeste jaka apsorpcija u vidljivom delu spektra (ljubičasta boja) pri talasnoj dužini od 515 nm. U reakciji DPPH sa donatorom vodonika (antioksidans) dolazi do formiranja redukovanog oblika (DPPH-H) i promene boje rastvora iz ljubičaste u žutu (Slika 12). Ukoliko supstrat poseduje antioksidativna svojstva, boja rastvora će biti svetložuta; u suprotnom, ne dolazi do neutralizacije DPPH radikala i rastvor ostaje ljubičast (Foti 2015; Kedare and Singh 2011).



**Slika 12.** Reakcija DPPH radikala i antioksidansa (AH) uz promenu boje rastvora iz ljubičaste u žutu

Količina uzorka koja smanjuje početnu apsorpciju rastvora DPPH za 50% izabrana je kao kriterijum za procenu antioksidativne aktivnosti. Ova promena se upoređuje sa promenom izazvanom troloksom (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina) kao standardom a antioksidativna aktivnost uzorka se izražava u mikromolovima ekvivalenta troloksa (TE).

### **2.3.4 Metode za testiranje antimikrobne aktivnosti**

#### 2.3.4.1 Difuziona metoda

Antibakterijska aktivnost analiziranih ekstrakata testirana je primenom difuzione metode sa bunarićima. Metoda se zasniva na unošenju ekstrakata uzoraka u bunariće, izbušene u hranljivoj podlozi inokulisanoj određenim bakterijskim sojem (eng. *Well diffusion method*). Nakon inkubacije, pri odgovarajućim uslovima (temperaturi i vremenskom intervalu), oko bunarića dolazi do formiranja tzv. zone inhibicije. Date zone nastaju usled radijalnog širenja analiziranih ekstrakata difuzijom kroz podlogu, pri čemu dovode do inhibicije rasta bakterija. Prečnik zone inhibicije predstavlja zapravo osetljivost bakterija na određeni ekstrakt i izražava se u milimetrima.

#### 2.3.4.2 Mikrodiluciona metoda

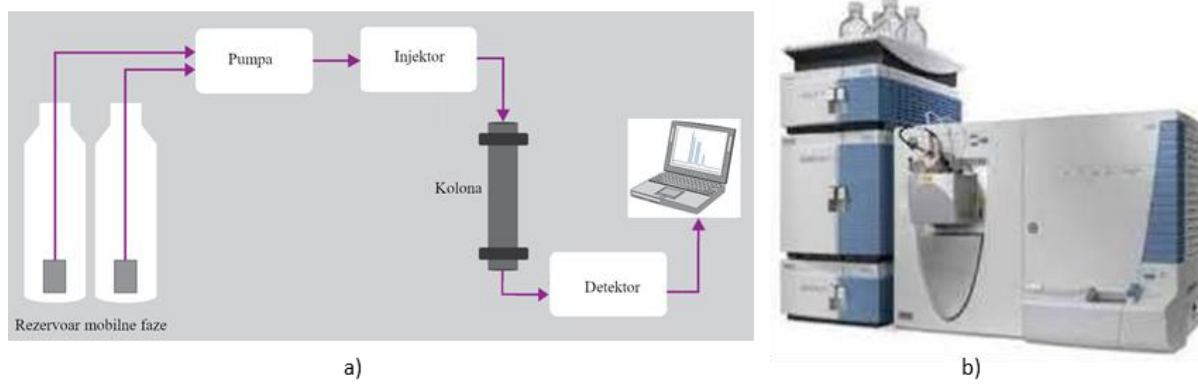
Mikrodiluciona metoda je pogodna za ispitivanje antimikrobnih svojstava prirodnih proizvoda. Dilucione metode su, za razliku od difuzionih, kvantitativne i primenjuju se u cilju određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) kako sirovih ekstrakata, tako i hromatografski izdvojenih ili prečišćenih jedinjenja. MIK vrednost je najniža koncentracija ispitivane supstance koja zaustavlja rast bakterija, dok koncentracija koja ubija 99,5 % bakterija u odnosu na kontrolnu grupu predstavlja MBK vrednost. Jedan od indikatora koji se koristi za procenu rasta ćelija jeste resazurin, plavo obojen indikator koji se u prisustvu živih bakterijskih ćelija, usled delovanja ćelijskih oksidoreduktaza, redukuje u ružičast, fluorescentan rezorufin. Najmanja koncentracija antimikrobnog agensa koja ne dovodi do promene boje resazurina definiše se kao MIK.

### **2.3.5 Metode tečne hromatografije**

Tečna hromatografija je tehniku razdvajanja zasnovana na raspodeli analiziranih komponenta između dve faze, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna) faza, dok je druga, mobilna faza, tečnost koja se kreće u određenom smeru kroz stacionarnu fazu. Metode tečne hromatografije našle su široku primenu u analizi polifenolnih jedinjenja u raznim prehrambenim proizvodima među kojima su svakako i pčelinji proizvodi. Hromatografske tehnike prmenjene u okviru ove disertacije obuhvataju: ultraefikasnu tečnu hromatografiju u kombinaciji sa masenom spektrometrijom primenom hibridnog detektora koji kombinuje linearni trap i orbitrap (eng. *Ultra High-Performance Liquid Chromatography, UPLC-LTQ OrbiTrap XL*)) i modernu planarnu hromatografiju tj. visokoefikasnu tankoslojnu hromatografiju.

#### 2.3.5.1 Ultraefikasna tečna hromatografija

Ultraefikasna tečna hromatografija spada u metode tečne hromatografije na koloni, zasnovane na principu propuštanja mobilne faze kroz kolonu (u kojoj je smeštena stacionarna faza) pod visokim pritiskom. Osnovni delovi tečnog hromatografa su: rezervoar mobilne faze, pumpa, injektor, kolona i detektor (Slika 13). Instrumenti novije generacije predstavljaju automatizovane sisteme kontrolisane uz pomoć računara koji obezbeđuju i mogućnost prikupljanja i obrade podataka.



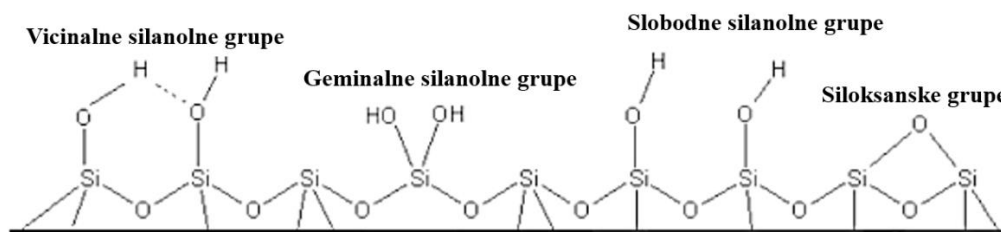
**Slika 13.** Shema tečnog hromatografa (a) i prikaz modernog UPLC-MS sistema ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) (b)

Pumpa obezbeđuje kontrolisan i precizan protok mobilne faze kroz sistem pod visokim pritiskom. Pomoću injektora uzorak se ubrizgava u struju mobilne faze koja ga dalje uvodi u kolonu. Kolone su obično cevi od visokokvalitetnog nerđajućeg čelika koji može da izdrži visok pritisak i otporan je na koroziju oksidacionim agensima, kiselinama, bazama i organskim rastvaračima. Kolona je jednim svojim krajem povezana sa injektorom, dok je drugim krajem povezana sa detektorom. Unutar kolone nalazi se materijal koji ima ulogu stacionarne faze ali i potporne matrice. Da bi se određeni materijal primenio u date svrhe neophodno je da bude hemijski i mehanički stabilan kako bi ostao neoštećen pri protoku mobilne faze pod visokim pritiskom. Veličina čestica i prečnik pora su takođe važni parametri, s obzirom da utiču na efikasnost kolone. Supstanca koja ispunjava navedene uslove i predstavlja najčešće korišćeni sorbent u tečnoj hromatografiji jeste silika gel (Reuhs 2017).

Silika gel (amorfni oblik silicijum-dioksida) je porozan materijal, čija specifična površina iznosi 400-600 m<sup>2</sup>/g. U zavisnosti od tehnologije proizvodnje, silika gel se može pripremati u širokom rasponu veličina čestica i pora, sa uskom distribucijom veličine čestica. Zbog svojih uniformnih karakteristika takođe predstavlja i najčešće korišćeni materijal za pripremu hemijski modifikovanih sorbenata, odnosno tzv. vezanih faza.

Hromatografske karakteristike silika gela uslovljene su postojanjem aktivnih centara na njegovoj površini (Slika 14), a to su:

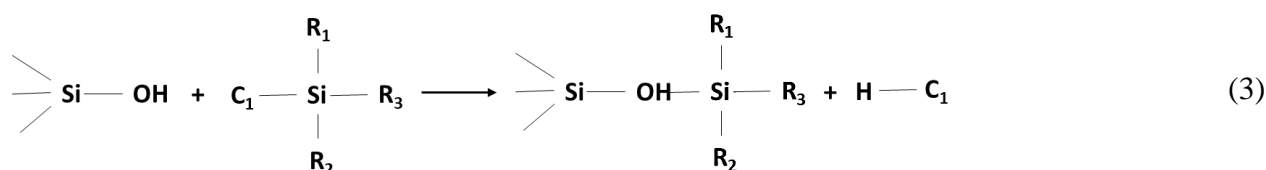
- silanolne (hidrofilne) grupe (-Si-OH) koje mogu biti slobodne, geminalne i vicinalne
- siloksanske (hidrofobne) grupe (-Si-O-Si-) koje nastaju procesom kondenzacije vicinalnih silanolnih grupa



**Slika 14.** Aktivni centri na površini silika gela (vicinalne, geminalne i slobodne silanolne grupe, siloksanske grupe)

Silika gel se primenjuje u uslovima normalno-fazne hromatografije gde postoji raspodele analita između izrazito polarne stacionarne faze i manje polarne mobilne faze.

Za razdvajanje polifenolnih jedinjenja uzoraka pčelinjeg polena i mešavina polena i meda primenom reverzno-fazne hromatografije na koloni, važnu ulogu ima primena sorbenta u vidu hemijski modifikovanog silika gela koji sadrži nepolarne grupe u kombinaciji sa polarnom mobilnom fazom; konkretno, silika gel sa vezanim oktadecil- (C18) ugljovodoničnim nizovima. Modifikacija silika gela vrši se reakcijom silanolnih grupa sa određenim organskim ili organo-silikonskim jedinjenjima (reakcija 3):



Pri reakcijama modifikacije 40-50% silanolnih grupa ostaje nepromenjeno usled sternih smetnji i drugih faktora. Njihovo prisustvo, zajedno sa funkcionalnim grupama unetim modifikacijom, čini hemijski modifikovani silika-gel sorbentom sa bifunkcionalnom površinom, što utiče na mehanizme odvajanja različitih supstanci na takvim sorbentima (D. Milojković-Opsenica 2000; Claessens and Vanstraten 2004). Primena vezanih faza na bazi silicijum-dioksida ograničena je na određen opseg pH vrednosti ( $2 < \text{pH} < 8$ ) s obzirom da pri niskim pH vrednostima dolazi do hidrolize alkil-siloksana, dok se pri visokim pH vrednostima povećava rastvorljivost silika gela (Reuhs 2017; Lozano-Sánchez et al. 2018).

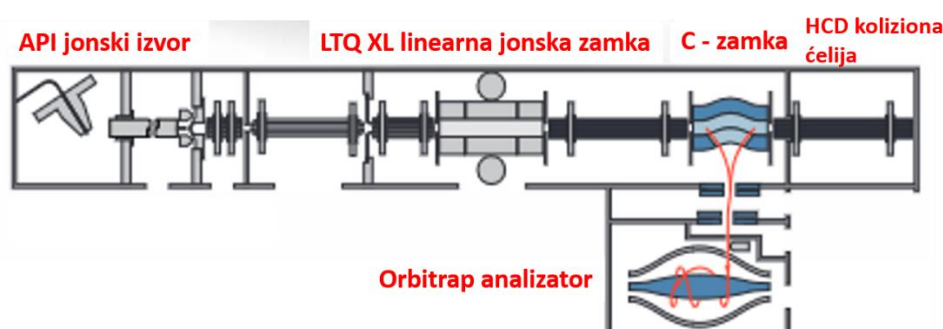
Analit, nakon ulaska u kolonu, stupa u interakciju sa obe faze, stacionarnom i mobilnom. U zavisnosti od jačine interakcija analizirane smeše sa stacionarnom i mobilnom fazom razlikuje se vreme zadržavanja razdvojenih komponenata unutar kolone. Jedinjenja se stoga eluiraju sa kolone određenim redosledom, nakon čega, u različito vreme, dospevaju do detektora. Za efikasno eluiranje svih komponenata i postizanje optimalne rezolucije, od izuzetne važnosti je primena gradijentnih elucionih sistema što podrazumeva programirano menjanje sastava mobilne faze tokom analize. U detektoru se generiše signal proporcionalan određenoj osobini eluirane supstance; a zatim se dalje, na osnovu podataka dobijenih sa detektora, pomoću računara vrši proračun i dobija grafički prikaz rezultata. programirano menjanje sastava mobilne faze tokom razdvajanja.

Razvoj UPLC tehnike vezan je za početak XXI veka. Ona zapravo predstavlja naprednu verziju do tada najčešće primenjivane tehnike hromatografije na koloni, visokoeфикаsne tečne hromatografije (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Novi nivo u performansama, u poređenju sa HPLC metodom, postignut je unapređenjem tehnologije kolona korišćenjem sorbenta manje veličine čestica ( $< 2 \mu\text{m}$ ) i razvojem instrumentacije koja omogućava primenu višeg pritiska unutar sistema koji iznosi i do 1000 bara, što za posledicu ima povećanu rezoluciju, smanjeno ukupno vreme razdvajanja i veću osetljivost. Potrošnja rastvarača je takođe znatno smanjena u poređenju sa HPLC metodom. Još jedna prednost UPLC metode ogleda se u pogodnosti povezivanja tečnog hromatografa sa masenim spektrometrom (mass spectrometry, MS) čime je omogućeno dodatno razdvajanje i identifikacija specifičnih jedinjenja i grupa jedinjenja, određivanje strukture složenih

jedinjenja, kao i kvantifikacija ekstremno niskih koncentracija poznatih jedinjenja (Reuhs 2017; Lozano-Sánchez et al. 2018).

Danas su komercijalno dostupni maseni spektrometri različitih konfiguracija, međutim postoje tri glavna segmenta koji su zajednički svim masenim spektrometrima. Tu su: 1) jonski izvor, u kojem se generišu joni analita u gasovitoj fazi; 2) analizator mase (nalazi se u polju visokog vakuuma), u kojem se vrši razdvajanje nastalih jona na osnovu parametra koji predstavlja odnos njihove mase i naelektrisanja ( $m/z$  vrednost) i specifičan je za svaki molekul; 3) detektor jona.

*LTQ OrbiTrap XL* predstavlja hibridni maseni spektrometar koji kombinuje analizator sa linearnom jonskom zamkom i elektrostatički orbitrap analizator visoke rezolucije (Slika 15). Nakon generisanja u jonskom izvoru, joni najpre dospevaju u linearnu jonsku zamku (set kvadrupolnih šipki spojenih na svakom kraju čime je olakšano hvatanje jona) odakle se aksijalno izbacuju, najpre u ćeliju za skladištenje u obliku slova C, a zatim u orbitrap, u kojem se hvatanje jona ostvaruje uz pomoć električnog polja generisanog pomoću unutrašnje vretenaste elektrode i spoljašnje elektrode nalik buretu. Orbitrap hvata jone na orbitama oko vretenaste elektrode. Joni se istovremeno kreću aksijalno duž unutrašnje elektrode, pri čemu nastaju harmonične oscilacije sa frekvencijom obrnuto proporcionalnom  $m/z$  vrednosti, i indukuju struju koja se detektuje na zidu spoljašnje elektrode. Signali se zatim, Furijeovom transformacijom, pretvaraju u frekventni spektar i na kraju u maseni spektar (Makarov 2000; Hu et al. 2005).



**Slika 15.** Shematski prikaz Orbitrapa ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com))

Reverzno-fazna tečna hromatografija u kombinaciji sa tandemnom masenom spektrometrijom je pogodna metoda za identifikaciju i kvantifikaciju polifenolnih jedinjenja iz pčelinjih proizvoda u kojima su data jedinjenja prisutna u obliku složenih smeša. Na osnovu retencionih vremena eluiranih komponenata smeše mogu se dobiti određene strukturne informacije. Poznato je, na primer, da glikozilovanje povećava polarnost flavonoida, a samim tim i njihovu mobilnost u reverzno-faznom sistemu. Acilovanje i metilovanje pak izazivaju suprotan efekat, a na retenciono vreme takođe utiče i položaj datih funkcionalnih grupa. Flavonoidni glikozidi se eluiraju sledećim redosledom: rutinozidi prethode neohesperidozidima, galaktozidi prethode glukozidima; glukozidi prethode arabinozidima, a arabinozidi ramnozidima. Takođe treba uzeti u obzir činjenicu da položaj vezivanja šećerne komponente za aglikon može imati uticaj na zadržavanje na koloni. Kada je u pitanju redosled eluiranja različitih klasa flavonoida (za jedinjenja sa ekvivalentnim obrascem supstitucije) redosled je sledeći: flavanoni, flavonoli, flavoni. Redosled eluiranja derivata hidroksicimene kiseline je: kofeinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, sinapinska kiselina, ferulinska kiselina i cimetna kiselina;

dok se derivati benzoeve kiseline eluiraju sledećim redosledom: galna kiselina, protokatehuinska kiselina, vanilinska kiselina i siringinska kiselina (M. G. Campos et al. 2021).

Povezivanjem tečnog hromatografa sa masenim spektrometrom koji, u datom slučaju, ima ulogu detektora, prevaziđeni su neki od problema (koeluiranje, slični UV/Vis spektri, odsustvo hromofora u jedinjenjima od značaja) za koje konvencionalna HPLC metoda sa UV/Vis detekcijom, kao najčešće primenjivana za analizu polifenolnih jedinjenja pčelinjeg polena, nije imala rešenje. Dodatni napredak postignut je primenom hibridnih masenih spektrometara koji omogućavaju punu strukturnu karakterizaciju eluiranih polifenolnih jedinjenja. Na ovaj način se tehnikom tandemne masene spektrometrije postiže dodatna fragmentacija jona od interesa (proces se može ponavljati više puta što se označava kao MS<sup>n</sup>), koja pruža i dodatne strukturne informacije od značaja za identifikaciju polifenola, kao na primer: tačke vezivanja supstituenata za aglikon, tipovi ugljenih hidrata (mono-, di-, tri- ili tetrasaharidi i heksoze, deoksiheksoze ili pentoze) vezanih za aglikon, vrsta interglikozidne veze i drugo (M. G. Campos et al. 2021; Tešević 2013). Metoda elektrosprej jonizacije (*Electrospray ionization*, ESI) pokazala se kao pogodna za dobijanje pomenutih važnih strukturnih informacija i kao kontinualna jonizaciona metoda pruža mogućnost povezivanja tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. Spada u tehnike meke jonizacije i generalno se koristi za analizu polarnih jedinjenja koja se nalaze jonizovana u LC eluentu. Proces elektrospreja obuhvata faze nastajanja i smanjenja kapljica, iz kojih, nakon isparavanja molekula rastvarača i Kulonove eksplozije, nastaju joni u gasovitoj fazi koji se dalje usmeravaju u maseni analizator (Tešević 2013). Za potrebe ove doktorske disertacije primenjena je tehnika elektrosprej jonizacije uz zagrevanje (*Heated Electrospray Ionisation*, HESI) koje dodatno pospešuje desolvataciju. Mogu se primenjivati i pozitivna i negativna jonizacija. Najveću osetljivost u analizi flavonoida obezbeđuje režim negativnih jona. Na efikasnost jonizacije, a samim tim i na strukturne informacije, značajno utiče i sistem eluenata. Mravlja kiselina, kao aditiv kompatibilan sa LC-MS zbog svoje isparljivosti, često se koristi jer poboljšava hromatografsko razdvajanje i oblike pikova, ali takođe izaziva blage negativne efekte na efikasnost jonizacije (M. G. Campos et al. 2021; W. Clarke 2017).

Na osnovu brojnih istraživanja, kojima su analizirani fragmentacioni obrasci polifenolnih jedinjenja primenom LC-MS tehnike, sumiran je veliki broj pravila koja se mogu primeniti za tumačenje novodobijenih spektralnih podataka. Na ovaj način je moguće izvršiti strukturnu karakterizaciju nepoznatih jedinjenja, čak i bez primene referentnih standarda. Detaljan opis LC-MS metode, kojim je obuhvaćena celokupna instrumentacija kao i vrednosti svih neophodnih parametara i uslova određivanja fenola iz pčelinjeg polena, naveden je u našem radu pod naslovom "Određivanje fenolnog profila ekstrakata pčelinjeg polena pomoću LC i LC/MS" (eng. *Determination of phenolic profile of bee pollen extracts by LC and LC/MS*) objavljenom u okviru revijalnog rada zajedno sa ostalim standardnim metodama analize pčelinjeg polena (M. G. Campos et al. 2021).

### 2.3.5.2 Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC)

Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija (*High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC) je savremena instrumentalna tehnika. Predstavlja unapređenu verziju tankoslojne hromatografije (*Thin-Layer Chromatography*, TLC), pri čemu za obe metode važi isti princip razdvajanja komponenata smeše. HPTLC je podvrsta tečne hromatografije, tzv. planarna hromatografija, odnosno hromatografija na ravnoj površini. Kao i ostale hromatografske metode, predstavlja višestepeni proces raspodele supstanci između stacionarne i mobilne faze. U slučaju HPTLC, stacionarna faza je u vidu tankog sloja sorbenta (silika gel, hemijski modifikovan silika gel, aluminijum-oksidi ili neka druga čvrsta porozna supstanca) fiksirana za ravnu podlogu koja može biti staklena, metalna ili plastična, dok je mobilna faza tečna. Već pomenuti kriterijumi za izbor sorbenta kod hromatografije na koloni, važe i u slučaju HPTLC metode. Mobilna faza (razvijač) kapilarnim

silama prolazi kroz adsorbens (horizontalno ili vertikalno) i “nosi” komponente smeše (nanete na jedan kraj ravne ploče) u smeru protoka. U zavisnosti od jačine interakcija analita sa stacionarnom/mobilnom fazom, tokom vremena dolazi do razdvajanja komponenta smeše usled njihove različite brzine kretanja kroz sloj sorbenta. U zavisnosti od vrste sorbenta i mobilne faze, moguće je razdvajanje primenom normalno-faznog ili reverzno-faznog hromatografskog sistema. U uslovima normalno-fazne hromatografije dolazi do raspodele analizirane supstance između izrazito polarne stacionarne faze i manje polarne mobilne faze, dok se u slučaju reverzno-faznog hromatografskog sistema raspodela analita vrši između nepolarne stacionarne faze i polarne mobilne faze. Za potrebe ove disertacije korišćena je uzlazna tehnika razvijanja u staklenoj hromatografskoj kadi (Slika 16) primenom oba sistema razdvajanja (NP i RP). U trenutku kada mobilna faza dostigne željeni put (front rastvarača), ploča se uklanja iz posude i suši, nakon čega sledi identifikacija razdvojenih hromatografskih zona čiji se položaj opisuje pomoću  $R_F$  vrednosti (retardacioni faktor).  $R_F$  vrednost predstavlja odnos pređenog puta analizirane supstance (rastojanje od mesta nanošenja, odnosno polazne mrlje, do težišta hromatografske zone) i pređenog puta rastvarača (od mesta nanošenja do fronta rastvarača). Identifikacija nepoznate supstance može se izvršiti tako što se na istu ploču nanese i standard ili smeša standarda (sa određenom, poznatom  $R_F$  vrednošću). Nakon razvijanja hromatograma, poređenjem dobijenih  $R_F$  vrednosti može se zaključiti koje nepoznato jedinjenje je u pitanju.



**Slika 16.** Kada za uzlaznu tankoslojnu hromatografiju

Prilikom analize obojenih supstanci hromatografske zone se lako uočavaju. Međutim, kada je potrebno izvršiti analizu bezbojnih supstanci neophodna je primena različitih fizičkih, hemijskih ili bioloških metoda u cilju njihove vizualizacije. Metoda hemijske vizualizacije koja podrazumeva primenu 2-aminoetil-estra difenilborne kiseline (Neuov reagens) i polietilenglikola, zbog svoje selektivnosti pogodna je za primenu u analizi polifenolnih jedinjenja u pčelinjim proizvodima. Primena datih reagenasa omogućava uočavanje narandžastih i plavih zona prilikom posmatranja hromatograma pod UV lampom pri talasnoj dužini od 366 nm. Ovakav vizuelan način detekcije pogodan je za kvalitativnu analizu. Kvantitativno određivanje podrazumeva određivanje koncentracije analizirane supstance na osnovu njene povezanosti sa karakteristikama hromatografskih zona, kao što su njihove dužine, površine, intenzitet boje. Određivanje datih parametara može se izvršiti denzitometrijski pomoću TLC skenera, dok se dodatne informacije o strukturi analiziranih supstanci takođe mogu dobiti povezivanjem HPTLC metode sa drugim savremenim instrumentalnim tehnikama, kao što je, na primer, masena spektrometrija.

Napredak u oblasti razvoja sofisticirane instrumentacije, upotreba komercijalno dostupnih slojeva adsorbentata visokih performansi (garantovanog od strane proizvođača sastava i uniformnosti), omogućili su bolju rezoluciju i nižu granicu detekcije, što je dovelo do primene HPTLC metode u brojnim oblastima (farmaceutskoj industriji, biohemiji, forenzičkoj hemiji, analizi

hrane i životne sredine) ravnopravno sa HPLC i gasnom hromatografijom (Attimarad et al. 2011). Sa aspekta analize složenih prirodnih prehrambenih proizvoda, kao što su pčelinji proizvodi, uočene su brojne prednosti HPTLC u poređenju sa drugim metodama. Pored toga što je jednostavna i relativno jeftina analitička tehnika, HPTLC je pogodna za istovremenu analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom roku. Takođe, mogućnost “ekstrahovanja” informacija iz hromatograma (analizom slike) čija se obrada dalje vrši različitim hemometrijskim metodama, primenjuje se u cilju procene parametara kvaliteta proizvoda i provere njihove usklađenosti sa specifikacijom kvaliteta. Poslednjih godina broj objavljenih radova iz oblasti primene HPTLC metode u analizi pčelinjih proizvoda je u porastu (D. M. Milojković-Opsenica et al. 2022).

### **2.3.6 Priprema slike hromatograma za statističku analizu**

Hromatogram, dobijen primenom HPTLC metode, predstavlja skup markiranih zona u kojima su sadržane informacije o brojnim karakteristikama (hemijskim i fizičkim) ispitivanih supstanci. Proces obrade hromatografskih podataka podrazumeva njihovo prevođenje u oblik pogodan za dalju multivarijantnu analizu. Početna faza ovog procesa obuhvata dokumentovanje hromatograma u cilju dobijanja slike u digitalnom obliku i njenu dalju obradu, što će u nastavku biti detaljnije opisano.

Digitalna slika hromatograma generiše se pomoću uređaja koji u sebi sadrže kameru visoke rezolucije poput DigiStore 2 uređaja, specijalizovog za primenu u tankoslojnoj hromatografiji ili kamere za snimanje, kao jeftinije alternative. Slike se čuvaju u TIF (eng. *Tagged Image File Format*) grafičkom formatu, čime je omogućeno njihovo deljenje putem računarske tehnologije i dalje uređivanje bez gubitka kvaliteta usled kompresije. TIF format je podržan od gotovo svih programa i aplikacija za obradu slike (Note 2011). U okviru ove disertacije, prevođenje slike iz TIF formata u matricu podataka (pogodnu za dalju statističku analizu) izvršeno je primenom ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) programa. ImageJ je besplatno dostupan softver prilagođen obradi digitalnih slika, za akviziciju signala i njihovu analizu. Nudi mogućnost označavanja različitih oblika na slikama, njihovo izrezivanje i rotaciju, a takođe i merenje određenih parametara kao što su: srednja vrednost, standardna devijacija, minimum ili maksimum intenziteta piksela. Slika se može podeliti na crveni, zeleni i plavi kanal (*red, green, blue, RGB*) u cilju povećanja selektivnosti. U slučaju kada su zone iste boje, hromatogram se može prevesti u sivu skalu. Kvalitet slike se dodatno može poboljšati izoštravanjem ivica, uklanjanjem šuma, podešavanjem osvetljenosti i kontrasta. ImageJ omogućava grafičko prikazivanje profila a dobijeni podaci se mogu izvesti u bilo koji program za tabelarne proračune u cilju dalje obrade (Ristivojević et al. 2020).

Multivarijantnoj analizi prethodi dodatna obrada sirovih podataka dobijenih iz hromatograma, koja obuhvata poravnavanje, normiranje i centriranje podataka, a može biti izvršena pomoću algoritama implementiranih u softveru PLS ToolBox u okviru MATLAB paketa. U slučaju međusobnog pomeranja hromatografskih zona/traka, nastalih promenom eksperimentalnih uslova u toku rada (fluktuacija temperature i vlažnosti, nedovoljno zasićenje kade parama mobilne faze, razika u sastavu mobilne faze, neefikasno sušenje zona, greška instrumenta ili slučajna greška) neophodno je izvršiti tzv. poravnanje signala. Primenom procedure poravnanja (eng. *warping procedure*) kao što je korelacija optimizacije savijanja (eng. *Correlation Optimized Warping, COW*) vrši se pomeranje  $R_F$  vrednosti traka koje odsupaju i njihovo usklađivanje sa drugim uzorcima na istoj ili različitim pločama. Dokazano je da je ovo ključni korak za konstrukciju modela u okviru dalje multivarijantne analize podataka (Ristivojević et al. 2020). Normiranje, centriranje i skaliranje su procedure koje je poželjno izvesti jer potencijalno utiču na statističke modele. Standardna normalna promenljiva (eng. *Standard Normal Variate, SNV*) je uobičajena tehnika normiranja, čijom primenom se eliminišu neželjeni efekti nastali usled razlike u količini uzorka nanetog na stacionarnu fazu. Skaliranje podrazumeva oduzimanje srednje vrednosti spektra i skaliranje sa standardnom devijacijom spektra,

i primenjuje se na svaki spektar pojedinačno. Centriranje se svi podaci svode na istu jedinicu i može se vršiti u odnosu na prosečan intenzitet signala (eng. *mean centering*) ili u odnosu na medijanu (eng. *median centering*). U slučaju kada su sve promenljive od značaja za klasifikaciju izražene u istim jedinicama, preporučuje se primena opcije centriranja u odnosu na srednju vrednost (Ristivojević et al. 2020).

### **2.3.7 Obrada rezultata primenom statističkih metoda**

Nakon kontinualnog prikupljanja podataka tokom izvođenja eksperimenata, vrši se njihova matematičko-statistička obrada, analiza, prezentacija i interpretacija u cilju donošenja određenih zaključaka. Deo statističke analize koji podrazumeva numeričko opisivanje podataka poznat je pod nazivom deskriptivna statistika. Primenom deskriptivne statističke metode vrši se sistematizacija i uređivanje eksperimentalnih rezultata čime oni postaju pregledniji i dostupni za dalju statističku analizu. U cilju pleglednijeg i uočljivijeg praćenja određene pojave rezultati se mogu prikazati i grafički, u obliku histograma ili poligona. Određene karakteristike dobijenih eksperimentalnih rezultata mogu se opisati pomoću parametara u koje spadaju mere centralne tendencije (aritmetička sredina, geometrijska sredina, harmonijska sredina, moda i medijana) i mere disperzije, odnosno rasipanja (interval varijacije, varijansa, standardna devijacija, koeficijent varijacije) (Andrić and Trifković 2023).

Inferencijalnom statistikom su obuhvaćeni postupci koji omogućavaju testiranje postavljenih istraživačkih hipoteza, odnosno zaključivanje. Odluka o prihvatanju ili odbacivanju postavljene hipoteze, uz određen stepen verovatnoće (nivo značajnosti), donosi se na osnovu rezultata sprovedenih parametrijskih ili neparametrijskih statističkih testova. Ukoliko podaci podležu normalnoj (Gausovoj) raspodeli i iskazuju homogeni varijabilitet primenjuju se parametrijski statistički testovi, dok se, u suprotnom, biraju neparametrijski testovi. Primena neparametrijskih testova nije uslovljena određenim tipom raspodele podataka, te su pogodni, između ostalog, za poređenje uzoraka poreklom iz različitih populacija. Osnovni nedostaci neparametrijskih metoda su manja preciznost i kompleksnija interpretacija rezultata u poređenju sa analognim parametrijskim metodama. Prilikom statističke obrade rezultata u okviru ove doktorske disertacije korišćen je uporedni *t*-test (eng. *paired t-test*) izveden primenom Microsoft Excel programa. Takođe je sprovedena i analiza varijanse (eng. *ANalysis Of Variance*, ANOVA), linearna regresija, kao i Fišerov LSD test (eng. *Least Significant Difference*), u okviru NCSS softverskog paketa.

Navedene univarijantne statističke metode analize (opisivanje mere centralne tendencije i disperzije jedne varijable) su jednostavne za izvođenje ali je njihova statistička snaga ograničena. U naučnim istraživanjima, takođe, postoji potreba za simultanom analizom međuzavisnosti koje postoje između tri ili više promenljivih, što se uspešno rešava primenom metoda multivarijantne analize. Širokoj primeni multivarijantne analize u različitim naučnim oblastima umnogome je doprineo razvoj računarske tehnike i softverskih proizvoda (Kovačić 1998). Prilikom tumačenja eksperimentalnih rezultata svakako se preporučuje primena obe vrste statističkih metoda (univarijantna i multivarijantna) u cilju donošenja konačnih zaključaka.

Analiza glavnih komponentata (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) je metoda multivarijantne analize koja omogućava smanjenje dimenzije skupa podataka, sačinjenog od velikog broja uzajamno korelisanih varijabli, uz istovremeno maksimalno moguće zadržavanje varijabiliteta prisutnog među podacima. To se postiže formiranjem niza novih ortogonalnih latentnih varijabli (glavne komponente) koje su linearne kombinacije originalnih varijabli. Prva glavna komponenta se konstruiše tako da obuhvata najveći deo varijanse originalnog skupa podataka. Svaka naredna glavna komponenta obuhvata deo varijanse originalnog skupa podataka koji nije prethodno obuhvaćen. PCA

se zasniva na pretpostavci da će nekoliko glavnih komponenata (znatno manji broj u odnosu na broj originalnih varijabli) biti dobra aproksimacija kovarijacione strukture skupa originalnih promenljivih (Trifković 2013). Na ovaj način postiže se smanjenje dimenzije originalnog skupa podataka a takođe i olakšava njegova interpretacija. Za lakše uočavanje grupisanja uzoraka na osnovu određenih parametara kao i za uočavanje prisustva spoljašnjih vrednosti od velikog značaja je grafičko predstavljanje rezultata PCA analize u obliku grafika skorova dve (najčešće prve dve, PC1 i PC2) komponente (dvodimenzionalna zavisnost); dok se za identifikaciju varijabli koje najviše utiču na grupisanje, odnosno pozicioniranje uzoraka na grafiku skorova, koristi grafik vektora koeficijenata latentnih varijabli (eng. *loading vector*).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 Reagensi i standardi

Acetonitril i mravlja kiselina (obe MS stepena čistoće), metanol (HPLC stepena čistoće), natrijum-karbonat, hlorovodonična kiselina, toluen, etil-acetat, polietilen glikol 4000 (PEG), natrijum-hlorid, natrijum-hidroksid, natrijum-acetat i Folin–Čikalteu reagens su kupljeni od *Merck-a* (Darmstadt, Nemačka). Galna kiselina je nabavljena od proizvođača *Acros organics* (Geel, Belgija). Apsolutni etanol i mravlja kiselina su nabavljeni od firme *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija). Troloks standard, skrob, jod, 5-hidroksimetil-2-furaldehid (HMF) standard, 2-aminoetildifenilborinat (NTS) i standardi polifenolnih jedinjenja (rutin, hiperozid, astragalin, hlorogena kiselina, kofeinska kiselina, galna kiselina i ferulinska kiselina) kupljeni su od *Sigma Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim, Nemačka) dok su 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i standardi flavonoida (miricetin, naringenin, hrizin i galangin) kupljeni od proizvođača *Fluka AG* (Buhs, Švajcarska). Standardi šećera (glukoza (Glc), fruktoza (Fru), saharoza (Sac)) nabavljeni su od *TCI Europe N.V.* (Zwijndrecht, Belgija). Sve hemikalije, za koje nije prethodno bilo naglašeno drugačije, bile su analitičkog stepena čistoće. Ultračista voda (električne provodljivosti 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) korišćena za pripremu ekstrakata, standardnih rastvora i razblaženja, dobijena je pomoću *TKA MicroPure* (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) sistema za prečišćavanje vode.

Filteri za špricave sa politetrafluoroetilenskom (PTFE) membranom (13 mm, 0,45  $\mu\text{m}$ ) kupljeni su od firme *Supelco* (Bellefonte, PA, SAD). Kertridži za čvrsto-tečnu ekstrakciju Chromabond C18-ec (500 mg/6 mL) nabavljeni su od kompanije *Macherei-Nagel GmbH & Co. KG* (Düren, Nemačka). HPTLC silika gel staklene ploče veličine 20 cm  $\times$  10 cm (kat. br. 1.05642) i 10 cm  $\times$  10 cm (kat. br. 1.05628), i TLC silika gel aluminijske ploče veličine 20 cm  $\times$  20 cm (kat. br. 1.05559) kupljene su od *Merck KGaA* (Nemačka).

#### 3.2 Uzorci pčelinjeg polena i meda

Ovim istraživanjem obuhvaćena su ukupno 32 uzorka pčelinjeg polena i tri uzorka meda. Svi prikupljeni uzorci potiču sa teritorije Srbije. Prvi deo istraživanja posvećen je analizi 24 uzoraka pčelinjeg polena (označenih brojevima od **1** do **24**) obezbeđenih od strane Saveza pčelarskih organizacija Srbije (SPOS) ([www.spos.info](http://www.spos.info)). Ostali uzorci pčelinjeg polena (**P1** - **P8**) i tri uzorka meda (med od bagrema (**B**), med od suncokreta (**S**), livadski med (**L**)) otkupljeni su od lokalnih pčelara. Biljno poreklo uzoraka meda utvrđeno je na osnovu podataka dobijenih od pčelara i njegovim senzornim karakteristikama. Uzorci meda su do analize čuvani na temperaturi od 4 °C, dok je pčelinji polen čuvan na temperaturi od -20 °C.

##### 3.2.1 Priprema mešavina pčelinjeg polena i meda

Uzorci pčelinjeg polena su, pre pripreme smeša sa medom i ekstrakcije, najpre samleveni kuhinjskim mlinom (Bosch TSM6A017C, Minhen, Nemačka). Smeše pčelinjeg polena i meda pripremane su na sledeći način: svakom uzorku meda dodat je svaki uzorak pčelinjeg polena, tako da udeo polena u dobijenim mešam iznosi 20%, odnosno 30% (Tabela 4). Zatim je, mehaničkim mešanjem, izvršena homogenizacija pripremljenih smeša. Na ovaj način dobijeno je 48 uzoraka mešavina polena i meda koji su čuvani na temperaturi od 4 °C do dalje analize.



Slika 17. Uzorak pčelinjeg polena, meda i smeše polena i meda

Tabela 4. Oznake uzoraka mešavina meda i polena

| Vrsta mešavina  | Med od bagrema + uzorci pčelinjeg polena (P1-P8) (20%) | Med od bagrema + uzorci pčelinjeg polena (P1-P8) (30%) | Med od suncokreta + uzorci pčelinjeg polena (P1-P8) (20%) | Med od suncokreta + uzorci pčelinjeg polena (P1-P8) (30%) | Livadski med + uzorci pčelinjeg polena (P1-P8) (20%) | Livadski med + uzorci pčelinjeg polena (P1-P8) (30%) |
|-----------------|--|--|---|---|--|--|
| Oznake mešavina | B1/1   | B2/1   | S1/1  | S2/1  | L1/1   | L2/1   |
|                 | B1/2   | B2/2   | S1/2  | S2/2  | L1/2   | L2/2   |
|                 | B1/3   | B2/3   | S1/3  | S2/3  | L1/3   | L2/3   |
|                 | B1/4   | B1/4   | S1/4  | S2/4  | L1/4   | L2/4   |
|                 | B1/5   | B1/5   | S1/5  | S2/5  | L1/5   | L2/5   |
|                 | B1/6   | B1/6   | S1/6  | S2/6  | L1/6   | L2/6   |
|                 | B1/7   | B1/7   | S1/7  | S2/7  | L1/7   | L2/7   |
|                 | B1/8   | B1/8   | S1/8  | S2/7  | L1/8   | L2/8   |

### 3.2.2 Palinološka analiza uzoraka pčelinjeg polena

Biljno poreklo uzoraka pčelinjeg polena (1 - 24) utvrđeno je palinološkom analizom realizovanom u Laboratoriji za palinologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, prema metodi opisanoj od strane autora Barth i saradnika, dodatno razrađenom i prilagođenom u odnosu na količinu uzorka od strane autora Kostića i saradnika (Barth et al. 2010; Kostić, Barać, et al. 2015).

Odmerenih 0,5000 g uzorka preliveno je sa 15 cm<sup>3</sup> etanola (96%, v/v) i ostavljeno da stoji 24 h. Uzorci su zatim držani u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (pri 2000 obrtaja u minuti), u trajanju od 3 minuta, supernatant je odvojen i postupak je ponavljan do dobijanja homogene suspenzije. Nerastvorni ostatak je zatim suspendovan u 20 cm<sup>3</sup> destilovane vode. Jedna kap dobijene suspenzije, naneta između dve staklene pločice za mikroskopiranje, prekrivena je slojem smeše glicerola, želatina, fenola, destilovane vode i baznog fuksina. Posmatranjem pod mikroskopom, uz uvećanje od 400 puta, polenova zrna su identifikovana korišćenjem referentnih slajdova i atlasa.

### 3.2.3 Određivanje fizičko-hemijskih parametara uzoraka meda

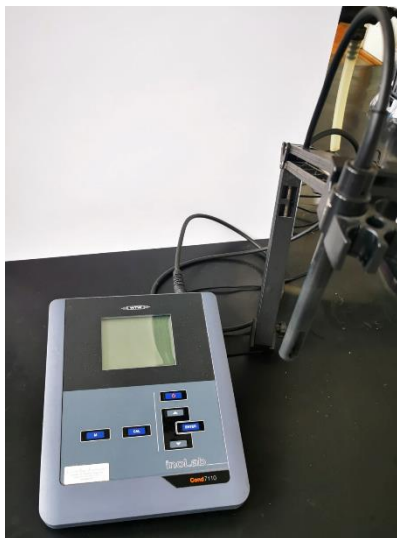
Fizičko-hemijski parametri uzoraka meda analizirani su prema Harmonizovanim metodama Međunarodne komisije za med (Harmonised methods of the International Honey Commission <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>).

**Sadržaj vode u medu** (vlaga) određen je refraktometrijski pomoću uređaja ATAGO Automatic Digital Refractometer RX-7000 $\alpha$  (Atago Co. Ltd., Tokio, Japan) (Slika 18). Metoda je zasnovana na principu promene indeksa refrakcije ( $\eta$ ) u zavisnosti od sadržaja vlage. Sadržaj vlage u uzorku meda dobijen je upoređivanjem vrednosti očitano g indeksa refrakcije ( $\eta$ ) sa referentnim vrednostima standarda. Sva merenja su obavljena pri temperaturi od 20 °C.



Slika 18. Refraktometar

**Električna provodljivost**, definisana kao provodljivost vodenog rastvora meda (20% u odnosu na suvi uzorak meda) na temperaturi od 20 °C, izmerena je pomoću uređaja Jenwai Conductivity Meter 4310 (Jenwai, Stone, UK) (Slika 19 a). Rezultati određivanja izraženi su u milisimensima po centimetru (mS/cm).



a

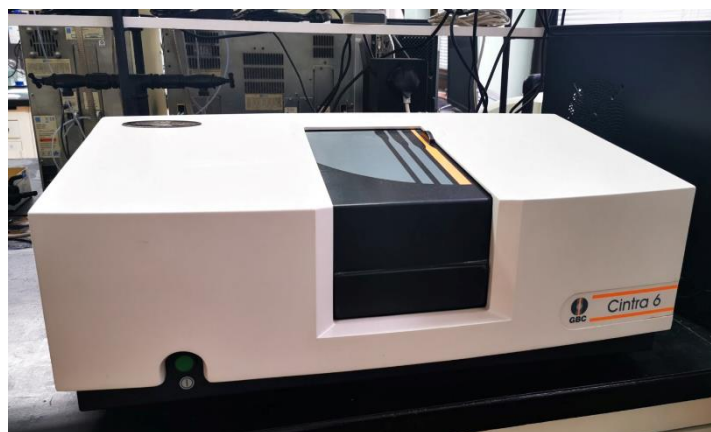


b

Slika 19. Konduktometar (a) i titrator (b)

**Slobodna kiselost**, definisana kao sadržaj svih slobodnih kiselina, određena je volumetrijskom metodom, primenom uređaja 716 DMS Titrino, *Metrohm* (Slika 19 b). Kiselinske komponente su neutralisane standardnim rastvorom natrijum-hidroksida u vodenom rastvoru meda (10 g meda u 75 cm<sup>3</sup> destilovane vode). Rezultati su izraženi kao miliekvivalenti/kg meda.

**Aktivnost dijastaze** je određena korišćenjem spektrofotometra Cintra 6 (*GBC Scientific Equipment Ltd.*, Dandenong, Australija) (Slika 20). Na rastvor skroba, standardizovan rastvorom joda, delovao je enzim iz uzorka. Smanjenje intenziteta plave boje, nastalo u reakciji skroba i joda, mereno je u određenim vremenskim intervalima pod standardnim uslovima. Parametri linearne zavisnosti apsorbancije u funkciji od vremena, koriste se za određivanje vremena  $t_x$  koje je potrebno za postizanje specifične apsorbancije čija je vrednost 0,235. Dijastazni broj (DN) je izračunat iz formule  $300/t_x$ .



Slika 20. Spektrofotometar

**Sadržaj 5-hidroksimetilfurfurala (HMF)** je određen u vodenom rastvoru meda metodom reverzno-fazne visokoefikasne tečne hromatografije (RP HPLC) sa UV detekcijom. Korišćenjen je HPLC sistem koji se sastoji od Waters 1525 binarne pumpe i UV-Vis detektora Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Slika 21). Razdvajanje je izvršeno na koloni Zorbax Eclipse Plus C18, dimenzija 4,5 mm  $\times$  150 mm, sa veličinom čestica od 5  $\mu$ m. Sprovedeno je izokrasko eluiranje. Kao mobilna faza korišćena je smeša voda / metanol (90:10, v/v) pri brzini protoka od 1 mL/min. HMF je detektovan i kvantifikovan na talasnoj dužini od 285 nm korišćenjem kalibracione krive HMF standarda, opsega koncentracija od 1 - 15 mg/L. Sadržaj HMF se izračunava poređenjem površine pika odgovarajućeg standardnog rastvora HMF-a poznate koncentracije i rastvora uzorka. Postoji linearna zavisnost između koncentracije i površine pika HMF-a. Rezultat određivanja izražava se u miligramima HMF-a po kilogramu uzorka (mg/kg).



Slika 21. Sistem za HPLC

**Sadržaj pojedinačnih šećera** (glukoze, fruktoze, saharoze) određen je primenom visokoeфикаsne anjonoizmenjivačke hromatografije (HPAEC) sa pulsno-amperometrijskom detekcijom (PAD). Korišćen je DIONEX ICS 3000 DP (*Dionex*, Sunnyvale, CA, USA) sistem za tečnu hromatografiju opremljen kvaternarnom gradijentnom pumpom (*Dionex*) (Slika 22). Odvajanje ugljenih hidrata izvršeno je na Carbo Pac®PA100 pelikularnoj anjon-izmenjivačkoj koloni (4 × 250 mm, veličina čestica - 8,5 mm, veličina pora - mikroporozni, <math><10 \text{ \AA}</math>, (*Dionex*)) na temperaturi od 30 °C pod uslovima gradijentnog eluiranja opisanim u radu Krstić i saradnika (Krstić et al. 2022). Dobijeni rezultati izraženi su kao miligrami datog šećera u 100 g uzorka meda (mg / 100 g).



Slika 22. Sistem za jonsku hromatografiju

### **3.3 Priprema ekstrakata**

Svi uzorci, odmerene mase 1,0000 g, ekstrahovani su u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 h, pomoću 10 cm<sup>3</sup> smeše metanol / voda zakišeljene sa 0,1 cm<sup>3</sup> mravlje kiseline (5%), 7:3, v / v. Suspenzije su zatim centrifugirane pri 4500 rpm. Supernatant je dekantovan i reekstrakcija čvrstog ostatka je ponovljena još dva puta. Ekstrakti su objedinjeni a zatim upareni do suva pod vakuumom pri temperaturi od 40 °C. Suvi ostatak je dalje tretiran u zavisnosti od metode primenjene za dalju analizu.

#### **3.3.1 Ekstrakti za mikrobiološku analizu**

Nakon uparavanja, suvi ostatak je, za potrebe mikrobiološke analize, rastvoren u smeši metanol / voda (1:1, v / v). Masa suvog ostatka određena na osnovu razlike u masi praznog balona (neposredno pre uparavanja ekstrakta) i balona nakon uparavanja. Koncentracije uzoraka nakon rastvaranja iznosile su približno 100 mg suvog ostatka u 5 cm<sup>3</sup> rastvarača (metanol / voda, 1:1, v / v).

#### **3.3.2 Ekstrakti za UHPLC-MS, HPTLC i spektrofotometrijske testove**

Suvi ostatak, dobijen uparavanjem početnog ekstrakta, je rastvorom hlorovodonične kiseline koncentracije 0,1% razblažen do konačne zapremine od 10 cm<sup>3</sup>. U cilju dalje analize metodama tečne hromatografije izvršeno je dodatno koncentrovanje i prečišćavanje polifenolne frakcije (uklanjanje potencijalno prisutnih šećera i ostalih polarnih supstanci) primenom čvrsto-tečne ekstrakcije prema proceduri opisanoj u literaturi (Stanković 2012). SPE kertridži su najpre aktivirani propuštanjem 3 cm<sup>3</sup> metanola a zatim i 9 cm<sup>3</sup> ultračiste vode. Nanošenje ekstrakata (2 cm<sup>3</sup>) izvršeno je bez primene vakuuma, nakon čega je polarna frakcija eluirana ultračistom vodom (6 cm<sup>3</sup>). Eluiranje polifenolne frakcije izvršeno je sa 1,5 cm<sup>3</sup> metanola (0,1% zakišljen sa HCl). Koncentracija dobijene metanolne frakcije je podešavana u zavisnosti od specifičnih potreba metoda primenjenih za dalju analizu, kako je opisano u nastavku.

Za potrebe UHPLC–LTQ Orbitrap MS analize, metanolna frakcija je razblažena (1:10, v / v) smešom acetonitril / voda (1:1, v / v) i pre injektovanja procedena kroz 0,45 µm PTFE špic-filtre.

Ekstrakti razblaženi do zapremine od 5 cm<sup>3</sup> metanola korišćeni su za HPTLC analizu. U cilju upoređivanja HPTLC polifenolnih profila različitih vrsta uzoraka pripremljeni su primenom iste procedure, ekstrakti tri uzorka meda (Bc, Sc, Lc) čija je početna masa bila 50 g. Svi metanolni ekstrakti čuvani su na temperaturi od -20 °C i pre dalje analize procedeni kroz µm PTFE špic-filtre. Za određivanje TPC i RSA metanolni rastvori pčelinjeg polena razblaženi su trideset puta, dok su ekstrakti mešavina pčelinjeg polena i meda razblaženi 10 puta.

##### **3.3.2.1 Priprema smeše standardnih rastvora polifenolnih jedinjenja**

Metanolna smeša standardnih rastvora polifenolnih jedinjenja pripremljena je u sledećim konačnim koncentracijama: galangin (50 ng/µL); hlorogena kiselina, miricetin, hrizin i kofeinska kiselina (100 ng/ µL); galna kiselina, ferulinska kiselina i naringenin (200 ng/ µL).

### 3.4 Spektrofotometrijske metode

#### 3.4.1 Određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja ekstrakata pčelinjeg polena, meda i smeša pčelinjeg polena i meda

Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja (TPC) je određen, neznatno modifikovanom, spektrofotometrijskom, Folin-Čikalteu metodom, prethodno opisanom u literaturi (Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventós 1999). Ekstrakti pčelinjeg polena su razblaženi 30 puta, dok su ekstrakti mešavine pčelinjeg polena i meda razblaženi 10 puta. Svakom ekstraktu, zapremine 0,5 cm<sup>3</sup>, dodato je 2,5 cm<sup>3</sup> Folin-Čikalteu reagensa. Nakon 5 minuta, datom rastvoru je dodato 2 cm<sup>3</sup> rastvora natrijum-karbonata (7,5% v / v). Ovako pripremljeni rastvori su inkubirani u mraku pri temperaturi od 25 °C, u trajanju od 2 h, a zatim im je izmerena apsorbcija na talasnoj dužini od 765 nm u odnosu na slepu probu (ista smeša sa vodom umesto uzorka) na uređaju Cintra 6 spectrophotometer (*GBC Scientific Equipment Ltd.*, Dandenong, Australia). Za konstrukciju kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora galne kiseline opsega koncentracija 20 - 100 µg/ cm<sup>3</sup>. Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja izračunat je pomoću jednačine krive dobijene metodom najmanjih kvadrata za utvrđene TPC vrednosti standarda galne kiseline. Rezultati su izraženi kao miligram-ekvivalenti galne kiseline po gramu uzorka (mg GAE/ g). Sva merenja su urađena u triplikatu.

#### 3.4.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata pčelinjeg polena, meda i smeša pčelinjeg polena i meda

Relativna antioksidativna aktivnost ekstrakata određena je primenom modifikovane DPPH metode iz literature (H. Li et al. 2008). Koncentracija ekstrakata podešena je kao i u slučaju određivanja TPC (ekstrakti pčelinjeg polena razblaženi 30 puta; ekstrakti mešavina pčelinjeg polena i meda razblaženi 10 puta). Alikvotu od 0,2 cm<sup>3</sup> ekstrakta uzorka dodato je 4 cm<sup>3</sup> metanolnog rastvora DPPH koncentracije 71 mM. Slepa proba je pripremljena tako što je u 0,2 cm<sup>3</sup> metanola dodato 4 cm<sup>3</sup> rastvora DPPH. Nakon 60 min na sobnoj temperaturi u mraku, apsorbcija svih rastvora je izmerena na talasnoj dužini od 515 nm. Sva merenja su urađena u triplikatu. Za konstruisanje kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora troloksa opsega koncentracija 50–400 µmol/ dm<sup>3</sup>. Relativna antioksidativna aktivnost izračunata je pomoću jednačine (4):

$$RSA (\%) = \frac{A_{DPPH} - A}{A_{DPPH}} \cdot 100 \quad (4)$$

gde je  $A_{DPPH}$  apsorbcija slepe probe (metanolni rastvor DPPH);  $A$  apsorbcija standarda/uzorka u prisustvu DPPH. Antioksidativni kapacitet uzoraka izračunat je pomoću jednačine prave, dobijene metodom najmanjih kvadrata za vrednosti RSA standarda troloksa, i izražen kao milimol ekvivalenti troloksa po kilogramu uzorka (mmol TE/ kg).

### 3.5 UHPLC-LTQ Orbitrap MS

Za razdvajanje i identifikaciju flavonoidnih glikozida u uzorcima pčelinjeg polena korišćen je sistem za tečnu hromatografiju (*Thermo Fisher Scientific*) (Slika 23), sastavljen od kvaternarne Accela 600 pumpe i Accela autosemplera. Sistem je povezan na linearni jon trap-orbitrap hibridni maseni spektrometar visoke rezolucije (LTQ OrbitrapXL, *Thermo Fisher Scientific*) sa jonskim izvorom u obliku elektrosprej jonizacije u kombinaciji sa zagrejanim pomoćnim gasom (*Heated-electrospray ionization*, HESI). U nastavku su navedeni parametri masene spektrometrije primenjeni

u analizi a koji su identični prethodno objavljenim od strane autora Guffa i saradnika (Guffa et al. 2017). Razdvajanje jedinjenja izvršeno je na koloni *Hypersil gold C18* dimenzija  $100 \times 2,1$  mm i veličina čestica  $1,9 \mu\text{m}$ , proizvođača *ThermoFisher Scientific*. Eluiranje je vršeno dvokomponentnom mobilnom fazom koju čine: voda + 0,1 % mravlja kiselina (komponenta A) i acetonitril + 0,1 % mravlja kiselina (komponenta B). Primenjen je sledeći gradijent koncentracija: 0,0-1,0 min 5% B, 1,0-12,0 min od 5% do 95% (B), 12,0-12,1 min od 95% do 5% (B) zatim 5% (B) tokom 3 min. Protok mobilne faze je bio 0,300 mL/min, dok je injekciona zapremina iznosila 5  $\mu\text{L}$ . Maseni spektri, opsega 100-1500  $m/z$ , snimljeni su u negativnom režimu, pri čemu su parametri jonskog izvora bili podešeni na sledeći način: napon jonskog izvora iznosio je 3 kV; kapilarni napon -20 V; napon cevnog sočiva -150 V; temperatura kapilara 275 °C; protok osnovnog i pomoćnog gasa ( $\text{N}_2$ ) 30 i 8 proizvoljnih jedinica. Odgovarajući joni analiziranih jedinjenja dobijeni su primenom kolizijom indukovane disocijacije (CID, *Collision Induced Dissociation*) pri čemu je normirana energija sudara u kolizionoj ćeliji podešena na 35 eV. Kontrola i podešavanje MS sistema, prikupljanje i analiziranje podataka izvršeni su primenom softvera *Xcalibur* (verzija 2.1 *Thermo Fisher*, Bremen, Nemačka). Kao referentna biblioteka za izračunavanje tačne mase jedinjenja od interesa korišćen je program za crtanje molekulskih struktura *ChemDraw* (verzija 12.0).



**Slika 23.** Hibridni maseni spektrometar LTQ Orbitrap XL sa sistemom Acella UHPLC

### 3.6 HPTLC metode

#### 3.6.1 Određivanje polifenolnog profila uzoraka pčelinjeg polena primenom HPTLC metode

Hromatografsko odvajanje je izvedeno na silika gel HPTLC pločama dimenzija  $20 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ , kat. br. 1.05642 (*Merck*, Darmstadt, Germany). Ekstrakti pčelinjeg polena (proceđeni kroz  $0,45 \mu\text{m}$  PTFE filtre), zapremine 2  $\mu\text{L}$ , nanešeni su na ploče u vidu traka širine 8 mm, pomoću autosemlera (ATS4, *CAMAG*, Muttenz, Switzerland). Hromatogrami su razvijeni primenom mobilne faze sledećeg sastava: toluen / etil-acetat / mravlja kiselina, u zapreminskom odnosu 4:7:1 i etil-acetat / voda / mravlja kiselina, u zapreminskom odnosu 17:2:2 (Waisi et al. 2015). Kada za hromatografiju, sa dvostrukom komorom (*CAMAG*), je pre analize zasićena parama mobilne faze u trajanju od 20 min. Razvijanje hromatograma izvršeno je uzlaznom tehnikom, pri čemu je pređeni put rastvarača iznosio 80 mm. Ploče su zatim sušene u struji toplog vazduha tokom dva minuta, a potom zagrevane pri temperaturi od 100 °C pomoću uređaja TLC Plate Heater III (*CAMAG*), u

trajanju od tri minuta. Vizualizacija hromatografskih zona izvršena je uranjanjem ploča u rastvor NTS u etil-acetatu (5%, v/v), u trajanju od 1 s, korišćenjem uređaja Chromatogram Immersion Device III (CAMAG). Ploče su zatim sušene na sobnoj temperaturi, i nakon pet minuta uronjene rastvor PEG 4000 u dihlormetanu (5%, v/v) u trajanju od 1 s. Fotografisanje ploča, pri talasnoj dužini od 366 nm, izvršeno je sistemom CAMAG DigiStore 2 documentation system povezanim sa Reprostar 3 (CAMAG), kontrolisanim pomoću winCATS softvera (IZASA SCIENTIFIC, Madrid, Spain, Version 1.4.3.6336) koji poseduje četiri otvora blende, sa vremenom ekspozicije od 30 ms i okvirom od 2 mm (Ristivojević et al. 2014). Slike hromatograma, sačuvane u TIFF formatu, korišćene su za dalju obradu.



Slika 24. Linomat

#### 3.6.2 Određivanje polifenolnog profila ekstrakata pčelinjeg polena, meda i smeša pčelinjeg polena i meda primenom HPTLC metode

NP HPTLC hromatografija je izvedena na HPTLC staklenim pločama (Merck, kat. br. 1.05642), dok su RP-HPTLC aluminijumske ploče (Merck, kat. br. 1.05559) korišćene za reverzno-fazna hromatografska odvajanja.

Ekstrakti uzoraka, zapremine 5  $\mu$ L, nanešeni su na ploče u vidu traka dužine 8 mm, pomoću Linomat 5 sistema (CAMAG) (Slika 24) kontrolisanog softverom winCats manager. Uzlazno hromatografsko razvijanje izvršeno je pri temperaturi od 20 °C u vertikalnoj kadi sa dva kanala veličine 20 cm  $\times$  10 cm (CAMAG). Kada je prethodno sićena parama mobilne faze tokom 20 minuta. Pređeni put rastvarača iznosio je 70 mm. Sastav mobilnih faza bio je toluen / etil-acetat / mravlja kiselina (5/4/1, v/v/v) i etil-acetat / voda / mravlja kiselina (8/1/1, v/v/v) za NP HPTLC i etanol / voda / mravlja kiselina (3/6/1, v/v/v) za RP HPTLC metodu. Nakon razvijanja hromatograma, ploče su sušene 2 min u struji toplog vazduha, a zatim zagrejane na 100 °C. Neposredno nakon zagrevanja, ploče su uronjene u metanolni rastvor NTS (0,5%, v/v) u trajanju od 1 s, pomoću uređaja Chromatogram Immersion Device III (CAMAG). Ploče su ponovo sušene u struji toplog vazduha u trajanju od 5 min, a zatim uronjene u rastvor PEG 400 u metanolu (5%, v/v) tokom 1 s, čime je postignuto poboljšanje i stabilizacija fluorescentnih zona. Dokumentovanje slika pri  $\lambda = 366$  nm izvršeno je mobilnim telefonom (Huawei P30 Pro) sa digitalnom video kamerom rezolucije 40 megapiksela. Fotografije ploča su sačuvane kao TIFF datoteke i u datom formatu korišćene pri daljoj obradi slike.

### 3.6.3 Obrada slike hromatograma i statistička obrada podataka

Slike HPTLC hromatograma su obrađene pomoću softvera ImageJ (Softver ImageJ, 1.53e, Maryland, SAD; 2020) koristeći proceduru prethodno opisanu u literaturi (Ristivojević et al. 2014). U prvom koraku obrade slike izvršeno je uklanjanje šuma (nasumično pojavljivanje svetlih i tamnih piksela) filtriranjem pomoću opcije median filter, širine 2 piksela. Pojasni filter, koji filtrira velike strukture do 40 piksela a male strukture do 3 piksela, korišćen je za uklanjanje razlika u intenzitetu pozadine između slika. Pre akvizicije i analize signala, svaka slika je podeljena i filtrirana kroz crveni, zeleni i plavi kanal kako bi se povećala selektivnost razdvajanja. Slika je zatim rotirana za 90° udesno, nakon čega je izvršeno isecanje obeleženih pravougaonih površina od startne mrlje do fronta rastvarača) koje predstavljaju skup hromatografskih zona odgovarajućih uzoraka. Sledeći korak bio je predstavljanje hromatografskih signala u obliku grafičkog prikaza zavisnosti intenziteta zona (broj piksela) u funkciji rastojanja, za svaki uzorak i za svaki od tri kanala (crveni, zeleni i plavi). Dobijene vrednosti hromatografskih signala su zatim prebačene u Excel i podvrgnute daljoj statističkoj analizi.

Predtretman hromatografskih signala, obavljen pomoću algoritama implementiranih u softveru PLS ToolBox za MATLAB (Advanced Chemometrics Software PLS ToolBox v. 6.2.1 za MATLAB (7.12.0 (R2011a), Eigenvector) Research, Inc., Venatchee, VA 98801, SAD; 2019. Dostupno na: [http://www.eigenvector.com/software/pls\\_toolbox.html](http://www.eigenvector.com/software/pls_toolbox.html)), obuhvatao je poravnavanje, normiranje i centriranje podataka. Procedura poravnanja tj. korelacija optimizacije savijanja (eng. *Correlation Optimized Warping*, COW) izvedena je u cilju uklanjanja razlika u prostornom rasporedu traka, odnosno njihovom međusobnom usklađivanju. Eliminisanje neželjenih efekata nastalih usled razlike u količini uzorka nanetog na stacionarnu fazu, izvedeno je uobičajenom tehnikom normiranja - standardna normalna promenljiva (*Standard Normal Variate*, SNV). Podaci su dodatno prethodno obrađeni srednjim centriranjem, što je poželjna opcija kada se klasifikacija uzoraka zasniva na varijablama merenim u istoj jedinici.

Deskriptivna statistika, uporedni *t*-test, analiza varijanse i linearna regresiona analiza izvedene su pomoću programa Microsoft Office Excel.

Analiza glavnih komponenta urađena je korišćenjem softvera PLS ToolBox, v.6.2.1 statističkog paketa (MATLAB 7.12.0 (R2011a), koji je prethodno primenjen za predtretman hromatografskih signala. Odabir optimalnog broja glavnih komponenta izvršen je primenom Kajzerovog kriterijuma. Vrednosti parametara Q i T2 za Hotellingovu raspodelu, određeni su pri nivou pouzdanosti od 0,95 u cilju utvrđivanja prisustva spoljašnih vrednosti (rezultata koji su posledica grubih grešaka).

## 3.7 Testiranje antimikrobne aktivnosti ekstrakata pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda

### 3.7.1 Ispitivani sojevi bakterija

Za potrebe ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći bakterijski izolati iz postojeće laboratorijske ATCC (eng. *American Type Culture Collection*) kolekcije:

- Gram-pozitivni sojevi bakterija: *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Micrococcus lysodeikticus* ATCC4698, *Bacillus cereus* ATCC10876;
- Gram-negativni sojevi bakterija: *Shigella flexneri* ATCC9199, *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 i *Acinetobacter baumannii* ATCC19606

### 3.7.2 Medijumi za gajenje bakterija i uslovi rasta

Kultivisanje ispitivnih sojeva bakterija izvršeno je u MHB bujonu (Mueller Hinton Broth, HiMedia, Mumbai, India) i MHA agaru (Mueller Hinton Agar, *HiMedia*, Mumbai, India). Tečne bakterijske kulture su inkubirane na 37 °C pri 180 rpm tokom 24 h. Bakterijske suspenzije su podešene da odgovaraju 0,5 MekFarland (*McFarland*) standardu (*BioMérieux*, Marcy-l'Étoile, France) što odgovara koncentraciji od  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

MHB priprema: 21 g MHB rastvoriti u 1000 mL destilovane vode

MHA priprema: MHB sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL destilovane vode

Priprema polučvrstog MHA medijuma: 21 g MHB sa dodatkom 7 g agara na 1000 mL destilovane vode

### 3.7.3 Testiranje antibakterijske aktivnosti uzoraka difuzionom metodom

Preliminarno ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda izvršeno je primenom modifikovane difuzione metode u bunarićima (Dimkić et al. 2016). Na čvrsti hranljivi medijum postavljeni su sterilni kalupi za bunariće (prečnika 5 mm) napravljeni od nastavaka za pipete zapremina 200 µL. Na površinu čvrstog medijuma je ravnomerno raspoređeno 7 mL polučvrstog medijuma prethodno inokulisanog sa 70 µL bakterijske suspenzije. Nakon uklanjanja kalupa, u bunariće je dodato 50 µL pojedinačnih koncentrovanih ekstrakata (400 mg/ mL). Kao negativna kontrola korišćeno je 50 µL metanola dok su kao pozitivne kontrole korišćeni antibiotici tetraciklin (50 µL, koncentracije 12,5 µg/ mL) i streptomycin (50 µL, koncentracije 25 µg/ mL). Inkubacija je vršena na temperaturi od 37 °C tokom 24 h. Antibakterijska aktivnost ekstrakata je procenjena na osnovu prečnika zone inhibicije rasta izraženog u mm.

### 3.7.4 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) odabranih ekstrakata pčelinjeg polena, meda i mešavina meda i polena za određene bakterijske sojeve određene su mikrodilucionom metodom primenom dvostrukih serijskih razblaženja pripremljenih u MHB medijumu u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića (Dimkić et al. 2016). Ekstrakti su testirani u opsegu koncentracija od 0,78 do 50 mg/mL. Konačna koncentracija metanola kao rastvarača u prvom bunariću bila je 14%. Kao pozitivne kontrole testirani su antibiotici tetraciklin i streptomycin (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA) a njihova koncentracija u prvom bunariću iznosila je 100 µg/ mL. Kontrolu sterilnosti predstavljao je hranljivi medijum a kontrolu rasta hranljivi medijum sa bakterijskom suspenzijom. Eksperiment je izveden u dva ponavljanja. Svaki bunarić, osim kontrole sterilnosti, inokulisan je sa 20 µL bakterijske suspenzije (finalna koncentracija  $10^6$  CFU/ mL), dostižući konačnu zapreminu od 200 µL. Na kraju, 22 µL indikatora rasta resazurina koncentracije 0,675 mg/ mL je dodato u svaki bunarić. Ploče su inkubirane 24 h u mraku pri temperaturi od 37 °C. Najniža koncentracija ekstrakta pri kojoj nije došlo do promene boje indikatora iz ljubičaste u ružičastu, odnosno pri kojoj nije zabeležen rast, određena je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Nakon zasejavanja sadržaja svakog bunarića bez promene boje na hranljivi agar i inkubacije pri optimalnoj temperaturi tokom 24 h, najniža koncentracija pri kojoj nije došlo do rasta bakterijske kulture određena je kao minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Rezultati su izraženi u mg/ mL

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Analiza uzoraka pčelinjeg polena

#### 4.1.1 Biljno poreklo uzoraka pčelinjeg polena

Palinološkom analizom uzoraka pčelinjeg polena utvrđeno je njihovo biljno poreklo. Primenom ove metode izvršena je identifikacija, odnosno utvrđivanje morfologije polenovih zrna kao i njihovo prebrojavanje. Metoda pruža važne informacije o karakteristikama geografskih regiona iz kojih pčelinji polen potiče, kao što su informacije o vegetaciji, o tome koji su glavni izvori polena koje pčele koriste. Na osnovu polenske analize mogu se utvrditi različite promene u biodiverzitetu određenog područja, kao na primer prisustvo invazivnih ili egzotičnih biljnih vrsta. Određivanje biljnog porekla pčelinjih proizvoda takođe može biti od velikog interesa za racionalno planiranje iskorišćenja prirodnih resursa (M. G. Campos et al. 2021). Melizopalinoškom analizom 24 uzorka pčelinjeg polena dobijeni su rezultati o njihovom biljnom poreklu, koji su prikazani u Tabeli 5 (Kostić, Barać, et al. 2015). Izvršena je identifikacija ukupno 24 biljnih taksona, dok je u jednom uzorku (uzorak 15) utvrđeno i prisustvo spora gljiva. Jedanaest analiziranih uzoraka pčelinjeg polena bilo je monofloralno (Tabela 5, uzorci 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 18, 19, 20, 21), osam uzoraka je bilo bifloralno (uzorci 2, 3, 11, 13, 16, 17, 22, 24), dok je pet uzoraka bilo polifloralno (uzorci 7, 12, 14, 15, 23) (Barth et al. 2010). Među monofloranim uzorcima pčelinjeg polena u većini slučajeva dominira polen biljaka iz familija mahunarki (Fabaceae) i kupusnjača (Brassicaceae).

**Tabela 5.** Klase učestalosti identifikovanih tipova polena i tumačenje cvetnog porekla na osnovu rezultata palinološke analize

| Oznaka uzorka | Broj vrsta polena | Dominantni tip polena (>45%) | Prateći tip polena (15-45%)                        | Važni izolovani tipovi polena (3-15%)               | Biljno poreklo                           |
|---------------|-------------------|------------------------------|--|---|--|
| 1             | 5                 | Brassicaceae (93%)           |  | Moraceae  | Monofloralni (Brassicaceae)              |
| 2             | 25                | Fabaceae (48%)               | Brassicaceae (19%)                                 | Ranunculaceae, <i>Vitis</i>                         | Bifloralni (Fabaceae, Brassicaceae)      |
| 3             | 14                | -                            | Brassicaceae (45%), <i>Salix</i> (35%)             | Rosaceae, <i>Vitis</i>                              | Bifloralni (Brassicaceae, <i>Salix</i> ) |
| 4             | 15                | Fabaceae (72%)               | -  | Brassicaceae, <i>Sophora</i>                        | Monofloralni (Fabaceae)                  |
| 5             | 15                | Fabaceae (50%)               | -  | Brassicaceae, Rosaceae, <i>Salix</i> , <i>Vitis</i> | Monofloralni (Fabaceae)                  |
| 6             | 12                | Apiaceae (69%)               | -  | -   | Monofloralni (Apiaceae)                  |
| 7             | 18                | -                            | Brassicaceae (31%), Fabaceae (18%), Moraceae (18%) | Lamiaceae, <i>Salix</i> , <i>Tilia</i>              | Polifloralni                             |
| 8             | 12                | Brassicaceae (76%)           | -  | <i>Salix</i> , Rosaceae, <i>Sambucus</i> , Apiaceae | Monofloralni (Brassicaceae)              |
| 9             | 15                | Brassicaceae (53%)           | -  | Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Ranunculaceae       | Monofloralni (Brassicaceae)              |
| 10            | 13                | Fabaceae (81%)               | -  | Brassicaceae  | Monofloralni (Fabaceae)                  |
| 11            | 22                | -                            | Rosaceae (42%), Fabaceae (23%)                     | Asteraceae, <i>Plantago</i>                         | Bifloralni (Rosaceae, Fabaceae)          |

Tabela 5. Nastavak

| Oznaka uzorka | Broj vrsta polena | Dominantni tip polena (>45%) | Prateći tip polena (15-45%)   | Važni izolovani tipovi polena (3-15%)   | Biljno poreklo                                    |
|---------------|-------------------|------------------------------|---|---|---|
| 12            | 10                | -                            | <i>Plantago</i> (35%),<br>Fabaceae (19%),<br><i>Ambrosia</i> (19%),<br>Asteraceae (18%) | <i>Zea mays</i>   | Polifloralni                                      |
| 13            | 18                | -                            | Brassicaceae (34%),<br>Fabaceae (28%)   | <i>Helianthus</i> ,<br>Ranunculaceae, <i>Tilia</i>  | Bifloralni (Brassicaceae,<br>Fabaceae)            |
| 14            | 17                | -                            | Asteraceae (31%),<br><i>Ambrosia</i> (18%)  | Asteraceae, Apiaceae,<br><i>Artemisia</i> , <i>Helianthus</i> ,<br>Brassicaceae,<br>Chenopodiaceae,<br>Ranunculaceae  | Polifloralni                                      |
| 15            | 23                | -                            | Asteraceae (18%)  | Rust spores, Asteraceae,<br><i>Helianthus</i> , <i>Carduus</i> ,<br>Brassicaceae, Fabaceae,<br><i>Plantago</i> , Poaceae, <i>Zea mays</i> ,<br>Ranunculaceae,<br>Rosaceae | Polifloralni                                      |
| 16            | 22                | -                            | Fabaceae (34%),<br>Brassicaceae (25%)   | <i>Artemisia</i> , <i>Ambrosia</i> ,<br>Ranunculaceae, <i>Vitis</i>   | Bifloralni (Fabaceae,<br>Brassicaceae)            |
| 17            | 17                | -                            | Ranunculaceae<br>(33%), Apiaceae<br>(28%)   | -   | Bifloralni (Ranunculaceae,<br>Apiaceae)           |
| 18            | 18                | Ranunculaceae<br>(76%)       | -   | Asteraceae, <i>Artemisia</i> ,<br><i>Helianthus</i>   | Monofloralni (Ranunculaceae)                      |
| 19            | 17                | Fabaceae (57%)               | -   | Brassicaceae, <i>Ambrosia</i> ,<br><i>Helianthus</i> , <i>Vitis</i>   | Monofloralni (Fabaceae)                           |
| 20            | 7                 | -                            | <i>Sophora</i> (42%)  | Asteraceae, Cannabaceae   | Monofloralni ( <i>Sophora</i> )                   |
| 21            | 18                | Fabaceae (78%)               | -   | Brassicaceae  | Monofloralni (Fabaceae)                           |
| 22            | 12                | <i>Sophora</i> (46%)         | <i>Helianthus</i> (21%)   | Asteraceae,<br>Chenopodiaceae, <i>Zea mays</i> ,<br>Ranunculaceae   | Bifloralni ( <i>Sophora</i> , <i>Helianthus</i> ) |
| 23            | 19                | -                            | Ranunculaceae<br>(24%), <i>Robinia</i><br>(22%)   | Asteraceae, <i>Artemisia</i> ,<br><i>Ambrosia</i> ,<br>Chenopodiaceae,<br>Brassicaceae, <i>Cornus</i>   | Polifloralni                                      |
| 24            | 14                | -                            | Apiaceae (38%),<br>Chenopodiaceae<br>(20%)  | Asteraceae, <i>Artemisia</i> ,<br>Brassicaceae, Moraceae,<br>Poaceae, <i>Zea mays</i>   | Bifloralni (Apiaceae,<br>Chenopodiaceae)          |

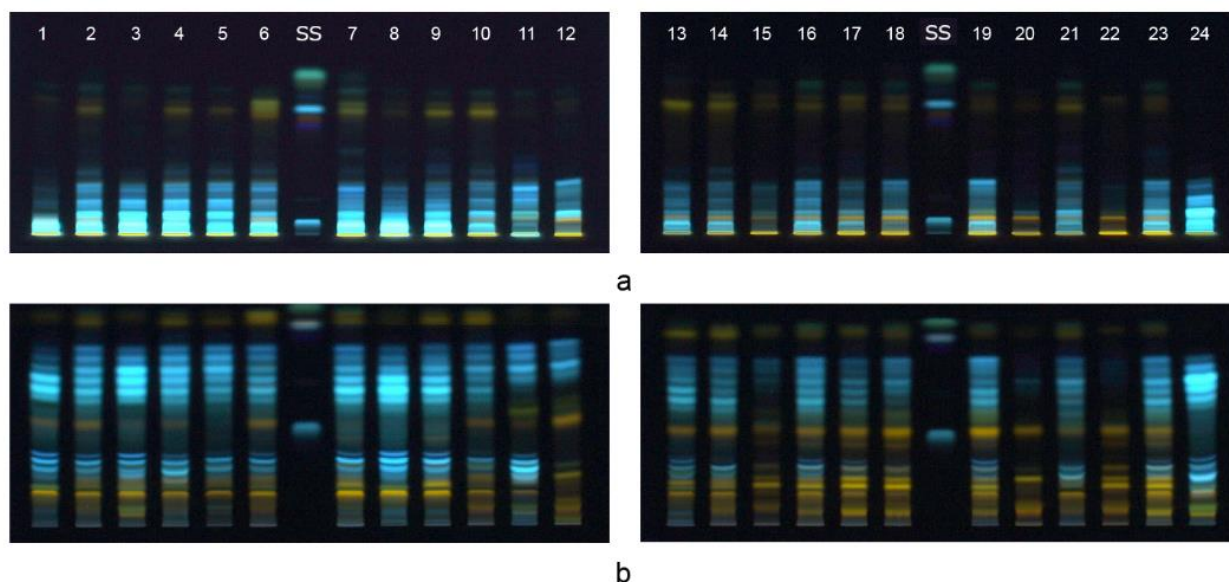
#### 4.1.2 HPTLC polifenolni profil uzorka pčelinjeg polena

Palinološka analiza pčelinjeg polena daje uvid u biljni sastav pčelinjeg polena i može se koristiti za praćenje njegovog biljnog porekla, međutim, informacije o biološkoj aktivnosti ispitivanog uzorka koja predstavlja važan parametar njegovog kvaliteta, ne mogu se dobiti na ovaj način. Velike varijacije u hemijskom sastavu prisutne su čak i u slučajevima monofloralnog pčelinjeg polena. Iako je posebna botanička jedinstvenost garantovana u slučajevima kada 45% polenovih zrna potiče od jedne određene biljne vrste, pojedine vrste iz preostalih 55% mogu znatno izmeniti hemijski sastav a samim tim i biološku aktivnost datog uzorka pčelinjeg polena. Stoga je određivanje polifenolnog sastava koji utiče na biološku aktivnost pčelinjeg polena od velike važnosti.

U pčelinjem polenu su prisutna brojna polifenolna jedinjenja različitih struktura, što je uobičajeno za prirodne proizvode. Razdvajanje i karakterizacija pojedinačnih sastojaka kompleksne smeše polifenolnih jedinjenja pčelinjeg polena je veoma zahtevno za izvođenje i iziskuje primenu sofisticiranih analitičkih tehnika poput HPTLC, koja se zahvaljujući stalnom razvoju i poboljšanju

performansi gotovo uobičajeno koristi u kontroli kvaliteta prirodnih proizvoda (Morlock and Schwack 2010). U okviru ove disertacije, HPTLC metoda je, po prvi put, primenjena za analizu polifenolne frakcije uzoraka pčelinjeg polena. Umesto ciljane analize metabolita, za poređenje uzoraka korišćen je karakterističan hromatografski profil koji omogućava njihovo prepoznavanje. U tom smislu, analiza smeše polifenolnih jedinjenja uzoraka pčelinjeg polena najpre je obavljen HPTLC analizom, nakon čega su dobijeni hromatogrami posmatrani kao jedinstveni multivarijantni tzv. „otisak prsta”.

Zbog složenosti sastava ekstrakata pčelinjeg polena, izvršena je optimizacija HPTLC sistema u smislu najboljeg razdvajanja polifenolnih jedinjenja različite polarnosti. Odabrana su dva sistema koja su obezbedila najbolje razdvajanje. CS1 (toluen / etil-acetat / mravlja kiselina, 4:7:1) hromatografski sistem korišćen je za manje polarnu frakciju, dok je razdvajanje srednje polarne i visoko polarne frakcije izvedeno primenom sistema CS2 (etil-acetat / voda / mravlja kiselina, 17:2:2). Primenom oba sistema istovremeno je analizirana i smeša standardnih jedinjenja, pri čemu je dobijen sledeći rastući redosled vrednosti retardacionog faktora ( $R_F$ ) datih supstanci: hlorogena kiselina, galna kiselina, miricetin, hrizin, kofeinska kiselina, ferulinska kiselina, naringenin, galangin. HPTLC hromatogrami ekstrakata uzoraka pčelinjeg polena i smeše standardnih jedinjenja, prikazani su na Slici 25.



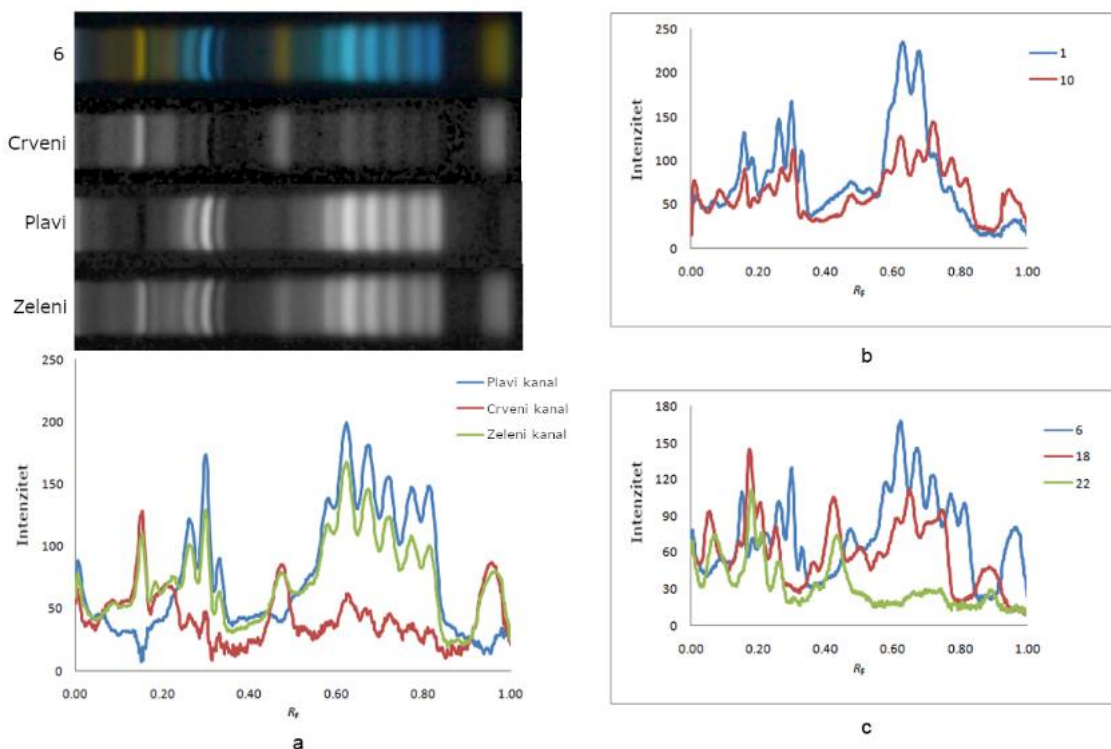
**Slika 25.** HPTLC hromatogrami ekstrakata pčelinjeg polena, (a) hromatografski sistem CS1, (b) hromatografski sistem CS2. (1-24) uzorci pčelinjeg polena (Tabela 5); SS-smeša standardnih jedinjenja.

Primenom hromatografskog sistema male elucione moći (CS1) nije se moglo postići razdvajanje velikog broja polarnijih polifenolnih jedinjenja koja su jače adsorbovana na silika gelu (Slika 25 a). Međutim, u slučaju nepolarnih flavonoida, kao što su flavonoli, flavanoni i izoflavonoidi, uočeno je prisustvo specifičnih obrazaca, koji se javljaju u vidu narandžastih i zelenih zona pozicioniranih pri višim  $R_F$  vrednostima. Sistem (CS2) korišćen za analizu profila polarnijih jedinjenja prisutnih u uzorcima pčelinjeg polena, dao je hromatograme sa postignutom dobrom efikasnošću razdvajanja i niskim pozadinskim šumom (Slika 25 b). Primenom ovog hromatografskog

sistema uspešno su odvojene srednjepolarne i visokopolarne komponente (uglavnom polarnije fenolne kiseline kao što su hlorogena, galna i elaginska kiselina), i različiti flavonoidni aglikoni (apigenin, kvercetin, kempferol), kao i njihovi glikozidi (Senguttuvan and Subramaniam 2016; Cieśla et al. 2011). Dobijeni su bogati hromatografski profili sa dobro definisanim, ostrim hromatografskim zonama, koje su formirale dva dominantna obrasca. Prvi karakteriše prisustvo plavo obojenih zona na  $R_F$  vrednostima između 0,60 i 0,80. Date zone su prisutne u svim uzorcima i mogu se smatrati karakterističnim obeležjem srpskog pčelinjeg polena. U drugom obrascu dominiraju narandžaste trake, pri nižim  $R_F$  vrednostima, koje se mogu pripisati veoma polarnim glikozidima. Profili su različiti u zavisnosti od uzoraka i specifični su za određeno biljno poreklo polena.

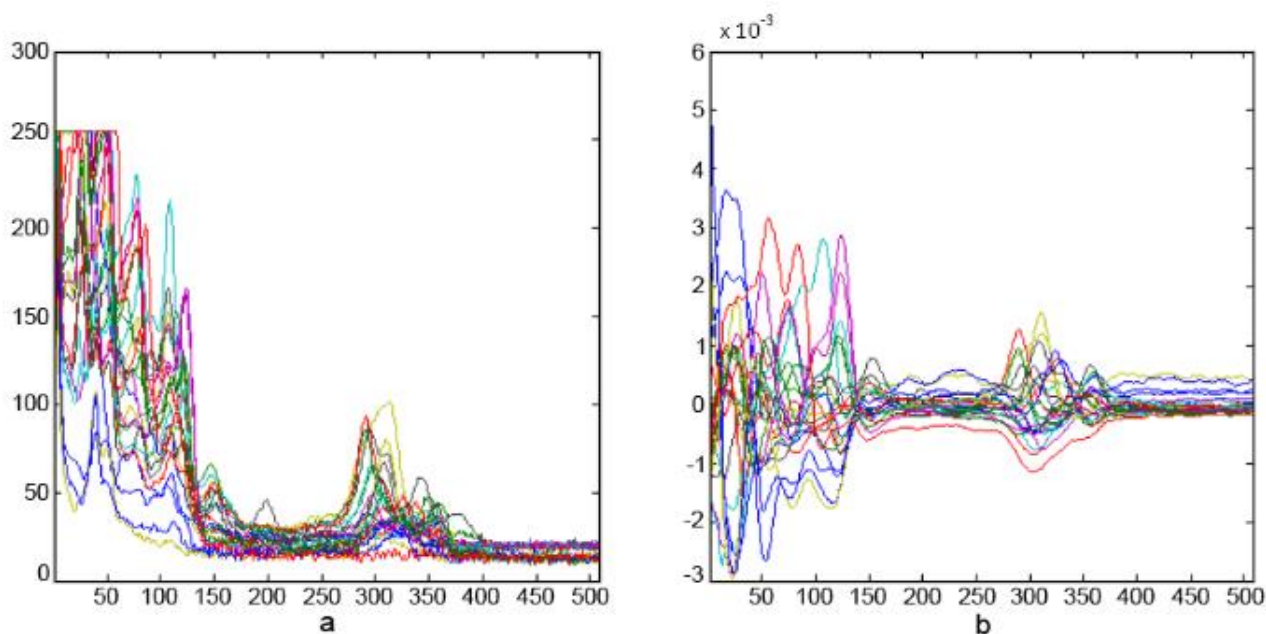
Analizom dobijenih hromatografskih profila utvrđeno je da oni pružaju osnovne informacije o fenolnom profilu ispitivanih uzoraka pčelinjeg polena. Međutim, ne postoji mogućnost izdvajanja potencijalnih markera biljnog porekla pčelinjeg polena, na osnovu kojih bi bila definisana njegova autentičnost. S tim u vezi, dalja analiza obuhvatala je prevođenje hromatografskog profila pčelinjeg polena u matricu podataka i multivarijantnu analizu u cilju uočavanja obrazaca prepoznavanja među uzorcima.

HPTLC hromatogrami su prevedeni u numeričke vrednosti obradom slike (Ristivojević et al. 2017). Zbog postojanja obojenih traka polifenolnih jedinjenja na talasnoj dužini od 366 nm, u cilju povećanja selektivnosti, slike hromatograma su propuštene kroz crveni (R), zeleni (G) i plavi (B) filter. Crvene/zelene/plave (RGB) slike su analizirane ImageJ softverom i dobijeni podaci su dalje procesuirani metodom analize glavnih komponentata. Dobijeni polifenolni profili uzoraka polena određenog biljnog porekla, za sva tri kanala, prikazani su na Slici 26. U zavisnosti od primenjenog kanala uočavaju se razlike u dijagramima profila istog uzorka. Na Slici 26 a su dati profili uzorka **6** (sa Apiaceae dominantnim tipom polena) za sva tri kanala (R/G/B). Vizuelnim pregledom je utvrđeno da je, za analizirane uzorke pčelinjeg polena, zeleni kanal najinformativniji. Značajne razlike se takođe uočavaju poređenjem profila uzoraka **1** i **10** (sa Brassicaceae i Fabaceae preovlađujućim tipom polena, redom), kao i uzoraka **6**, **18** i **22** (kod kojih dominiraju Apiaceae, Ranunculaceae i *Sophora* tip polena, redom) (Slika 26 b, c).



**Slika 26.** Grafici zavisnosti intenziteta sive boje od  $R_F$  vrednosti: (a) uzorak **6** sa preovlađujućim Apiaceae tipom polena za sva tri kanala (crveni/zeleni/plavi); (b) uzorci **1** i **10**, za zeleni kanal; (c) uzorci **6**, **18** i **22**, za zeleni kanal.

Šest matrica podataka za tri kanala i dva hromatografska sistema, od kojih se svaka sastoji od 24 uzorka i 526 varijabli (intenziteta piksela duž linije puta), nakon pripreme podataka u smislu njihovog poravnavanja, normalizacije i centriranja (Slika 27), podvrgnuto je PCA kako bi se označila jedinjenja karakteristična za određeni tip polena. Parametri PCA modela za šest skupova podataka pokazali su najbolje rezultate diferencijacije i klasifikacije u slučaju zelenog kanala hromatografskih profila dobijenih pomoću CS1. Dati model će u nastavku biti detaljno razmotren. Predloženi petokomponentni model obuhvata 93,04% ukupne varijanse, pri čemu prva komponenta (PC1) opisuje 35,61%, dok druga komponenta (PC2) opisuje 33,70% ukupnog varijabiliteta među podacima (Tabela 6).



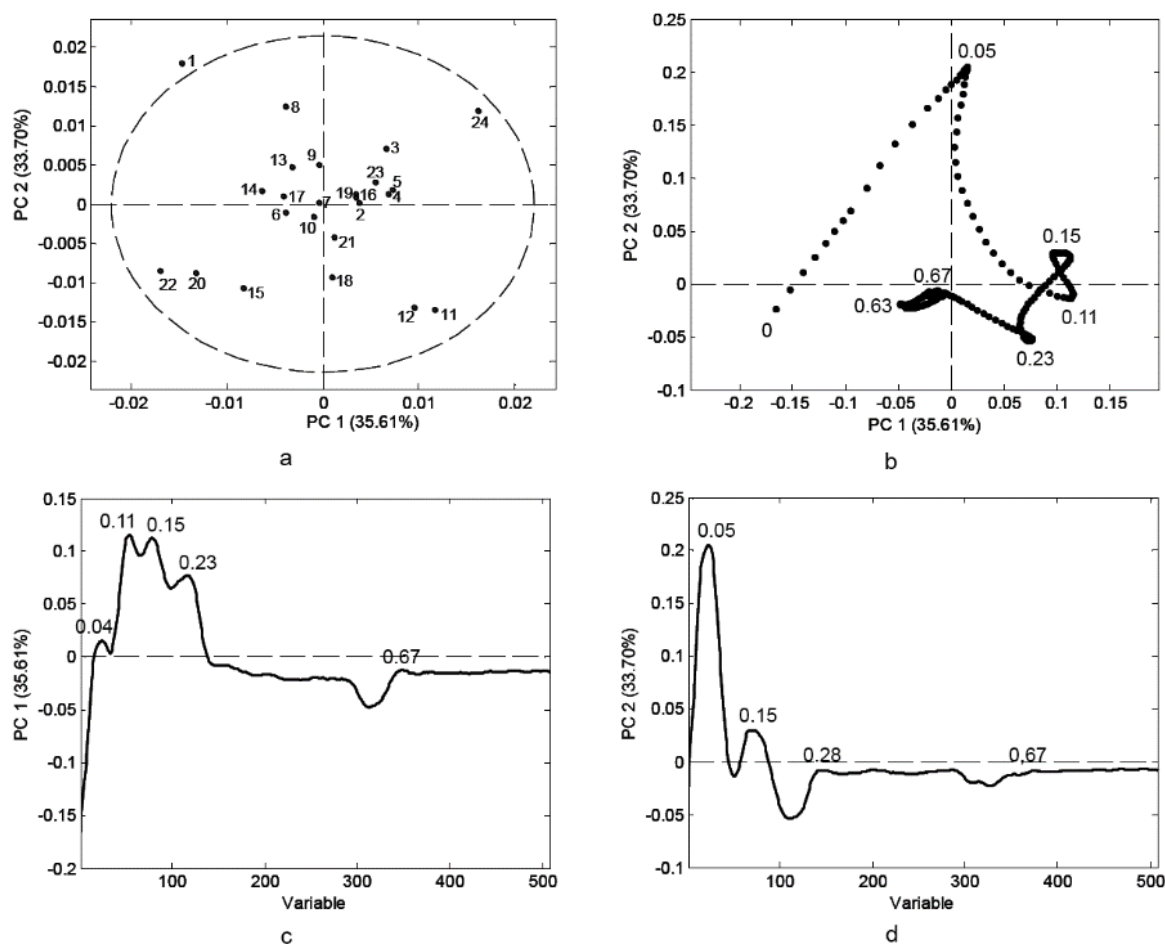
**Slika 27.** HPTLC profili (a) pre primene procedure obrade, naspram (b) prethodno-obrađenih podataka.

**Tabela 6.** Broj glavnih komponentata PCA modela i njima objašnjen procenat varijanse

| Broj glavnih komponentata | Vrednosti matrice kovarijanse (X) | % Varijanse | Ukupan % varijanse |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------|
| 1                         | 6,72e-005                         | 35,61       | 35,61              |
| 2                         | 6,36e-005                         | 33,70       | 69,32              |
| 3                         | 2,28e-005                         | 12,07       | 81,39              |
| 4                         | 1,22e-005                         | 6,47        | 87,86              |
| 5                         | 9,77e-006                         | 5,18        | 93,04              |

Na osnovu analize grafika skorova (Slika 28 a), uočavaju se dve karakteristične grupe koje čine uzorci **20** i **22** (kod kojih preovladava *Sophora* tip polena) i uzorci **11** i **12** (sa Rosaceae i *Plantago* dominantnim tipom polena, redom). Ove dve grupe su izdvojene od ostalih uzoraka koji sadrže različite vrste polena u odnosu na njih. Uzorci **15** (sa sporama gljiva), **18** (sa visokim procentom Ranunculaceae polena) i **24** (sa velikom količinom Chenopodiaceae polena), su na grafiku izolovani. Polen biljaka iz familije Brassicaceae najzastupljeniji je u uzorcima: **1**, **3**, **8**, **9** i **13**. Ovaj tip polena prisutan je takođe i u skoro svim ostalim analiziranim uzorcima, ali u znatno manjem procentu. Idući duž ose PC1, od njenog negativnog kraja ka pozitivnim vrednostima, primetno je smanjenje količine ovog tipa polena. Navedena grupa uzoraka (**1**, **3**, **8**, **9** i **13**) pozicionirana je u gornjem levom delu grafika, ali se takođe primećuje i da je uzorak **3** izdvojen iz ove grupe. Očigledno je da značajan udeo polena *Salix* tipa u uzorku **3** ima veliki uticaj na njegov polifenolni profil, a samim tim i na njegovu poziciju na grafiku. Uzorci sa dominantnim Fabaceae tipom polena (**2**, **4**, **5**, **10**, **16**, **19** i **21**) formirali su kompaktni klaster pozicioniran blizu grupe u kojoj preovladava Brassicaceae tip polena. Naime, svi oni sadrže polen Brassicaceae tipa u količini od 3–25%, ali je ipak uticaj Apiaceae tipa polena na polifenolni profil ovih uzoraka izuzetno jak, iako je on prisutan u nižim količinama. Uzorci **6**, **14** i **17** (69%, 3–15% i 28% Apiaceae tipa polena, redom) međusobno su blizu pozicionirani, i blizu grupama sa Brassicaceae i Fabaceae tipom polena, na osnovu čega se

može pretpostaviti da sadrže određen broj identičnih polifenolnih jedinjenja. Uzorak **23**, sa preovlađujućim *Robinia* tipom polena, na grafiku se nalazi u grupi uzoraka koji sadrže pretežno Fabaceae tip polena, što ukazuje da ovi uzorci imaju sličan sadržaj polifenola. To je u skladu sa činjenicom da rod *Robinia* pripada porodici biljaka Fabaceae. Postoji izvestan broj naučnih radova koji se bave utvrđivanjem profila raznih hemijskih jedinjenja u cilju definisanja biljnog porekla pčelinjeg polena (Rocchetti et al. 2019; Castiglioni et al. 2019). S obzirom da uzorci pčelinjeg polena, analizirani u ovoj studiji, predstavljaju smešu i više od deset različitih tipova polena, teško je izvršiti diferencijaciju i klasifikaciju zasnovanu na hemijskom profilu sa jasnim razdvajanjem među grupama, posebno kada se posmatra samo jedna klasa jedinjenja i ne kombinuje se nekoliko grupa parametara. Slični rezultati dobijeni su na osnovu NIR (eng. *Near-Infrared Spectroscopy* – Spektroskopija u bliskoj infracrvenoj oblasti) spektara uzoraka pčelinjeg polena prikupljenih iz dvanaest različitih brazilskih država (Costa et al. 2017), dok Castiglioni i saradnici ukazuju na mogućnost korišćenja IR (eng. *Infrared Spectroscopy* – Infracrvena spektroskopija) merenja za klasifikaciju nekih italijanskih uzoraka pčelinjeg polena prema njihovom biljnom poreklu (Castiglioni et al. 2019). Posmatrajući grafike latentnih varijabli (Slika 28 b – d) uočava se da zone sa  $R_F$  vrednostima od 0,04; 0,11; 0,15 i 0,23 imaju najjači pozitivan uticaj na PC1, odnosno na razdvajanje uzoraka pčelinjeg polena prema biljnoj vrsti od koje potiču. Zone sa  $R_F$  vrednostima od 0,05 i 0,15 značajno utiču na PC2 na pozitivan način, dok zone sa  $R_F$  vrednostima od 0,23 i 0,63 ispoljavaju negativan uticaj na drugu komponentu.

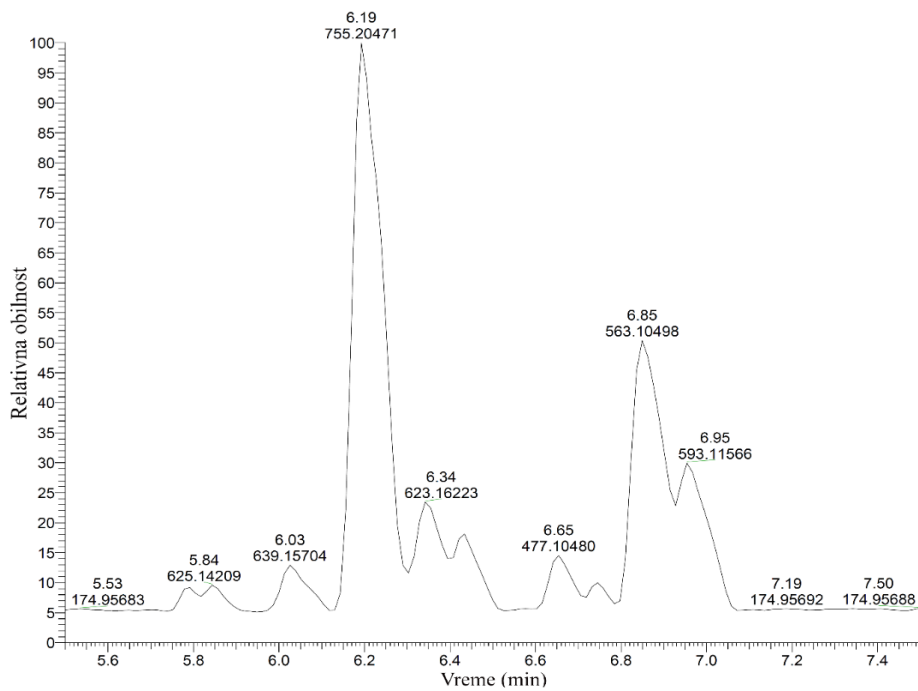


**Slika 28.** Analiza glavnih komponentata (PCA) izvedena na podacima dobijenim iz HPTLC polifenolnih profila uzoraka pčelinjeg polena, (a) grafik skorova latentnih varijabli, (b) grafik latentnih varijabli za PC1 i PC2, (c, d) grafici vektora latentnih varijabli za PC1 i PC2, redom.

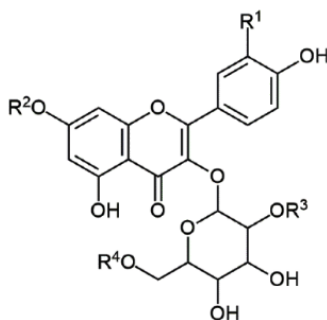
### **4.1.3 Identifikacija flavonoidnih glikozida UHPLC–LTQ Orbitrap MS metodom**

Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu polifenolnih jedinjenja prisutnih u pčelinjem polenu koja uslovljavaju brojne biološke efekte ovog prirodnog proizvoda. Flavonoidi pčelinjeg polena vode poreklo iz biljka, u kojima su retko prisutni u slobodnom obliku. Uglavnom se javljaju u obliku glikozida u kojima je flavonoidni deo (aglikon), vezan za šećernu komponentu prisutnu u obliku monosaharida ili oligosaharida (Komosinska-Vassev et al. 2015; Rzepecka-Stojko et al. 2015). Uprkos dokazanoj biološkoj aktivnosti glikozilovanih flavonoida, postoji potreba za novim informacijama o ovoj raznolikoj klasi jedinjenja, s obzirom da je samo nekoliko njenih pripadnika odobreno za kliničku primenu. Posebno su važne informacija o složenoj strukturi datih jedinjenja jer vrsta glikozilovanja npr. utiče na biološko dejstvo glikozilovanih flavonoida, a glikozidni deo takođe igra važnu ulogu i u apsorpciji ovih jedinjenja (Xiao 2015; Shah et al. 2013). U okviru ove disertacije, kao nastavak dosadašnjeg istraživanja pčelinjeg polena iz Srbije u kojem je bilo identifikovano nekoliko fenolnih kiselina i flavonoida (aglikona), izvršena je dodatna karakterizacija polifenolnog profila koja podrazumeva identifikaciju glikozilovanih flavonoida (Kostić 2015).

Kvalitativni profil flavonoidnih glikozida, prisutnih u obliku monoglikozida, diglikozida i triglikozida u uzorcima pčelinjeg polena, dobijen je primenom UPLC sistema spojenog sa LTQ Orbitrap masenim analizatorom. Identifikacija datih jedinjenja izvršena je na osnovu njihovih karakterističnih masenih spektara, tačne mase, MS/MS obrazaca fragmentacije i retencionog vremena (Slike 29, 32 i 33). Takođe su korišćeni dostupni standardi kao dodatna potvrda identifikacije ovih jedinjenja. Utvrđeno je da sva identifikovana jedinjenja pripadaju grupi flavonola i sva su označena kao 3-*O*-glikozidi kvercetina, izoramnetina i kampferola. Pretraga na osnovu tačne mase deprotonovanog molekula i proučavanje MS/MS fragmentacije opisane u literaturi, omogućili su identifikaciju 27 flavonolnih glikozida (Slika 30 i Tabela 7) (Federico Ferreres et al. 2010; Kostić et al. 2019; Rocchetti et al. 2019; Anjos et al. 2019; Mihajlovic et al. 2015). Priroda interglikozidnih veza (1→2 ili 1→6) za identifikovane flavonolne glikozide utvrđena je na osnovu dostupnih literaturnih podataka (F. Ferreres, Llorach, and Gil-Izquierdo 2004). Dobijeni podaci o retencionom vremenu ( $t_R$ , min) i MS parametrima za identifikovane glikozide sumirani su u Tabeli 7. Prisustvo svakog identifikovanog pika (odgovarajućeg flavonoidnog glikozida) iz svih uzoraka pčelinjeg polena prikazano je u Tabeli 8. U daljem tekstu je opisan karakterističan fragmentacioni put u negativnom jonizacionim modu i način identifikacije svakog od analiziranih flavonoidnih glikozida.



**Slika 29.** Hromatogram uzorka 6 (monofloralni uzorak pčelinjeg polena sa dominantnim Apiaceae tipom polena)



| N <sup>o</sup> | R <sup>1</sup>   | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | R <sup>4</sup> |
|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1              | OH               | HEKS           | H              | H              |
| 2              | OH               | HEKS           | H              | RAM            |
| 3              | OH               | H              | HEKS           | H              |
| 4              | H                | H              | H              | MAL            |
| 5              | H                | HEKS           | H              | H              |
| 6              | OCH <sub>3</sub> | HEKS           | H              | RAM            |
| 7              | OCH <sub>3</sub> | HEKS           | H              | H              |
| 8              | OH               | RAM            | HEKS           | H              |
| 9              | OH               | H              | PENT           | H              |
| 10             | OCH <sub>3</sub> | H              | HEKS           | H              |
| 11             | OH               | H              | RAM            | H              |
| 12             | H                | H              | HEKS           | H              |
| 13             | H                | RAM            | HEKS           | H              |
| 14             | OCH <sub>3</sub> | H              | RAM            | H              |
| 15             | OH               | H              | H              | RAM            |
| 16             | OCH <sub>3</sub> | H              | PENT           | H              |
| 17             | H                | H              | RAM            | H              |
| 18             | H                | H              | PENT           | H              |
| 19             | OCH <sub>3</sub> | H              | RAM            | H              |
| 20             | OH               | H              | H              | H              |
| 21             | OCH <sub>3</sub> | H              | H              | PENT           |
| 22             | OH               | H              | H              | MAL            |
| 23             | OCH <sub>3</sub> | H              | H              | RAM            |
| 24             | OCH <sub>3</sub> | H              | H              | H              |
| 25             | H                | H              | H              | H              |
| 26             | OCH <sub>3</sub> | H              | H              | H              |
| 27             | OCH <sub>3</sub> | H              | H              | MAL            |

**Slika 30.** Hemijske strukture različitih flavonol-glikozida iz pčelinjeg polena (R<sub>1-4</sub> -HEKS-heksozil, RAM-ramnozil, PENT-pentozil ili MAL-malonil).

**Tabela 7.** Retenciono vreme ( $t_R$ ), molekulske formule, izračunate i tačne mase, tačnost srednje mase (ppm) i MS/MS fragmenti flavonol-glikozida identifikovanih u uzorcima pčelinjeg polena

| Redni broj pika | $t_R$ , (min) | Molekulska formula, [M-H] <sup>-</sup>                       | Izračunata masa, [M-H] <sup>-</sup> | Tačna masa, [M-H] <sup>-</sup> | $\Delta$ (ppm) | MS/MS (%)  | Fragmentacija | Identifikacija  |
|-----------------|---------------|--|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|--|---------------|---|
| 1               | 5,30          | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup> | 625,14102                           | 625,14233                      | 2,10           | <b>463</b> (100), 301(30)  |               | Kvercetin-3,7-di- <i>O</i> -heksozid  |
| 2               | 5,74          | C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>21</sub> <sup>-</sup> | 771,19893                           | 771,20038                      | 1,88           | <b>609</b> (100), 301(5)   |               | Kvercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid   |
| 3               | 5,85          | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup> | 625,14102                           | 625,14172                      | 1,12           | 607(5), 505(15), 463(15), 445(50), 301(50), <b>300</b> (100)                             |               | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid                         |
| 4               | 5,89          | C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup> | 533,09368                           | 533,09454                      | 1,61           | <b>489</b> (100), 285(5)   |               | Kampferol-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonil)heksozid                          |
| 5               | 5,90          | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup> | 609,14611                           | 609,14636                      | 0,41           | 581(10), 489(10), 447(80), <b>285</b> (100)  |               | Kampferol-3,7-di- <i>O</i> -heksozid  |
| 6               | 5,91          | C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> O <sub>21</sub> <sup>-</sup> | 785,21458                           | 785,21509                      | 0,65           | <b>623</b> (100), 477(10), 315(5)  |               | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid |
| 7               | 5,96          | C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup> | 639,15667                           | 639,15717                      | 0,78           | 611(5), 519(10), 477(40), 459(5), 357(5), <b>315</b> (100), 300(10)                      |               | Izoramnetin-3,7-di- <i>O</i> -heksozid  |
| 8               | 5,98          | C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>21</sub> <sup>-</sup> | 771,19893                           | 771,20056                      | 2,11           | 753(10), <b>625</b> (100), 609(30), 591(40), 573(15), 445(10), 427(10), 301(45), 300(50) |               | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid-7- <i>O</i> -ramnozid   |
| 9               | 6,00          | C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup> | 595,13046                           | 595,13098                      | 0,87           | 475(10), 463(10), 445(15), 301(45), <b>300</b> (100), 299(10)                            |               | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                         |
| 10              | 6,02          | C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup> | 639,15667                           | 639,15784                      | 1,83           | 624(15), 519(15), 477(20), 459(65), <b>315</b> (100), 314(50), 300(40), 299(45)          |               | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid                       |
| 11              | 6,04          | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup> | 609,14611                           | 609,14642                      | 0,51           | 489(15), 463(10), 445(20), 429(10), 343(5), 301(20), <b>300</b> (100), 271(20), 255(10)  |               | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                         |
| 12              | 6,07          | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup> | 609,14611                           | 609,14697                      | 1,41           | 447(10), <b>429</b> (100), 285(70), 284(90)  |               | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid                         |

Tabela 7. Nastavak

| Redni broj pika | $t_R$ , (min) | Molekulska formula, $[M-H]^-$ | Izračunata masa, $[M-H]^-$ | Tačna masa, $[M-H]^-$ | $\Delta$ (ppm) | MS/MS Fragmentacija (%)  | Identifikacija  |
|-----------------|---------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------|--|---|
| 13              | 6,19          | $C_{33}H_{39}O_{20}^-$        | 755,20402                  | 755,20471             | 0,91           | <b>609</b> (100), 593(95), 575(90), 447(5), 429(20), 285(90), 284(70)                    | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid-7- <i>O</i> -ramnozid |
| 14              | 6,22          | $C_{28}H_{31}O_{16}^-$        | 623,16176                  | 623,16211             | 0,56           | 608(15), 503(10), 477(10), 459(30), 444(10), 315(15), <b>314</b> (100), 300(15), 299(60) | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid izomer 1            |
| 15              | 6,24          | $C_{27}H_{29}O_{16}^-$        | 609,14611                  | 609,14679             | 1,12           | 343(10), <b>301</b> (100), 300(20), 271(10), 255(10), 179(5)                             | Kvercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                       |
| 16              | 6,26          | $C_{27}H_{29}O_{16}^-$        | 609,14611                  | 609,14716             | 1,72           | 577(10), 489(5), 477(5), 459(50), <b>315</b> (100), 314(90), 300(20), 299(30)            | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                     |
| 17              | 6,28          | $C_{27}H_{29}O_{15}^-$        | 593,15119                  | 593,15161             | 0,71           | 473(5), 447(10), 429(50), 285(40), <b>284</b> (100), 255(30)                             | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                       |
| 18              | 6,30          | $C_{26}H_{27}O_{15}^-$        | 579,13554                  | 579,13678             | 2,14           | 459(5), 447(20), 429(60), 327(10), 285(75), <b>284</b> (100)                             | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                       |
| 19              | 6,34          | $C_{28}H_{31}O_{16}^-$        | 623,16176                  | 623,16248             | 1,16           | 591(10), 503(10), 477(10), 459(25), 315(35), <b>314</b> (100), 300(10), 299(30)          | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid izomer 2            |
| 20              | 6,39          | $C_{21}H_{19}O_{12}^-$        | 463,08820                  | 463,08951             | 2,83           | <b>301</b> (100), 300(20)  | Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid   |
| 21              | 6,43          | $C_{27}H_{29}O_{16}^-$        | 609,14611                  | 609,14697             | 1,41           | <b>315</b> (100), 300(20)  | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                     |
| 22              | 6,54          | $C_{24}H_{21}O_{15}^-$        | 549,08859                  | 549,08923             | 1,17           | <b>505</b> (100), 301(5)   | Kvercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonil)heksozid                        |
| 23              | 6,57          | $C_{28}H_{31}O_{16}^-$        | 623,16176                  | 623,16272             | 1,54           | <b>315</b> (100), 314(10), 300(20)   | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                     |
| 24              | 6,65          | $C_{22}H_{21}O_{12}^-$        | 477,10385                  | 477,10477             | 1,93           | 462(20), <b>315</b> (100), 314(20), 300(20), 299(10)                                     | Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid izomer 1                                    |
| 25              | 6,70          | $C_{21}H_{19}O_{11}^-$        | 447,09329                  | 447,09424             | 2,12           | 327(20), 285(80), <b>284</b> (100)   | Kampferol-3- <i>O</i> -heksozid   |
| 26              | 6,78          | $C_{22}H_{21}O_{12}^-$        | 477,10385                  | 477,10437             | 1,09           | 449(5), 357(15), 315(30), <b>314</b> (100)   | Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid izomer 2                                    |
| 27              | 6,86          | $C_{25}H_{23}O_{15}^-$        | 563,10424                  | 563,10486             | 1,10           | <b>519</b> (100), 315(5)   | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonil)heksozid                      |

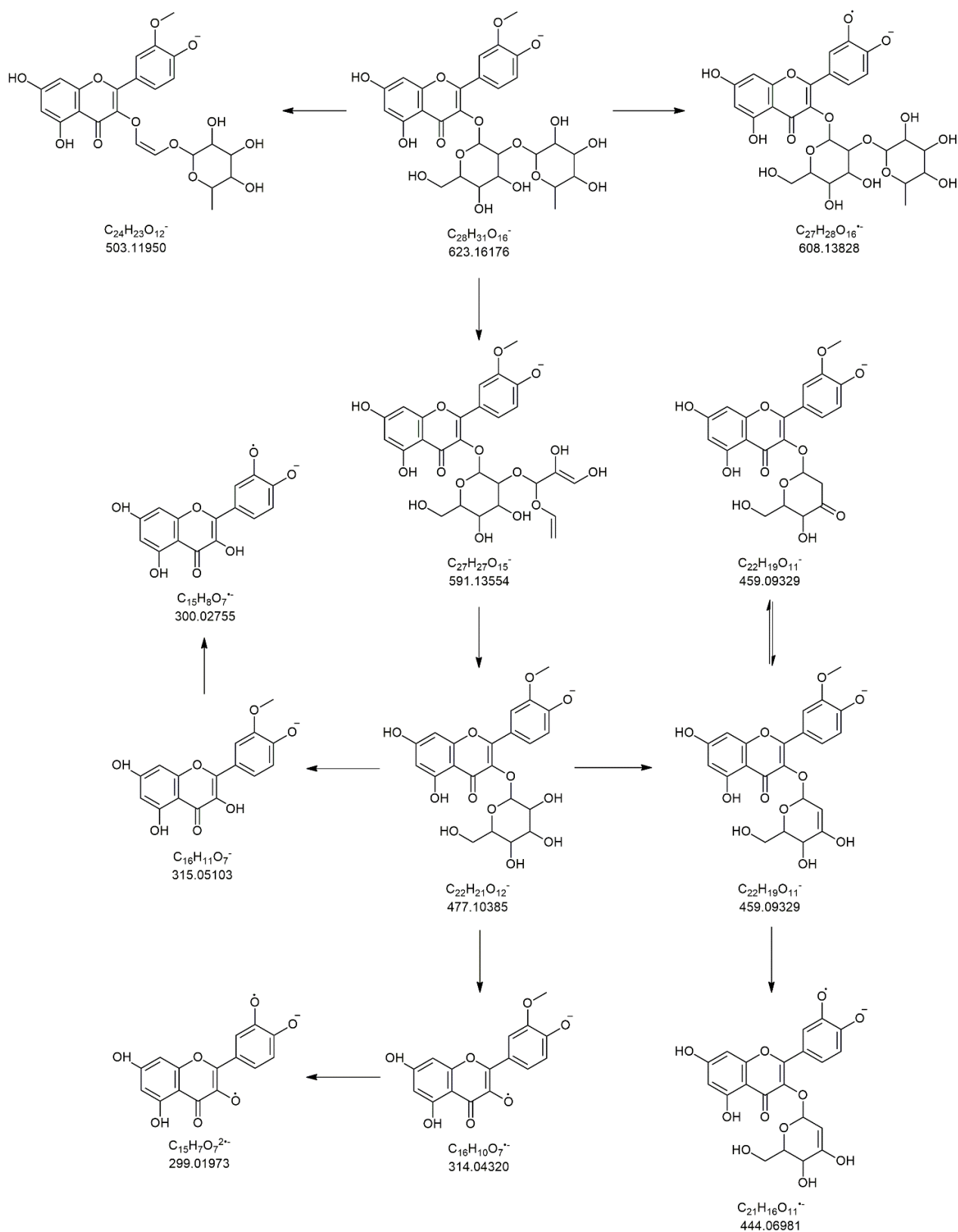
Molekulski jon  $[M-H]^-$  jedinjenja 25 iznosi 447  $m/z$ . MS/MS fragmentacija datog jona dalje proizvodi fragmentacioni jon  $Y_0^-$  285  $m/z$  ( $[M-H-162]^-$ ) zajedno sa formiranjem radikalskog anjona  $[Y_0-H]^-$  koji iznosi 284  $m/z$ . Uočen je i fragment na 327  $m/z$  koji potiče od takozvane  $^{0,2}X^-$  fragmentacije glikozidnog dela (šećera), opisane u literaturi (March et al. 2006). Dobijeni spektralni podaci potvrđuju da je jedinjenje 25, kampferol-3-*O*-glukozid ili astragalín. Prisustvo ovog jedinjenja je takođe potvrđeno poređenjem sa odgovarajućim analitičkim standardom.

Strukture jedinjenja 24 i 26, označenih kao dva derivata izoramnetin-3-*O*-heksozida, koja daju molekulski jon  $[M-H]^-$  477  $m/z$ , ustanovljene su na osnovu prisustva fragmentacionog jona  $Y_0^-$  315  $m/z$  i radikalskog anjona  $[Y_0-H]^-$  314  $m/z$ . Fragmentacioni jon 449  $m/z$  prisutan u masenom spektru jedinjenja 26, nastao je gubitkom malog neutralnog molekula CO  $[M-H-28]^-$ .

Posmatranjem masenog spektra jedinjenja 20, uočava se prisustvo molekulskog jona  $[M-H]^-$  463  $m/z$ . Dalja fragmentacija ovog jona dovodi do nastajanja fragmentacionog jona  $Y_0^-$  301  $m/z$  ( $[M-H-162]^-$ ) i radikalskog anjona  $[Y_0-H]^-$  300  $m/z$ , što ukazuje na gubitak heksozil glikozidnog dela i prisustvo kvercetina kao aglikona. Predloženo je stoga da je jedinjenje 20, kvercetin-3-*O*-galaktozid ili hiperozid, što je takođe potvrđeno i poređenjem sa odgovarajućim analitičkim standardom.

Uporednom analizom masenih spektara jedinjenja 4 ( $[M-H]^-$  533  $m/z$ ), 22 ( $[M-H]^-$  549  $m/z$ ) i 27 ( $[M-H]^-$  563  $m/z$ ) primećen je sličan obrazac fragmentacije. Dati obrazac podrazumeva nastanak specifičnog fragmentacionog jona  $[M-H-44]^-$ , što dalje ukazuje na prisustvo karboksilne grupe, odnosno malonil-ostatka (Mihajlovic et al. 2015). Detaljnije ispitivanje masenog spektra i molekulskih formula ovih jedinjenja omogućilo je identifikaciju ovih glikozida kao kampferol-3-*O*-(6''-*O*-malonil)heksozid, kvercetin-3-*O*-(6''-*O*-malonil)heksozid i izoramnetin-3-*O*-(6''-*O*-malonil)heksozid, redom.

Maseni spektri jedinjenja 11 ( $[M-H]^-$  609  $m/z$ ), 14 ( $[M-H]^-$  623  $m/z$ ), 15 ( $[M-H]^-$  609  $m/z$ ), 17 ( $[M-H]^-$  593  $m/z$ ), 19 ( $[M-H]^-$  623  $m/z$ ) i 23 ( $[M-H]^-$  623  $m/z$ ) sadrže fragmentacioni jon  $Y_0^-$   $[M-H-308]^-$  nastao gubitkom ramnozil-heksozidnog ostatka. U MS/MS spektrima ovih jedinjenja takođe se može uočiti prisustvo radikalskih anjona  $[Y_0-H]^-$  većeg intenziteta, koji su karakteristični za 3-*O*-glikozide (Cuyckens et al. 2001). Veća relativna zastupljenost radikalskog anjona  $[Y_0-H]^-$  u odnosu na deprotonovani  $Y_0^-$  jon karakteristična je za spektre jedinjenja 11, 14, 17 i 19. Pored toga, fragmentacioni joni koji potiču od  $^{0,2}X^-$  fragmentacije terminalnog ostatka ramnoze  $[M-H-120]^-$ , zajedno sa formiranjem jona  $[M-H-164]^-$  nastalog gubitkom molekula ramnoze, takođe su prisutni u masenim spektrima ovih jedinjenja, dok u spektrima jedinjenja 15 i 23 nisu primećeni. To dalje navodi na zaključak da je interglikozidna veza prisutna kod jedinjenja 11, 14, 17 i 19 tipa 1→2, dok je kod jedinjenja 15 i 23, 1→6 interglikozidna veza (Zhang et al. 2015). Na osnovu ovih razmatranja, jedinjenja 11, 14, 17 i 19 mogu biti identifikovana kao: kvercetin-3-*O*-(2''-*O*-ramnozil)heksozid; izoramnetin-3-*O*-(2''-*O*-ramnozil)heksozid, izomer 1; kampferol-3-*O*-(2''-*O*-ramnozil)heksozid; i izoramnetin-3-*O*-(2''-*O*-ramnozil)heksozid, izomer 2, redom. Kao primer, predloženi putevi fragmentacije izomernih jedinjenja 14 i 19 prikazani su na Slici 31.



Slika 31. Predloženi fragmentacioni put jedinjenja 14 i 19.

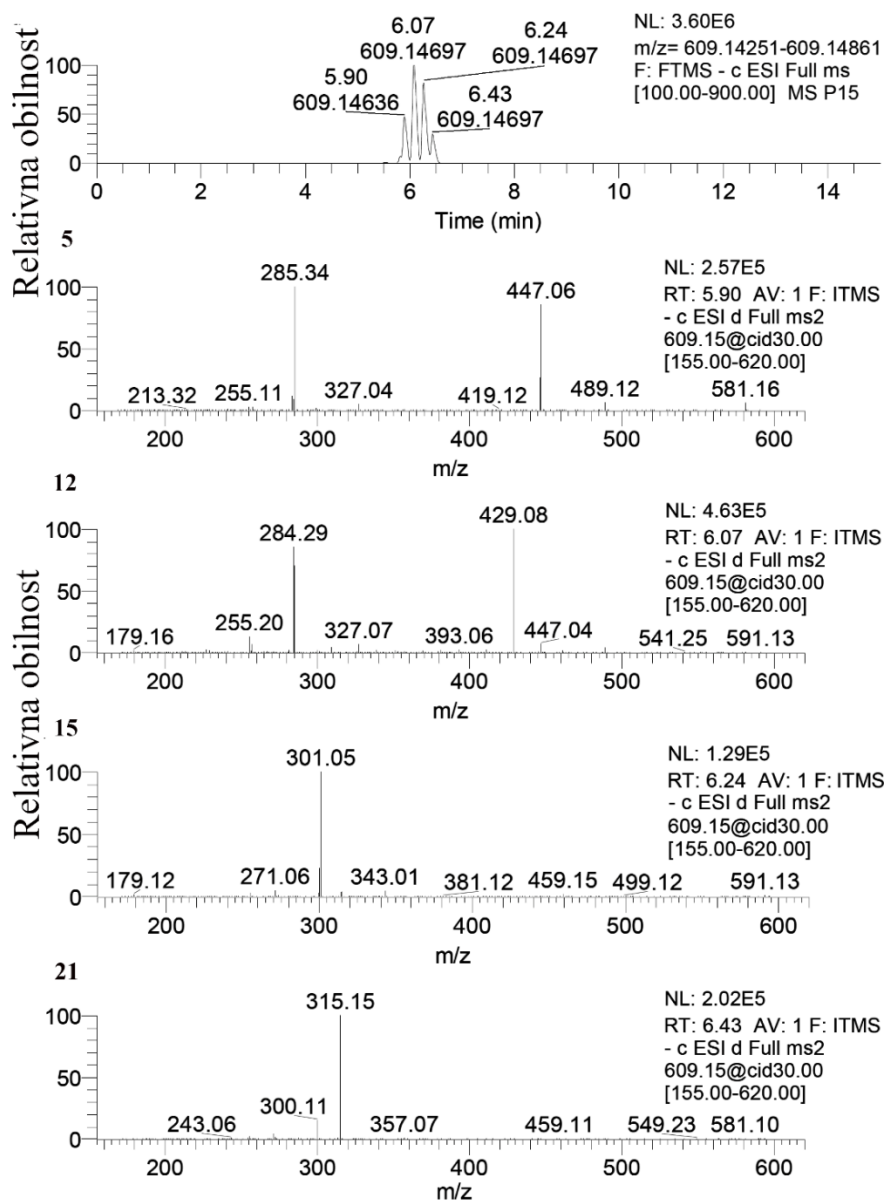
Jedinjenje 23 je na osnovu svojih spektralnih karakteristika identifikovano kao izoramnetin-3-*O*-(6''-*O*-ramnozil)heksozid, dok je jedinjenje 15 označeno kao kvercetin-3-*O*-(6''-*O*-ramnozil)glukozid ili rutin, što je takođe potvrđeno standardom.

Fragmentacioni obrazac jedinjenja 3 ( $[M-H]^-$  625  $m/z$ ), 10 ( $[M-H]^-$  639  $m/z$ ) i 12 ( $[M-H]^-$  609  $m/z$ ) u režimu negativne jonizacije, sadrži fragmentacioni jon  $Y_0^-$  i radikalski anjon  $[Y_0-H]^-$ , što ukazuje na gubitak dve jedinice heksoze. Fragmenti nastali gubitkom heksozil-ostatka ( $[M-H-162]^-$ ) i heksozil-ostatka zajedno sa  $H_2O$  molekulom ( $[M-H-162-18]^-$ ) karakteristični su za jedinjenja u kojima su šećerne komponente povezane jedna sa drugom (a ne direktno sa aglikonom). U masenim spektrima ovih jedinjenja su takođe prisutni i fragmentacioni joni nastali  $^{0,2}X^-$  fragmentacijom terminalnog heksozil-ostatka ( $[M-H-120]^-$ ). Ove informacije su omogućile da se utvrdi da su jedinjenja 3, 10 i 12, 3-*O*-(2''-*O*-heksozil)heksozidi kvercetina, izoramnetina i kampferola, redom (Ablajan et al. 2006).

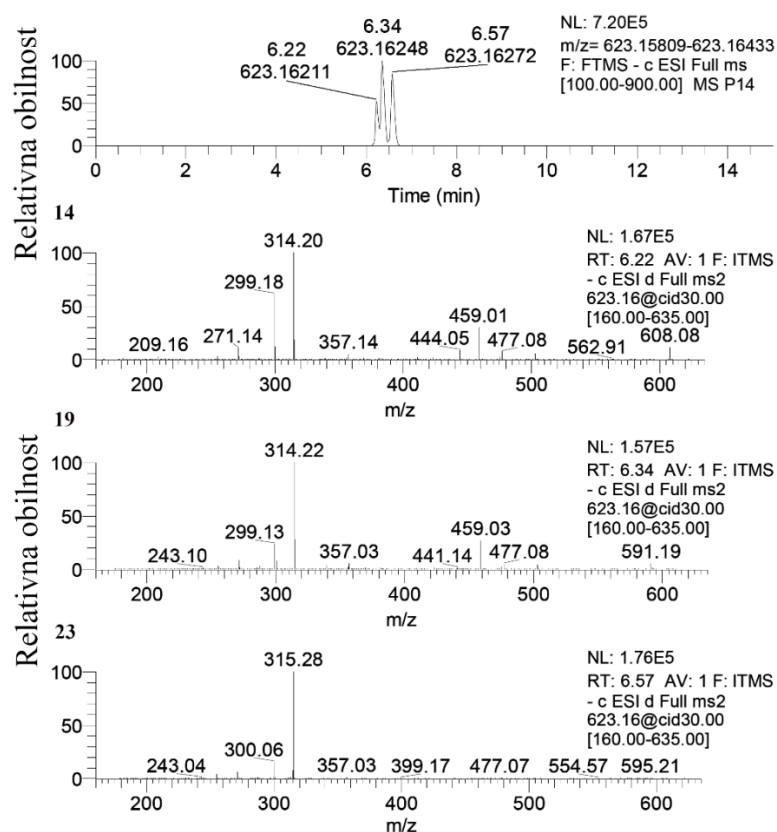
Jedinjenja 9 ( $[M-H]^-$  595  $m/z$ ), 16 ( $[M-H]^-$  609  $m/z$ ) i 18 ( $[M-H]^-$  579  $m/z$ ) imaju slične obrasce fragmentacije. Prisustvo fragmentacionih jona  $Y_0^-$  koji iznose 301  $m/z$ , 315  $m/z$  i 285  $m/z$  ukazuje na to da su u ovim jedinjenjima aglikoni kvercetin, kampferol i izoramnetin, redom. Takođe sugerše i na uzastopne gubitke pentozil-grupe (132 Da) i heksozil-grupe (162 Da). Prema prisustvu karakterističnih fragmenata ( $[M-H-120]^-$ ,  $[M-H-132]^-$  i  $[M-H-132-18]^-$ ) u MS/MS spektrima, ova jedinjenja su označena kao 3-*O*-(2''-*O*-pentozil)heksozidi kvercetina, izoramnetina i kampferola, redom.

Jedinjenje 21 ( $[M-H]^-$  609  $m/z$ ) je izomer jedinjenja 16. U masenim spektrima jedinjenja 21 primećen je samo  $Y_0^-$  jon 315  $m/z$ , što ukazuje na 1→6 interglikozidnu vezu između šećera. Na osnovu datih činjenica je utvrđeno da je jedinjenje 21 izoramnetin-3-*O*-(6''-*O*-pentozil)heksozid.

U negativnom jonizacionom modu, MS/MS spektri jedinjenja 1 ( $[M-H]^-$  625  $m/z$ ), 5 ( $[M-H]^-$  609  $m/z$ ) i 7 ( $[M-H]^-$  639  $m/z$ ) pokazuju visok intenzitet MS/MS fragmentacionih jona  $[M-H-162]^-$  koji iznose 463  $m/z$ , 447  $m/z$  i 477  $m/z$ , redom, što odgovara gubitku heksoze u poziciji C-3 ili C-7. Na osnovu ovakvog fragmentacionog obrasca predložena identifikacija za jedinjenja 1, 5 i 7 je: kvercetin-3,7-di-*O*-heksozid, kampferol-3,7-di-*O*-heksozid i izoramnetin-3,7-di-*O*-heksozid, redom (F. Ferreres et al. 2017).



**Slika 32.** Izomerna jedinjenja identične mase ( $609\text{ m/z}$ ), bliska po retenciji, identifikovana na osnovu različitih masenih spektara: kampferol-3,7-di-*O*-heksozid (5), kampferol-3-*O*-(2"-*O*-heksozil)heksozid (12), kvercetin-3-*O*-(6"-*O*-ramnozil)heksozid (15), izoramnetin-3-*O*-(6"-*O*-pentozil)heksozid (21).



**Slika 33.** Identifikacija izomernih jedinjenja identične mase ( $623\text{ m/z}$ ), bliskih po retenciji, na osnovu različitih masenih spektara: izoramnetin-3-*O*-(2"-*O*-ramnozil)heksozid izomer 1 (14), izoramnetin-3-*O*-(2"-*O*-ramnozil)heksozid izomer 2 (19), izoramnetin-3-*O*-(6"-*O*-ramnozil)heksozid (23).

Jedinjenja 2 ( $[M-H]^- 771\text{ m/z}$ ), 6 ( $[M-H]^- 785\text{ m/z}$ ), 8 ( $[M-H]^- 771\text{ m/z}$ ) i 13 ( $[M-H]^- 755\text{ m/z}$ ) su triglikozidi. MS/MS spektri ovih jedinjenja sadrže fragment  $[M-H-146-162-162]^-$  koji odgovara vrednostima aglikona i nastaje gubitkom dva heksozil-ostatka i jednog deoksiheksozil-(ramnozil-) ostatka. Karakteristični fragmenti u MS/MS spektrima jedinjenja 8 i 13, koji iznose  $625\text{ m/z}$  i  $609\text{ m/z}$ , ukazuju na gubitak ramnozil-ostatka vezanog za hidroksilnu grupu sa pozicije C-7 (Gonzales et al. 2014). Takođe su prisutni i fragmenti  $[M-H-146-162-18]^-$  vrednosti  $445\text{ m/z}$  i  $429\text{ m/z}$ . Prema tome, predložene strukture jedinjenja 8 i 13 su 3-*O*-(2"-*O*-heksozil)heksozid-7-*O*-ramnozidi kvercetina i kampferola, redom (Rösch et al. 2004; Goupy et al. 2013). Jedinjenje 2 je izomer jedinjenja 8. Međutim, fragmentacioni joni  $Y_0^-$  koji iznose  $301\text{ m/z}$  (deprotonovani kvercetin) i  $609\text{ m/z}$  ( $[M-H-162]^-$ ), ukazuju na to da struktura datog jedinjenja odgovara jedinjenju 15 sa još jednom heksozom. Stoga je jedinjenje 2 označeno kao kvercetin-3-*O*-(6"-*O*-ramnozil)heksozid-7-*O*-heksozid. Predložena struktura jedinjenja 6 je izoramnetin-3-*O*-(6"-*O*-ramnozil)heksozid-7-*O*-heksozid, zbog sličnih spektralnih karakteristika sa jedinjenjem 2 (Larbat et al. 2014).

Analizirani uzorci pčelinjeg polena predstavljaju mešavine više od deset različitih tipova cvetnog polena, tako da je prisustvo dvadeset sedam identifikovanih flavonolnih glikozida očekivano (Tabela 7). Svaki od analiziranih uzoraka sadrži više od četrnaest flavonol-glikozida, osim monofloralnog uzorka 20 (sa preovlađujućim *Sophora* tipom polena) u kojem je prisutno dvanaest jedinjenja iz ove klase. Najveći broj flavonol-glikozida (ukupno 25) identifikovan je u uzorku 11 (bifloralni uzorak sa preovlađujućim Rosaceae tipom polena) (Tabela 8).

Tabela 8. Prisustvo identifikovanih glikozida u uzorcima pčelinjeg polena

| Broj pika | Flavonol glikozidi  | Uzorci pčelinjeg polena |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------|---|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|           |   | 1                       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| 1         | Kvercetin-3,7-di- <i>O</i> -heksozid  | -                       | - | - | - | - | + | - | - | - | +  | -  | +  | -  | -  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | -  | +  |    |
| 2         | Kvercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid   | +                       | + | - | + | + | + | + | + | - | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 3         | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid                         | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 4         | Kampferol-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonil)heksozid                          | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 5         | Kampferol-3,7-di- <i>O</i> -heksozid  | +                       | + | + | + | + | - | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | +  | -  |    |
| 6         | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid-7- <i>O</i> -heksozid | -                       | + | + | + | - | + | + | - | - | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 7         | Izoramnetin-3,7-di- <i>O</i> -heksozid  | -                       | - | - | - | - | + | - | - | + | +  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 8         | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid-7- <i>O</i> -ramnozil   | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  |    |
| 9         | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                         | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 10        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid                       | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | -  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  |    |
| 11        | Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                         | -                       | + | + | + | + | + | - | - | + | +  | +  | -  | -  | -  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 12        | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid                         | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  | +  | +  |    |
| 13        | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -heksozil)heksozid-7- <i>O</i> -ramnozil   | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | +  |    |
| 14        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid izomer 1              | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | +  |    |
| 15        | Kvercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                         | -                       | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | +  | -  |    |
| 16        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                       | -                       | - | - | - | - | + | - | - | - | -  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | -  | -  | +  |    |
| 17        | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                         | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 18        | Kampferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                         | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  |    |
| 19        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid izomer 2              | -                       | + | + | + | + | + | - | + | + | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 20        | Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid   | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 21        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -pentozil)heksozid                       | -                       | - | + | + | + | - | - | - | - | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |
| 22        | Kvercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonil)heksozid                          | +                       | + | + | + | - | + | - | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 23        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil)heksozid                       | -                       | - | - | - | - | + | + | - | - | +  | +  | +  | -  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 24        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid izomer 1                                      | +                       | + | + | + | + | - | + | + | + | +  | +  | -  | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  |    |
| 25        | Kampferol-3- <i>O</i> -heksozid   | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  |    |
| 26        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid izomer 2                                      | -                       | + | + | + | - | + | + | + | - | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |
| 27        | Izoramnetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonil)heksozid                        | +                       | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | -  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |    |

+ Označava identifikovane glikozide; - označava neidentifikovane glikozide.

Jedinjenja 2, 6, 7, 8, 9, 13, 16 i 21 su po prvi put identifikovana u uzorcima pčelinjeg polena. Jedinjenja 3, 4, 17 i 20 su prisutna u svim analiziranim uzorcima (Tabela 8). Kvantifikacija ovih jedinjenja bi potencijalno doprinela identifikaciji tipova cvetnog polena, korišćenjem flavonol-glikozida kao markera za klasifikaciju polena različitih biljnih vrsta (Zhou et al. 2015). U ovom trenutku takva analiza nije sprovedena zbog nedostatka odgovarajućih standardnih jedinjenja. Karakterizacija pčelinjeg polena, u smislu tipa polena koji ulazi u njegov sastav, bila bi lakša kada bi bila izvršena selekcija granula pčelinjeg polena na osnovu boje i veličine, s obzirom da je dokazano da određene vrste granula pčelinjeg polena sadrže polen iz jednog cvetnog izvora (M. Campos et al. 1997). Međutim, u našem istraživanju opredelili smo se za mešavine jer se pčelinji polen u ovom obliku plasira na tržište. Razdvajanje na familije predstavljalo bi dugotrajan posao koji bi svakako bio neisplativ za pčelare.

#### 4.1.4 Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost uzoraka pčelinjeg polena

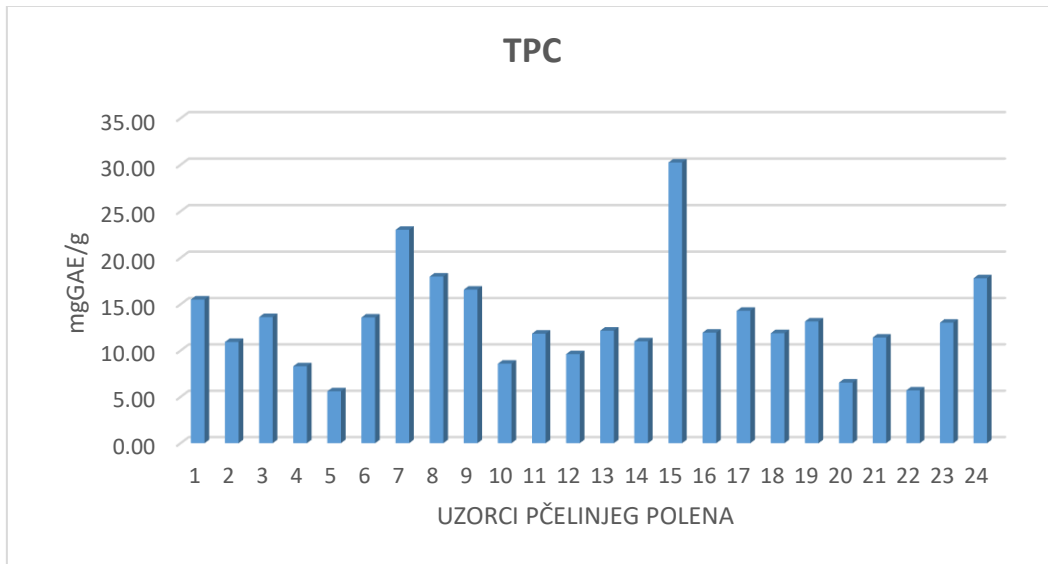
Uzorci pčelinjeg polena okarakterisani su vrednostima TPC u rasponu između 5,60 mg GAE/g i 30,24 mg GAE/g pčelinjeg polena (Tabela 9). Grafički prikaz TPC vrednosti analiziranih uzoraka dat je na Slici 34 a. Najviši nivo ukupnih polifenolnih jedinjenja utvrđen je u uzorku **15** (sa najdominantnijim sporama gljiva), a najniži u uzorku **5** (sa preovlađujućim Fabaceae tipom polena). Generalno, svi uzorci sa Fabaceae dominantnim tipom polena pokazali su niže TPC vrednosti. Pored toga, niske nivoe ukupnih polifenolnih jedinjenja imali su i uzorci sa preovlađujućim *Sophora* tipom polena. Raspon sadržaja fenolnih jedinjenja bio je širi u odnosu na ranije objavljene rezultate. Vrednosti TPC, dobijene analizom dvanaest uzoraka pčelinjeg polena iz oblasti Transilvanije u Rumuniji, iznosile su između 4,4 mg GAE/g i 16,4 mg GAE/g, dok je, za deset analiziranih uzoraka pčelinjeg polena iz Turske taj opseg bio od 5,09 mg GAE/g do 17,46 mg GAE/g (Mărghitaş et al. 2009; Kalaycıoğlu et al. 2017). Pored toga, maksimalna vrednost ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja, određena u našoj studiji, bila je viša od vrednosti objavljenih za pčelinji polen iz pet portugalskih prirodnih parkova, koje su iznosile 10,5 mg GAE/g -16,8 mg GAE/g. (Morais et al. 2011) U studijama sprovedenim od strane autora koji su analizirali uzorke iz pustinje Sonora i pčelinjeg polena iz Portugalije i Španije dobijene su neznatno više vrednosti ukupnog sadržaja polifenola, koje su obuhvatale opsege, između 15,91 mg GAE/g i 34,85 mg GAE/g, i 18,54 mg GAE/g i 32,15 mg GAE/g, redom (LeBlanc et al. 2009; Pascoal et al. 2014). Razlike između TPC vrednosti uočene poređenjem navedenih studija mogu se pripisati različitom biljnom i geografskom poreklu analiziranih uzoraka pčelinjeg polena.

Tabela 9. TPC i RSA uzoraka pčelinjeg polena

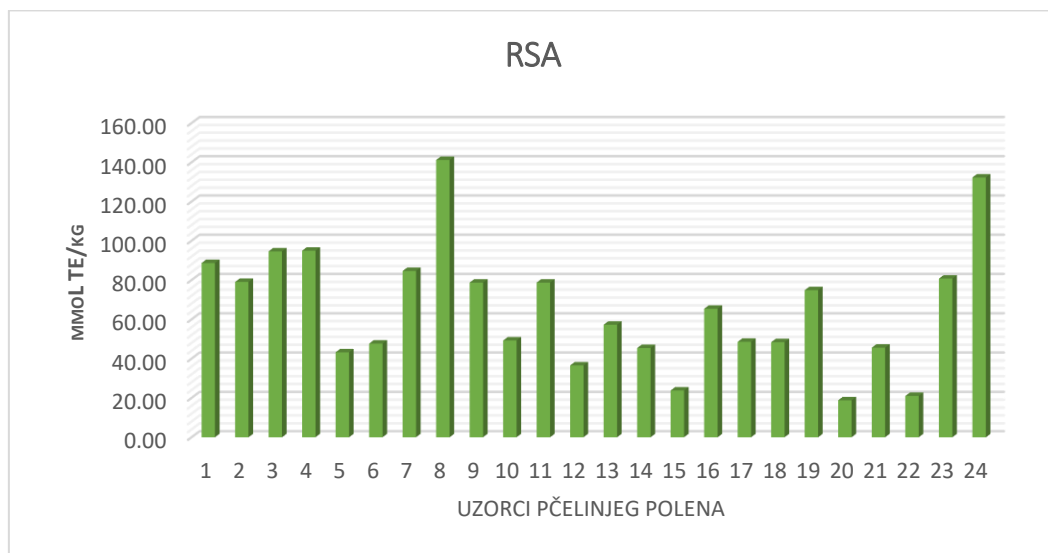
| Uzorci<br>pčelinjeg<br>polena | TPC (mg GAE/ g) | RSA (mmol TE/ kg) |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                             | 15,50 ± 0,15    | 88,67 ± 0,74      |
| 2                             | 10,92 ± 0,14    | 79,03 ± 0,98      |
| 3                             | 13,61 ± 0,11    | 94,58 ± 0,37      |
| 4                             | 8,303 ± 0,059   | 94,97 ± 0,82      |
| 5                             | 5,60 ± 0,35     | 43,20 ± 0,74      |
| 6                             | 13,56 ± 0,18    | 47,64 ± 0,98      |
| 7                             | 23,00 ± 0,35    | 84,60 ± 0,77      |
| 8                             | 17,98 ± 0,38    | 141,2 ± 1,8       |
| 9                             | 16,57 ± 0,12    | 78,69 ± 0,34      |
| 10                            | 8,581 ± 0,088   | 49,25 ± 0,40      |
| 11                            | 11,82 ± 0,17    | 78,69 ± 0,22      |
| 12                            | 9,607 ± 0,029   | 36,55 ± 0,27      |
| 13                            | 12,146 ± 0,039  | 57,25 ± 0,43      |
| 14                            | 10,990 ± 0,069  | 45,42 ± 0,56      |
| 15                            | 30,244 ± 0,049  | 23,80 ± 0,18      |
| 16                            | 11,928 ± 0,098  | 65,38 ± 0,74      |
| 17                            | 14,29 ± 0,29    | 48,56 ± 0,92      |
| 18                            | 11,872 ± 0,078  | 48,38 ± 0,37      |
| 19                            | 13,13 ± 0,23    | 74,81 ± 0,72      |
| 20                            | 6,54 ± 0,29     | 18,81 ± 0,69      |
| 21                            | 11,402 ± 0,084  | 45,61 ± 0,19      |
| 22                            | 5,70 ± 0,11     | 21,03 ± 0,24      |
| 23                            | 13,00 ± 0,22    | 80,72 ± 0,40      |
| 24                            | 17,79 ± 0,13    | 132,3 ± 1,6       |

Rezultati antioksidativne aktivnosti određeni DPPH testom dati su u Tabeli 9 i prikazani grafički na Slici 34 b. Dobijene vrednosti RSA kretale su se u rasponu od 18,811 mmol TE/ kg do 141,200 mmol TE/ kg uzorka pčelinjeg polena i upoređive su sa rezultatima istraživanja kojim su bila obuhvaćena trideset dva uzorka pčelinjeg polena sa teritorije Italije, čije su RSA vrednosti bile u opsegu od 11,9 mmol TE/ kg do 134,7 mmol TE/ kg (Rocchetti et al. 2019). Uzorak **8** sa dominantnim polenom tipa Brassicaceae bio je najaktivniji, dok je uzorak **20**, sa dominantnim tipom polena *Sophora*, imao najnižu antioksidativnu aktivnost. Prethodno određena TPC vrednost za uzorak **20** je takođe bila izuzetno niska u poređenju sa ostalim uzorcima, dok je TPC vrednost za uzorak **8** među najvišima. Međutim, na primeru uzorka **15** uočava se suprotno, tj. RSA vrednost je izuzetno niska iako je ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja u ovom uzorku najviši. Na osnovu rezultata regresione analize tj. vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije, koja je u slučaju poređenja vrednosti TPC i RSA svih analiziranih uzoraka bila izuzetno niska ( $r = 0,0826$ ), može se zaključiti da između ovih parametara ne postoji linearna korelacija. Autori istraživanja sprovedenog u cilju upoređivanja rezultata različitih spektrofotometrijskih testova za određivanje RSA i TPC dvanaest uzoraka pčelinjeg polena, došli su do istih zaključaka koji ukazuju na to da visok antioksidativni kapacitet nije nužno uslovljen visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja (Mărghitaş et al. 2009). Takođe su utvrdili da postoji bolja međuzavisnost između ukupnog sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti. Međutim, poznato je da samo flavonoidi određene strukture sa posebno pozicioniranim hidroksilnim grupama određuju antioksidativna svojstva koja zavise od sposobnosti doniranja vodonika ili elektrona slobodnom radikalumu (Pietta 2000; Rice-Evans, Miller, and Paganga 1996; Platzer et al.

2022; Rzepecka-Stojko et al. 2015). S tim u vezi može se zaključiti da je antioksidativni kapacitet uzoraka pčelinjeg polena povezan sa prisustvom specifičnih polifenolnih jedinjenja i da je za potpuniju karakterizaciju uzoraka, odnosno razjašnjavanje njihovih međusobnih razlika, poželjno izdvajanje i identifikacija datih jedinjenja.



a



b

**Slika 34.** TPC (a) i RSA (b) uzoraka pčelinjeg polena

## **4.2 Usporedna analiza pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda**

### **4.2.1 Autentičnost uzoraka meda**

Potvrda porekla analiziranih uzoraka meda, u pogledu proizvodnje i autentičnosti, izvršena je analizom fizičko-hemijskih parametara prema Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela (“Službeni glasnik RS”, br. 101/2015) u Laboratoriji za ispitivanje autentičnosti hrane “InovaLab” (Inovacioni centar Hemijskog fakulteta u Beogradu d.o.o.). U okviru InovaLaba prethodno je analizirano više od hiljadu različitih uzoraka meda iz Pogona za prikupljanje i plasman meda pčelara SPOS-a, „NAŠ MED“ d. o. o. (Ul. Solunskih ratnika br. 2, 34210 Rača). Svi uzorci iz Pogona ispunjavali su zahteve standarda kvaliteta “Dobra pčelarska praksa” koji podrazumeva primenu adekvatnog stručnog rada sa pčelama od strane pčelara, razvijenog u cilju zaštite bezbednosti proizvoda i sprečavanja svakog mogućeg zagađenja istog (<https://spos.info>). Među analiziranim uzorcima meda bili su autentični uzorci određenih vrsta, kao što su, između ostalih, bagremov (*Robinia pseudoacacia*) i suncokretov (*Helianthus annuus*) med, koji spadaju u najvažnije monofloralne vrste srpskog meda, kao i livadski med koji je manje zastupljen i spada u polifloralne vrste meda. Na ovaj način je prikupljen veliki broj podataka o vrednostima parametara koji karakterišu uzorke određene biljne vrste i samim tim je proces procene kvaliteta novih uzoraka prispelih na analizu dodatno olakšan stečenim iskustvom. U uzorcima B, S, i L koji su bili predmet ove disertacije izvršena je analiza sledećih fizičko-hemijskih parametara: vlage, slobodne kiselosti (FA), električne provodljivosti (EC), aktivnosti dijastaze (DA), sadržaja hidroksimetilfurfurala (HMF), sadržaja glukoze, fruktoze i saharoze. Vrednosti određenih parametara prikazane su u Tabeli 10. Sadržaj vlage u svim uzorcima je ukazivao na odgovarajući stepen zrelosti meda, nivoi vlažnosti su bili niži od 20%, slobodna kiselost ispod 50,0 meq/ kg, električna provodljivost ispod 0,8 mS/cm, aktivnost dijastaze nije bila manja od 8 Schade jedinica, sadržaj hidroksimetilfurfurala je bio ispod 40 mg/kg meda, dok je zbirni sadržaj glukoze i fruktoze bio veći od 60 g/ 100 g i sadržaj saharoze manji od 5 g/ 100 g meda, odnosno 10 g/ 100 g meda od bagrema. Dobijeni rezultati pokazuju da sve tri ispitivane sorte meda ispunjavaju kriterijume propisane Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela u pogledu ispitivanih fizičko-hemijskih svojstava, tj. da su autentični u pogledu proizvodnje meda i da odgovaraju nektarnom ili cvetnom medu.

Tabela 10. Fizičko-hemijski parametri uzoraka meda

| Uzorci meda | Električna provodljivost (mS/ cm) | Sadržaj vlage (%) | Slobodna kiselost (meq/ kg) | Aktivnost dijastaze (DN) | HMF (mg/ kg) | Glukoza (g/ 100g) | Fruktoza (g/ 100g) | Saharoza (g/ 100g) | Glukoza + Fruktoza (g/ 100g) | Fruktoza / glukoza (g/ 100g) |
|-------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>B</b>    | 0,34 ± 0,02                       | 16,38 ± 0,68      | 12,64 ± 0,46                | 11,9 ± 3,1               | <5           | 26,2 ± 2,8        | 37,5 ± 3,8         | 4,15 ± 0,32        | 63,7 ± 4,9                   | 1,43 ± 0,13                  |
| <b>S</b>    | 0,28 ± 0,01                       | 18,38 ± 0,76      | 16,61 ± 0,60                | 10,2 ± 2,7               | 13,3 ± 2,9   | 25,4 ± 2,7        | 35,5 ± 3,6         | 0,29 ± 0,02        | 60,9 ± 4,7                   | 1,40 ± 0,12                  |
| <b>L</b>    | 0,52 ± 0,03                       | 17,20 ± 0,71      | 23,7 ± 0,85                 | 17,5 ± 4,6               | <5           | 27,8 ± 3,0        | 34,9 ± 3,6         | 0,68 ± 0,05        | 62,7 ± 4,9                   | 1,25 ± 0,11                  |

#### **4.2.2 Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti meda obogaćenog pčelinjim polenom**

Prethodnim istraživanjima je potvrđeno da su med i pčelinji polen poželjni dodaci ljudskoj ishrani zbog visoke nutritivne vrednosti i višestruke biološke aktivnosti. Iako je pčelinji polen još uvek potcenjen u odnosu na med, upravo obogaćivanje meda pčelinjim polenom može predstavljati efikasan način za uvođenja ovog proizvoda u ishranu. Med, kao hranljiva namirnica slatkog ukusa, ublažava gorak ukus pčelinjeg polena a takođe mu može produžiti i rok trajanja zahvaljujući hemijskom sastavu koji medu daje kapacitet konzervansa (Habryka, Socha, and Juszcak 2021). Mešavine pčelinjeg polena i meda plasiraju se na tržište s ciljem da se potrošačima ponudi finalni proizvod poboljšanih karakteristika. Iako je u većini objavljenih radova do sada određivan ukupan fenolni sadržaj i antioksidativna aktivnost meda i pčelinjeg polena zasebno, broj istraživanja u kojima je sprovedena analiza mešavina ova dva proizvoda je veoma ograničen. Habryka i saradnici su analizirali mešavine dobijene obogaćivanjem polifloralnog meda pčelinjim polenom u količini od 5%, 10%, 15%, 20% i 25%, dok su Juszcak i saradnici takođe ispitivali uticaj pčelinjeg polena u mešavinama sa polifloralnim medom (Habryka, Socha, and Juszcak 2021; Juszcak et al. 2016). Dodatak pčelinjeg polena, u oba slučaja, uticao je na proporcionalno poboljšanje karakteristika meda u smislu njegovog nutritivnog i bioaktivnog potencijala, ali je, s druge strane, doveo do pogoršanja u pogledu senzornih karakteristika.

U okviru ove disertacije analizirane su mešavine pčelinjeg polena i meda koje pčelari tradicionalno plasiraju na tržište Srbije. Date mešavine uglavnom sadrže pčelinji polen u količini od 20%. U direktnom razgovoru sa pčelarima dobijena je informacija da, na osnovu njihovog iskustva, ovakav sastav preparata zadovoljava potrebe potrošača u pogledu ukusa, konzistencije i terapeutskog efekta. Iz tog razloga su za ovo istraživanje odabrane mešavine pomenutog sastava, ali takođe i mešavine sa višim udelom pčelinjeg polena u medu (30%, takođe prisutne na tržištu), kako bi se napravilo poređenje njihovih, pre svega, bioloških aktivnosti. Za pripremu mešavina sa pčelinjim polenom korišćena su dva uzorka monofloralnog meda (med od bagrema i med od suncokreta) i jedan uzorak polifloralnog meda (livadski med) kako bi se takođe, izvršila i provera uticaja vrste meda na kvalitet pripremljenih mešavina. Na osnovu dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da je antioksidativna aktivnost u vezi za bojom, odnosno vrstom uzoraka meda, tj. da tamniji medovi (polifloralni, medljikovci) imaju viši antioksidativni potencijal od svetlijih medova (kakva je većina monofloralnih), te se stoga polifloralnim vrstama meda daje prednost kada su u pitanju problemi sa prehladom i slično (Pita-Calvo and Vázquez 2017; Alves et al. 2013; Vasić et al. 2019). Međutim, najomiljeniji među potrošačima je med od bagrama uprkos činjenici da je sadržaj polifenola u njemu relativno nizak. S tim u vezi, efekti njegovog obogaćivanja pčelinjim polenom, pored uticaja na bioaktivni potencijal, mogu biti od značaja i sa ekonomskog aspekta.

S ciljem da se omogući procena uticaja polifenolne frakcije na antioksidativni potencijal analiziranih mešavina pčelinjeg polena i meda, primenom spektrofotometrijskih metoda određene su TPC i RSA vrednosti uzoraka meda, uzoraka pčelinjeg polena, kao i meda obogaćenog polenom. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 11.

Tabela 11. Ukupan sadržaj polifenola (TPC) i antioksidativna aktivnost (RSA) ekstrakata uzoraka

| Vrsta uzorka                                     | Oznaka uzorka | TPC (mg GAE/g)     | Sr. vr. TPC $\pm$ stdev | RSA (mmol TE/kg) | Sr. vr. RSA $\pm$ stdev |
|--|---------------|--------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| Med  | B             | 0,174 $\pm$ 0,001  | 0,18 $\pm$ 0,06         | 1,70 $\pm$ 0,03  | 2,2 $\pm$ 1,4           |
|  | S             | 0,119 $\pm$ 0,004  |                         | 1,16 $\pm$ 0,45  |                         |
|  | L             | 0,248 $\pm$ 0,001  |                         | 3,73 $\pm$ 0,92  |                         |
| Pčelinji polen                                   | P1            | 11,73 $\pm$ 0,18   | 11,6 $\pm$ 2,7          | 41 $\pm$ 4       | 36,8 $\pm$ 17,7         |
|  | P2            | 14,67 $\pm$ 0,16   |                         | 40,8 $\pm$ 0,1   |                         |
|  | P3            | 16,07 $\pm$ 0,25   |                         | 58 $\pm$ 6       |                         |
|  | P4            | 9,56 $\pm$ 0,01    |                         | 19,3 $\pm$ 0,3   |                         |
|  | P5            | 10,49 $\pm$ 0,03   |                         | 30,2 $\pm$ 0,9   |                         |
|  | P6            | 8,46 $\pm$ 0,11    |                         | 13 $\pm$ 2       |                         |
|  | P7            | 9,48 $\pm$ 0,04    |                         | 28,4 $\pm$ 0,1   |                         |
|  | P8            | 12,061 $\pm$ 0,025 |                         | 63,9 $\pm$ 0,7   |                         |
| Mešavine meda od bagrema sa 20% pčelinjeg polena | B1/1          | 3,88 $\pm$ 0,04    | 3,03 $\pm$ 0,55         | 6,44 $\pm$ 0,03  | 6,02 $\pm$ 0,11         |
|  | B1/2          | 2,20 $\pm$ 0,01    |                         | 6,67 $\pm$ 0,13  |                         |
|  | B1/3          | 3,65 $\pm$ 0,05    |                         | 7,83 $\pm$ 0,36  |                         |
|  | B1/4          | 2,69 $\pm$ 0,001   |                         | 4,15 $\pm$ 0,07  |                         |
|  | B1/5          | 2,82 $\pm$ 0,03    |                         | 5,01 $\pm$ 0,17  |                         |
|  | B1/6          | 2,71 $\pm$ 0,02    |                         | 2,94 $\pm$ 0,05  |                         |
|  | B1/7          | 3,02 $\pm$ 0,02    |                         | 5,57 $\pm$ 0,05  |                         |
|  | B1/8          | 3,25 $\pm$ 0,02    |                         | 9,54 $\pm$ 0,19  |                         |
| Mešavine meda od bagrema sa 30% pčelinjeg polena | B2/1          | 4,80 $\pm$ 0,08    | 4,18 $\pm$ 0,60         | 12,69 $\pm$ 0,38 | 9,69 $\pm$ 0,13         |
|  | B2/2          | 3,45 $\pm$ 0,09    |                         | 7,50 $\pm$ 0,03  |                         |
|  | B2/3          | 4,240 $\pm$ 0,001  |                         | 8,32 $\pm$ 0,12  |                         |
|  | B2/4          | 4,49 $\pm$ 0,07    |                         | 7,11 $\pm$ 0,03  |                         |
|  | B2/5          | 3,61 $\pm$ 0,09    |                         | 9,07 $\pm$ 0,26  |                         |
|  | B2/6          | 3,49 $\pm$ 0,02    |                         | 4,39 $\pm$ 0,07  |                         |
|  | B2/7          | 4,37 $\pm$ 0,05    |                         | 8,96 $\pm$ 0,29  |                         |
|  | B2/8          | 4,99 $\pm$ 0,04    |                         | 19,50 $\pm$ 0,12 |                         |

Tabela 11. Nastavak

| Vrsta uzorka  | Oznaka uzorka | TPC (mg GAE/g)    | Sr. vr. TPC $\pm$ stdev | RSA (mmol TE/kg)  | Sr. vr. RSA $\pm$ stdev |
|---|---------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| Mešavine meda od suncokreta<br>20% pčelinjeg polena | S1/1          | 3,04 $\pm$ 0,06   | 3,10 $\pm$ 0,36         | 7,98 $\pm$ 0,62   | 6,39 $\pm$ 0,22         |
|   | S1/2          | 3,15 $\pm$ 0,04   |                         | 5,14 $\pm$ 0,22   |                         |
|   | S1/3          | 3,72 $\pm$ 0,02   |                         | 7,66 $\pm$ 0,44   |                         |
|   | S1/4          | 2,90 $\pm$ 0,03   |                         | 4,93 $\pm$ 0,05   |                         |
|   | S1/5          | 3,01 $\pm$ 0,05   |                         | 5,34 $\pm$ 0,44   |                         |
|   | S1/6          | 2,60 $\pm$ 0,02   |                         | 3,30 $\pm$ 0,01   |                         |
|   | S1/7          | 2,84 $\pm$ 0,04   |                         | 5,94 $\pm$ 0,14   |                         |
|   | S1/8          | 3,50 $\pm$ 0,07   |                         | 10,86 $\pm$ 0,36  |                         |
| Mešavine meda od suncokreta<br>30% pčelinjeg polena | S2/1          | 3,470 $\pm$ 0,001 | 3,92 $\pm$ 0,03         | 10,83 $\pm$ 0,40  | 9,61 $\pm$ 0,22         |
|   | S2/2          | 3,01 $\pm$ 0,07   |                         | 5,88 $\pm$ 0,09   |                         |
|   | S2/3          | 4,71 $\pm$ 0,05   |                         | 11,04 $\pm$ 0,44  |                         |
|   | S2/4          | 3,74 $\pm$ 0,02   |                         | 6,766 $\pm$ 0,001 |                         |
|   | S2/5          | 4,15 $\pm$ 0,07   |                         | 9,73 $\pm$ 0,58   |                         |
|   | S2/6          | 3,38 $\pm$ 0,02   |                         | 4,76 $\pm$ 0,19   |                         |
|   | S2/7          | 3,89 $\pm$ 0,06   |                         | 9,32 $\pm$ 0,05   |                         |
|   | S2/8          | 4,98 $\pm$ 0,05   |                         | 18,6 $\pm$ 0,8    |                         |

Tabela 11. Nastavak

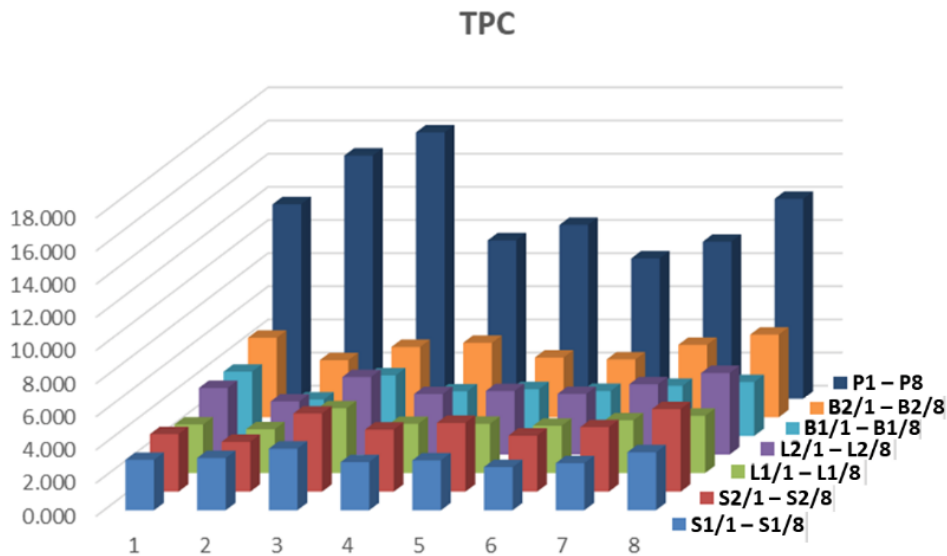
| Vrsta uzorka                                    | Oznaka uzorka | TPC (mg GAE/g)    | Sr. vr. TPC $\pm$ stdev | RSA (mmol TE/kg)  | Sr. vr. RSA $\pm$ stdev |
|---|---------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| Mešavine livadskog meda sa 20% pčelinjeg polena | L1/1          | 2,93 $\pm$ 0,04   | 3,11 $\pm$ 0,02         | 6,83 $\pm$ 0,31   | 6,96 $\pm$ 0,14         |
|   | L1/2          | 2,65 $\pm$ 0,04   |                         | 6,32 $\pm$ 0,09   |                         |
|   | L1/3          | 3,91 $\pm$ 0,05   |                         | 8,28 $\pm$ 0,09   |                         |
|   | L1/4          | 2,97 $\pm$ 0,05   |                         | 5,61 $\pm$ 0,36   |                         |
|   | L1/5          | 2,97 $\pm$ 0,02   |                         | 6,50 $\pm$ 0,27   |                         |
|   | L1/6          | 2,852 $\pm$ 0,001 |                         | 3,74 $\pm$ 0,09   |                         |
|   | L1/7          | 3,18 $\pm$ 0,05   |                         | 7,300 $\pm$ 0,001 |                         |
|   | L1/8          | 3,46 $\pm$ 0,05   |                         | 11,13 $\pm$ 0,09  |                         |
| Mešavine livadskog meda sa 30% pčelinjeg polena | L2/1          | 4,01 $\pm$ 0,04   | 4,02 $\pm$ 0,03         | 9,99 $\pm$ 0,67   | 10,11 $\pm$ 0,44        |
|   | L2/2          | 3,20 $\pm$ 0,01   |                         | 7,98 $\pm$ 0,09   |                         |
|   | L2/3          | 4,68 $\pm$ 0,01   |                         | 12 $\pm$ 1        |                         |
|   | L2/4          | 3,65 $\pm$ 0,05   |                         | 7,44 $\pm$ 0,27   |                         |
|   | L2/5          | 3,83 $\pm$ 0,01   |                         | 8,27 $\pm$ 0,22   |                         |
|   | L2/6          | 3,656 $\pm$ 0,001 |                         | 5,305 $\pm$ 0,001 |                         |
|   | L2/7          | 4,24 $\pm$ 0,06   |                         | 10,56 $\pm$ 0,27  |                         |
|   | L2/8          | 4,92 $\pm$ 0,07   |                         | 19,4 $\pm$ 1,6    |                         |

Najviše vrednosti ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja dobijene su za uzorke pčelinjeg polena, pokrivajući opseg od 8,46 mg GAE/ g do 16,07 mg GAE/ g uzorka (Tabela 11 i Slika 35). Sadržaj najvažnijih bioaktivnih jedinjenja (fenolne kiseline i flavonoidi) u pčelinjem polenu zavisi kako od vrste i porekla biljnih izvora iz kojih je dobijen, tako i od variranja klimatskih uslova (Mayda et al. 2020; Habryka, Socha, and Juszczak 2021; Thakur and Nanda 2020). Kao što je navedeno u preglednom radu autora Thakur i Nanda, TPC pčelinjeg polena može varirati između 0,50 mg GAE/ g i 213 mg GAE/ g posmatrajući uzorke sa različitih kontinenata (Thakur and Nanda 2020). Nedavno su Kostić i saradnici objavili rezultate određivanja TPC u monofloralnom pčelinjem polenu suncokreta (*Helianthus annuus* L.) koje su iznosile 2,91 - 3,82 mg GAE/ g (Kostić et al. 2019). Date vrednosti bile su niže od vrednosti ukupnog fenolnog sadržaja uzoraka pčelinjeg polena analiziranih u okviru ove disertacije. Iako su našim istraživanjem bili obuhvaćeni uzorci koji potiču iz regiona Srbije bogatog suncokretom, bili su tamni i verovatno sadržali veće količine polena drugih biljaka, što je rezultovalo višim TPC vrednostima. Vrednosti ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja dobijene za uzorke meda bile su niske u poređenju sa uzorcima pčelinjeg polena (0,12, 0,17 i 0,25 mg GAE/ g za suncokretov, bagremov i livadski med, redom), ali su u saglasnosti sa drugim objavljenim podacima ((Bertoncelj et al. 2007; Al et al. 2009; Gorjanović et al. 2013; Gašić et al. 2014; Petretto, Cossu, and Alamanni 2015). Sadržaj polifenola u medu obogaćenom pčelinjim polenom proporcionalno se povećavao sa povećanjem udela pčelinjeg polena, dostižući vrednost od 4,99 mg GAE/ g za nivo od 30% udela pčelinjeg polena u medu od bagrema (Tabela 11). Povećanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja u mešavinama pčelinjeg polena i meda, ukazuje da korišćeni aditiv (pčelinji polen), kao bogat izvor bioaktivnih supstanci, značajno podiže vrednosti nutritivnih i bioloških karakteristika meda. Dodatno, uočena je statistički značajna razlika ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja mešavina meda istog biljnog porekla obogaćenih različitim sadržajem pčelinjeg polena, što je potvrđeno rezultatima uporednog  $t$ -testa ( $t_{Stat} > t_{Crit}$ ) prikazanim u Tabeli 12. Sadržaj polifenolnih jedinjenja (prema Tabeli 11) u mešavinama koje sadrže 20% pčelinjeg polena u medu od bagrema, medu od suncokreta i livadskom medu, iznosio je  $3,03 \pm 0,55$  (opseg 2,20 – 3,88) mg GAE/ g;  $3,10 \pm 0,36$  (opseg 2,60 – 3,72) mg GAE/ g i  $3,11 \pm 0,02$  (opseg 2,65 – 3,91) mg GAE/ g uzorka, redom; dok su mešavine meda sa 30% pčelinjeg polena sadržale  $4,18 \pm 0,60$  (opseg 3,45 – 4,99) mg GAE/ g,  $3,92 \pm 0,03$  (opseg 3,01 – 4,98) mg GAE/ g i  $4,02 \pm 0,03$  (opseg 3,20 – 4,92) mg GAE/ g uzorka, redom. Primenom analize varijanse nije uočena statistički značajna razlika između TPC vrednosti smeša prema biljnom poreklu meda ( $F_{Stat} < F_{Crit}$ ) (Tabela 13). Rezultati, koji ukazuju da uzorci pripadaju istoj populaciji, sugerišu da je ukupan polifenolni sadržaj u mešavinama uglavnom određen polifenolnim profilima pčelinjeg polena.

**Tabela 12.** Rezultati uporednog  $t$ -testa za TPC vrednosti mešavina meda istog biljnog porekla sa različitim sadržajem pčelinjeg polena

|            | Mešavine meda od bagrema sa različitim sadržajem pčelinjeg polena | Mešavine meda od suncokreta sa različitim sadržajem pčelinjeg polena i | Mešavine livadskog meda sa različitim sadržajem pčelinjeg polena i |
|------------|---|--|--|
| $t_{Stat}$ | 7,17*   | 4,70*  | 9,03*  |
| $t_{Crit}$ | 2,36  | 2,36   | 2,36   |

\*Vrednosti ukazuju na statistički značajnu razliku TPC vrednosti mešavina iste vrste meda sa različitim sadržajem pčelinjeg polena



Slika 35. Grafički prikaz TPC pčelinjeg polena i mešavina pčelinjeg polena i meda

Tabela 13. Rezultati analize varijanse za TPC mešavina pčelinjeg polena i meda

|            | Mešavine bagremovog, suncokretovog i livadskog meda sa 20% pčelinjeg polena | Mešavine bagremovog, suncokretovog i livadskog meda sa 30% pčelinjeg polena |
|------------|---|---|
| $F_{Stat}$ | 0,09  | 0,37  |
| $F_{Crit}$ | 3,47  | 3,47  |

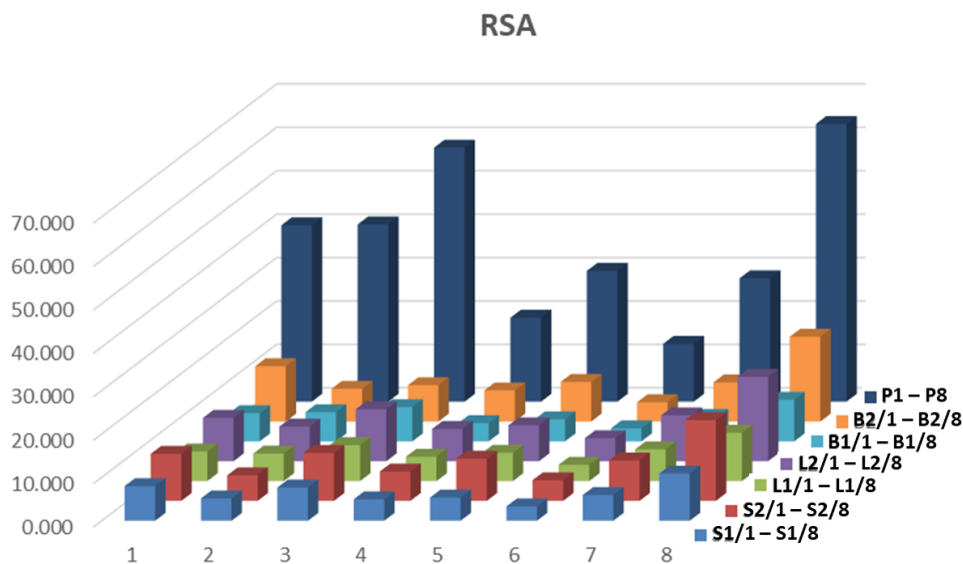
Antioksidativna aktivnost meda, pčelinjeg polena i meda obogaćenog pčelinjim polenom određena je DPPH testom i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 11. Na Slici 36 dat je grafički prikaz dobijenih RSA vrednosti. Slično rezultatima TPC testa, povećanje udela pčelinjeg polena u medu rezultovalo je povećanjem antiradikalne aktivnosti. Najviše RSA vrednosti su dobijene za uzorke pčelinjeg polena (13,3 mmol TE/ kg – 63,99 mmol TE/ kg), zatim za mešavine pčelinjeg polena i meda (2,94 mmol TE/ kg – 19,50 mmol TE/ kg) i na kraju, znatno niže vrednosti dobijene su za uzorke livadskog (3,73 mmol TE/ kg), bagremovog (1,70 mmol TE/ kg) i suncokretovog (1,16 mmol TE/ kg) meda. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranije objavljenim studijama o uticaju obogaćivanja meda pčelinjim polenom na vrednosti TPC i RSA ((Küpeli Akkol et al. 2010; Juszczak et al. 2016; Özkök and Silici 2017; Habryka, Socha, and Juszczak 2021). Uočena je statistički značajna razlika između RSA vrednosti mešavina meda istog biljnog porekla obogaćenih različitim sadržajem pčelinjeg polena, što je potvrđeno rezultatima uporednog  $t$ -testa ( $t_{Stat} > t_{Crit}$ ) datim u Tabeli 14. Antioksidativna aktivnost mešavina sa 20% pčelinjeg polena u bagremovom, suncokretovom i livadskom medu (prema Tabeli 11) iznosila je  $6,02 \pm 0,11$  (opseg 2,94 – 9,54) mmol TE/ kg,  $6,39 \pm 0,22$  (opseg 3,30 – 10,86) mmol TE/ kg i  $6,96 \pm 0,14$  (opseg 3,74 – 11,13) mmol TE/ kg. Vrednosti RSA dobijene za mešavine bagremovog, suncokretovog i livadskog meda sa udelom pčelinjeg polena od 30% iznosile su  $9,69 \pm 0,13$  (opseg 4,39 – 19,50) mmol TE/ kg,  $9,61 \pm 0,22$  (opseg 4,76 – 18,60) mmol TE/ kg i  $10,11 \pm 0,44$  (opseg 5,305 – 19,4) mmol TE/ kg. Na osnovu rezultata analize varijanse

nije uočena statistički značajna razlika između vrednosti RSA mešavina u zavisnosti od biljnog porekla meda ( $F_{Stat} < F_{Crit}$ ) (Tabela 15). Slično rezultatima TPC, ANOVA test je potvrdio da je antioksidativna aktivnost mešavina uglavnom određena polifenolnim profilima pčelinjeg polena. Uzorci pčelinjeg polena **P1 – P3** i **P8** imaju veći ukupan sadržaj polifenola i višu antioksidativnu aktivnost, što svakako utiče i na sadržaj bioaktivnih jedinjenja mešavina meda i pčelinjeg polena (Tabela 11).

**Tabela 14.** Rezultati uporednog  $t$ -testa za RSA vrednosti mešavina meda istog biljnog porekla sa različitim sadržajem pčelinjeg polena

|            | Mešavine meda od bagrema sa različitim sadržajem pčelinjeg polena | Mešavine meda od suncokreta sa različitim sadržajem pčelinjeg polena | Mešavine livadskog meda sa različitim sadržajem pčelinjeg polena |
|------------|---|--|--|
| $t_{Stat}$ | 3,29*   | 4,19*  | 3,97*  |
| $t_{Crit}$ | 2,36  | 2,36   | 2,36   |

\*Vrednosti ukazuju na statistički značajnu razliku RSA mešavina iste vrste meda sa različitim sadržajem pčelinjeg polena



**Slika 36.** Grafički prikaz RSA pčelinjeg polena i mešavina pčelinjeg polena i meda

**Tabela 15.** Rezultati analize varijanse za RSA mešavina pčelinjeg polena i meda

|            | Mešavine bagremovog, suncokretovog i livadskog meda sa 20% pčelinjeg polena | Mešavine bagremovog, suncokretovog i livadskog meda sa 30% pčelinjeg polena |
|------------|---|---|
| $F_{Stat}$ | 0,34  | 0,03  |
| $F_{Crit}$ | 3,47  | 3,47  |

Iako rezultati ukazuju da povećan sadržaj pčelinjeg polena u medu, kao vredan izvor prirodnih antioksidanata, značajno poboljšava njegovu nutritivnu i bioaktivnu vrednost, treba imati u vidu da

dodavanje pčelinjeg polena utiče na pogoršanje senzornih karakteristika meda i posledično do slabije prihvatljivosti od strane potrošača. Mešavine su manje slatke, sa pojačanim oštrim, kiselim ukusom, gorčinom i postojanošću zaostalog ukusa (Habryka, Socha, and Juszcak 2021). Dodavanje pčelinjeg polena utiče na promenu boje, karakterističnog mirisa i teksture meda (Habryka, Socha, and Juszcak 2021). Iako rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajno viši sadržaj polifenolnih jedinjenja i višu antioksidativnu aktivnost uzoraka meda obogaćenog sa 30% pčelinjeg polena, mora se uzeti u obzir i percepcija potrošača. Međutim, za potrošače koji iz određenih razloga prednost daju antioksidativnim, a ne senzornim karakteristikama, dragocena je informacija o značajno povećanom sadržaju bioaktivnih jedinjenja u mešavinama koje sadrže 30% pčelinjeg polena u medu.

### 4.2.3 Polifenolni profil meda obogaćenog pčelinjim polenom

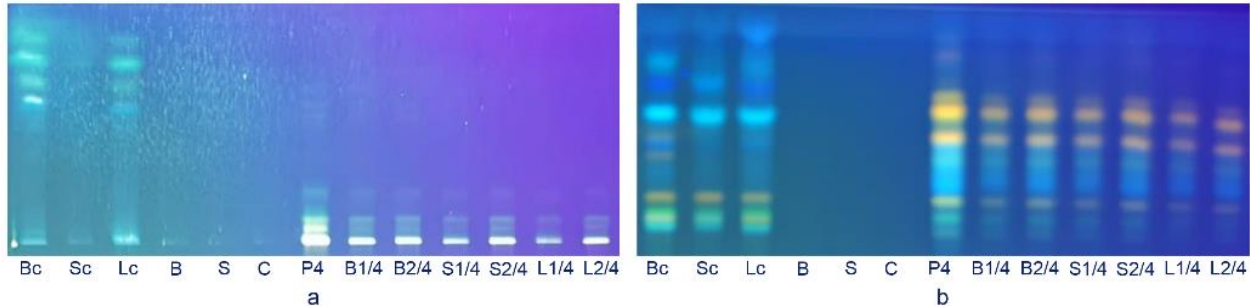
Nakon uspešne primene HPTLC tehnike u analizi polifenolnih jedinjenja pčelinjeg polena, kao nastavak istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije, dodatno je izvršena optimizacija hromatografskih uslova u cilju daljeg proučavanja i uporedne analize polifenolnih profila pčelinjeg polena i mešavina pčelinjeg polena i meda. Ovim automatizovanim, sofisticiranim oblikom tankoslojne hromatografije, koji omogućava paralelnu analizu velikog broja uzoraka uz malu potrošnju rastvarača, dobijen je kvalitativni hromatografski profil polifenolnih jedinjenja meda i pčelinjeg polena zasebno, kao i meda obogaćenog pčelinjim polenom. Pretraživanjem literature, nismo došli do podataka o primeni HPTLC metode za analizu polifenolne frakcije meda obogaćenog pčelinjim polenom. Analizu mešavina meda i polena dodatno otežava činjenica da one objedinjuju dva prirodna proizvoda specifičnog polifenolnog sastava. Shodno tome bio je razvijen pogodan hromatografski sistem kojim je postignuto uspešno razdvajanje komponenti polifenolnih frakcija mešavina pčelinjeg polena i meda u režimu normalno-fazne visokoefikasne tankoslojne hromatografije. U ovom istraživanju smo takođe po prvi put, prema našim saznanjima, primenili i tehniku reverzno-fazne visokoefikasne tankoslojne hromatografije za dobijanje polifenolnih profila meda obogaćenog pčelinjim polenom, kao i polena i meda zasebno.

#### 4.2.3.1 Preliminarna HPTLC analiza ekstrakata meda, pčelinjeg polena i mešavina polena i meda

Preliminarna HPTLC analiza je obuhvatala poređenje polifenolnog profila tri različite vrste ekstrakata: meda, pčelinjeg polena i smeša pčelinjeg polena i meda. Razvoj hromatografskog profila analiziranih uzoraka zasnovan je na primeni NP i RP HPTLC uslova optimizovanih u pogledu rezolucije fenolnih kiselina i flavonoida. Zbog male količine polifenolnih jedinjenja u koncentraciji primenjenoj za pčelinji polen, hromatografske zone koje potiču od uzoraka meda nisu bile uočljive na hromatogramima. Iz tog razloga na HPTLC ploče su dodatno naneti i pedeset puta koncentrovaniji ekstrakti uzoraka meda, što je omogućilo njihovu vizualizaciju i uporednu analizu polifenolnih profila sa profilima ostalih uzoraka (Slika 37). Kao pogodna za dato upoređivanje, mobilna faza sastava toluen / etil-acetat / mravlja kiselina (5:4:1, v/v/v) koja je pre svega obezbedila dobro razdvajanje hromatografskih zona uzoraka meda korišćena je u slučaju NP HPTLC, dok je mobilne faza etanol / voda / mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v) primenjena za RP HPTLC.

Nakon razvijanja i posthromatografske derivatizacije, vizuelnim pregledom dobijenih HPTLC hromatograma, utvrđene su razlike u intenzitetu i raspodeli zona u okviru traka u zavisnosti od vrste ekstrakata. Najintenzivnije hromatografske zone vidljive su u trakama koje odgovaraju ekstraktu pčelinjeg polena. U slučaju ekstrakata uzoraka meda, jasno su vidljive samo trake koje potiču od koncentrovanih ekstrakata, dok se ostale gotovo ne mogu detektovati. Poređenjem polifenolnih profila analiziranih uzoraka uočava se sličnost između traka ekstrakta pčelinjeg polena i smeša pčelinjeg polena i meda, dok sličnost sa trakama koje potiču od meda nije uočena. Oba

hromatografska sistema, NP HPTLC i RP HPTLC, dala su iste rezultate, na osnovu čega se zaključuje da je uticaj polena na polifenolni profil u smešama pčelinjeg polena i meda dominantan u poređenju sa uticajem meda. Detaljan opis optimizacije uslova i primene obe metode u analizi polifenolnih profila ekstrakata mešavina polena i meda sledi u nastavku.



**Slika 37.** HPTLC hromatogrami tri različita tipa ekstrakata: meda, pčelinjeg polena i mešavina polena i meda. (a) NP HPTLC uslovi, (b) RP HPTLC uslovi

#### 4.2.3.2 Primena NP HPTLC metode za analizu polifenolnog profila mešavina polena i meda

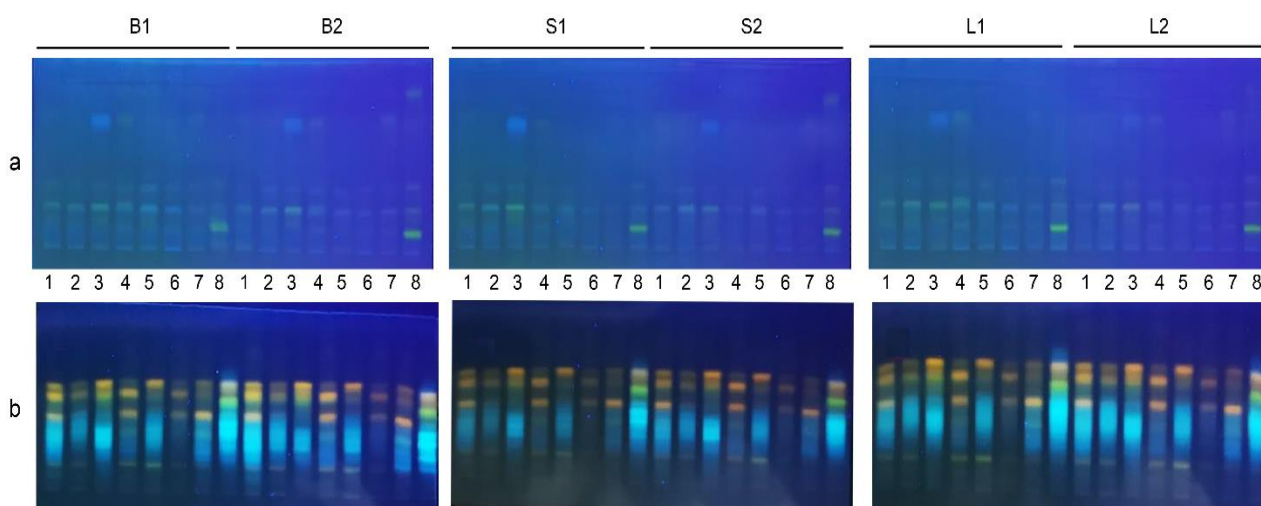
Ekstrakti meda obogaćenog različitim udelom pčelinjeg polena dodatno su analizirani u zavisnosti od biljnog porekla meda u NP HPTLC uslovima (Slika 38a). Na svaku od tri ploče naneto je po šesnaest ekstrakata (isti tip meda obogaćen različitim količinama pčelinjeg polena). Nakon optimizacije hromatografskih uslova, hromatogrami su razvijeni primenom mobilne faze etil-acetat / voda / mravlja kiselina (8:1:1, v/v/v), a zatim je izvršena posthromatografska derivatizacija. Primenom ove mobilne faze postignuto je odvajanje polifenolnih jedinjenja različite polarnosti u uzorcima pčelinjeg polena i mešavina, pre svega jedinjenja iz klase flavonoida čije su zone dominantnije u poređenju sa polifenolnim profilima uzoraka meda.

#### 4.2.3.3 Razvoj i primena RP HPTLC metode za analizu polifenolnog profila mešavina polena i meda

Reverzno-fazni hromatografski sistemi pogodni su za odvajanje supstanci rastvornih u relativno polarnim rastvaračima i čija je sorpcija iz takvih rastvarača slaba, a takođe i za odvajanje nepolarnih jedinjenja koja se slabo adsorbuju na polarnim sorbentima iz nepolarnih rastvarača. Retencija u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji predstavlja složen proces određen hemijskom strukturom analita, kao i fizičko-hemijskim svojstvima mobilne i stacionarne faze. Modifikovani silika-gel spada u sorbente sa kombinovanim hemijskim karakteristikama. Heterogenost adsorpcione površine ove vrste sorbenata utiče na elucione procese s obzirom da sadrži i do 50 % nemodifikovanih silanolnih grupa sa kojima molekuli analita i rastvarača mogu da interaguju. Voda, kao komponenta mobilne faze u reverzno-faznoj hromatografiji reguliše njenu elucionu moć, dok se na određenu selektivnost mobilne faze može uticati primenom komponenata koje su mešljive sa vodom. Promenom sastava i prirode mobilne faze omogućeno je podešavanje retencije odvajanih supstanci preko širokog opsega retencionih parametara i optimizacije hromatografskih procesa (D. Milojković-Opsenica 2000).

Primena reverzno-faznog sistema u slučaju uzoraka pčelinjeg polena i meda karakteristična je za tečnu hromatografiju na koloni. Uvođenjem reverzno-faznih (C18) kolona značajno je poboljšano odvajanje različitih klasa polifenolnih jedinjenja. Na osnovu retencionih parametara pojedinih

komponentata smeše polifenola mogu se dobiti određene strukturne informacije s obzirom da na redosled eluiranja utiču vrsta i položaj šećerne komponente u glikozilovanim flavonoidima, kao i obrasci supstitucije različitih klasa flavonoida i fenolnih kiselina i drugo. Prilikom analize polifenolne frakcije uzoraka pčelinjeg polena UHPLC–LTQ Orbitrap MS metodom najbolje razdvajanje postignuto je primenom smeše acetonitrila i vode kao mobilne faze (M. G. Campos et al. 2021). Efekat date mešavine rastvarača (acetonitril / voda / mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v)) ispitan je i prilikom optimizacije mobilne faze za dobijanje RP HPTLC polifenolnih profila analiziranih uzoraka. Hromatogrami su takođe razvijeni i primenom mobilne faze sastava aceton / voda / mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v), kao i smešom rastvarača etanol / voda / mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v). Najbolji efekat na razdvajanje polifenolnih jedinjenja različite polarnosti postignut je primenom mobilne faze etanol / voda / mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v) i dati sistem je odabran za dalju analizu u reverzno-faznim hromatografskim uslovima. HPTLC se zbog male potrošnje rastvarača smatra zelenom analitičkom tehnikom. U ovom slučaju, upotreba etanola kao komponente mobilne faze, nasuprot konvencionalnim organskim rastvaračima (poput dihlormetana i *n*-heksana) imala je za cilj da ovu metodu učini ekološki prihvatljivijom i time doprinese razvoju zelenih metoda u analizi prirodnih prehrambenih proizvoda. Nakon izvršene optimizacije uslova izvršena je analiza ekstrakata mešavina pčelinjeg polena i meda. Po šesnaest ekstrakata istog tipa meda sa različitim udelom pčelinjeg polena, naneto je na tri ploče (kao u slučaju primene normalno-fazne metode) koje su razvijene primenom mobilne faze etanol / voda / mravlja kiselina (3:6:1, v/v/v), nakon čega je usledila derivatizacija u cilju vizualizacije hromatografskih zona (Slika 38b).



**Slika 38.** HPTLC hromatogrami mešavina meda sa različitim udelom pčelinjeg polena, (a) NP HPTLC uslovi, (b) RP HPTLC uslovi

#### 4.2.3.4 Uporedna analiza rezultata NP i RP HPTLC metode

Na osnovu izgleda hromatograma dobijenih primenom obe metode (NP i RP HPTLC) (Slika 38) uviđa se složenost polifenolnih profila analiziranih uzoraka mešavina polena i meda. U okviru traka koje predstavljaju polifenolne profile pojedinačnih uzoraka, dominiraju plave i narandžaste zone odgovarajućih fenolnih kiselina i flavonoida pozicionirane različito u zavisnosti od primenjenog hromatografskog sistema. Na osnovu dobijenih hromatograma uočava se sličnost između traka u zavisnosti od vrste pčelinjeg polena. Raspored hromatografskih zona u okviru traka mešavina koje

sadrže isti uzorak pčelinjeg polena nije uslovljen biljnim poreklom meda što je u skladu sa rezultatima TPC i RSA (Tabela 11). Postoji razlika u intenzitetu traka mešavina koje sadrže isti uzorak pčelinjeg polena i uslovljena je njegovim udelom. Naime, trake koje potiču od mešavina sa većim udelom polena su intenzivnije.

Posmatrajući dva hromatografska sistema, optimalni rezultati sa velikim brojem oštrih traka, maksimalnom efikasnošću odvajanja i najnižim pozadinskim šumom za sve analizirane ekstrakte dobijeni su korišćenjem RP hromatografskog sistema. Optimizovani RP HPTLC uslovi, primenjeni na uzorke mešavina polena i meda, izuzetno složenog sastava, obezbeđuju bolju rezoluciju polifenolnih jedinjenja niske, srednje i visoke polarnosti. Trake dobijene RP HPTLC metodom su intenzivnije, a samim tim i hromatografske zone uočljivije, u poređenju sa trakama dobijenim NP HPTLC metodom.

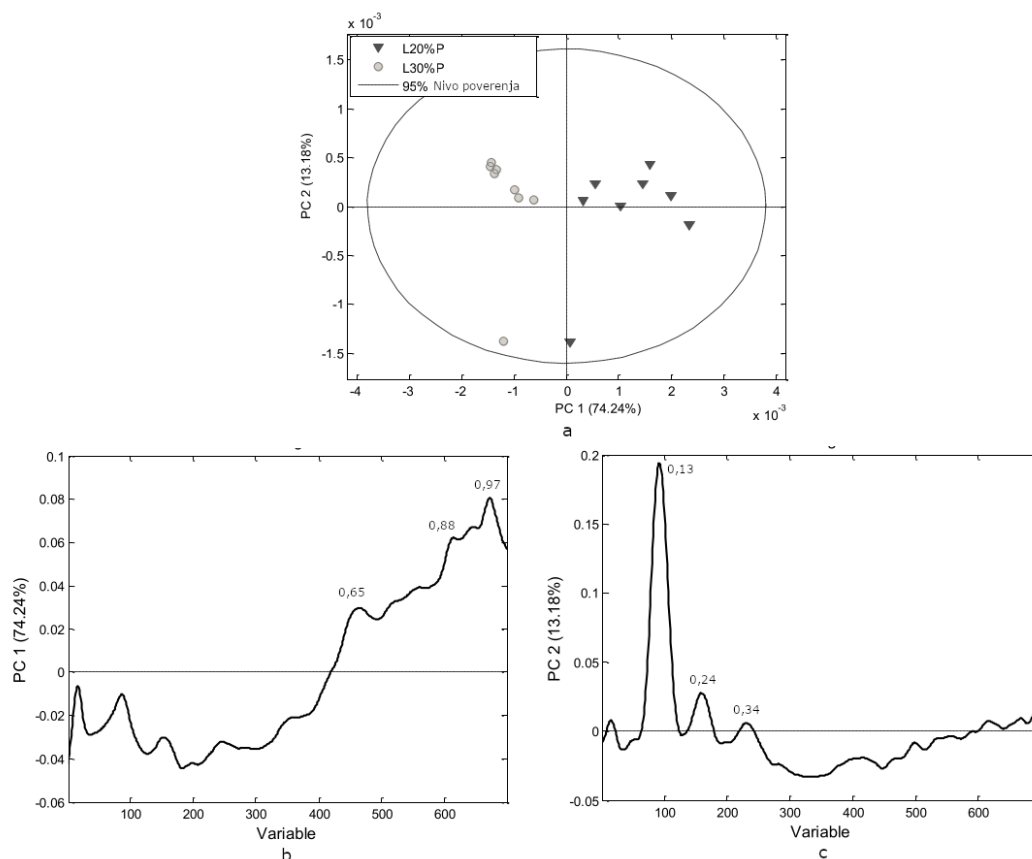
#### 4.2.4 Hemometrijska evaluacija HPTLC podataka

U cilju ispitivanja multivarijantnog seta podataka dobijenih iz hromatografskih profila i traženja mogućih obrazaca između uzoraka i hromatografskih signala, PCA je primenjena na skup podataka dobijenih nakon analize slike. Na osnovu datih podataka su napravljene modeli prema različitom udelu pčelinjeg polena u svakoj vrsti meda, kao i prema vrsti meda za isti udeo pčelinjeg polena. Ispitivane su dve pojave: a) uticaj sadržaja pčelinjeg polena na polifenolni profil smeša (za svaku vrstu meda posebno) i b) uticaj biljnog porekla meda na polifenolni profil smeša (za oba udela pčelinjeg polena zasebno). Svi proračuni i poređenja izvedeni su za oba hromatografska sistema (NP i RP). Pored toga, slike svih ploča (Slika 38) su pre PCA filtrirane kroz crveni, zeleni i plavi kanal. Zbog dobijenog velikog broja PCA modela (više od trideset), u nastavku će detaljno biti objašnjeni reprezentativni modeli za svaku uočenu pojavu. Odabrani PCA modeli su grafički predstavljani u vidu grafika skorova i grafika vektora latentnih varijabli za prve dve glavne komponente (PC1 i PC2) (Slike 39 i 40), dok su statistički parametri modela dati u Tabelama 16 i 17.

Najpre je razmatran uticaj frakcije pčelinjeg polena na polifenolne profile mešavina polena sa medom, za svaki tip meda i oba hromatografska sistema. Posmatrajući grafički prikaz dobijenih rezultata, u vidu grafika skorova, uočava se da su analizirani uzorci raspodeljeni u dva klastera koji odgovaraju različitim udelima pčelinjeg polena. Na Slici 39a je predstavljen PCA model mešavina livadskog meda sa polenom, dobijen NP HPTLC metodom, nakon filtriranja hromatograma kroz plavi kanal. Dobijeni četvorokomponentni PCA model objašnjava 97,37% ukupnog varijabiliteta od čega PC1 obuhvata 74,24%, dok PC2 objašnjava 13,18% ukupnog varijabiliteta među podacima (Tabela 16). Visok udeo PC1 u ukupnom varijabilitetu podataka ukazuje na jak uticaj hromatografskih zona/jedinjenja duž ove komponente. Na osnovu odgovarajućeg grafika vektora latentnih varijabli uočava se da najveći pozitivan efekat na PC1 imaju zone sa  $R_F$  vrednostima većim od 0,65, odnosno jedinjenja iz klase flavonoida.

**Tabela 16.** Broj glavnih komponentata i njima objašnjen procenat varijanse

| Broj glavnih komponentata | Vrednosti matrice kovarijanse (X) | % Varijanse | Ukupan % varijanse |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------|
| 1                         | $1,81 \times 10^{-6}$             | 74,24       | 74,24              |
| 2                         | $3,21 \times 10^{-7}$             | 13,18       | 87,42              |
| 3                         | $1,88 \times 10^{-7}$             | 7,71        | 95,13              |
| 4                         | $5,45 \times 10^{-8}$             | 2,24        | 97,37              |

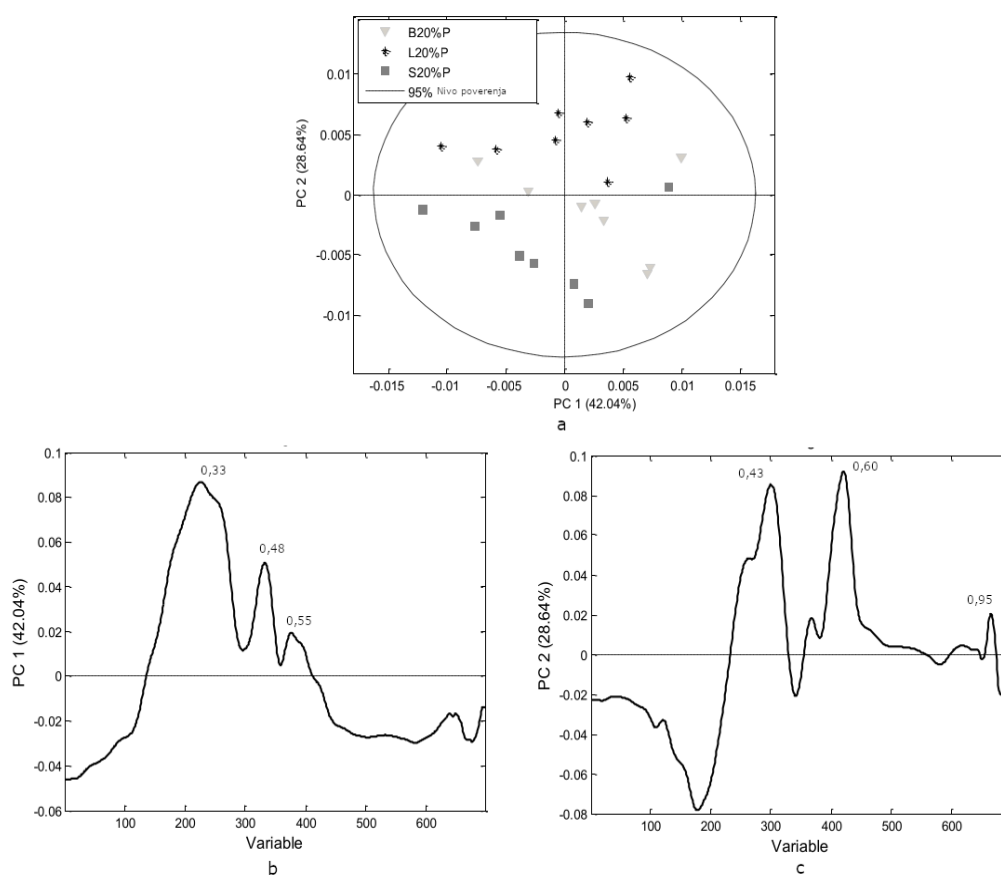


**Slika 39.** Analiza glavnih komponenata podataka iz NP HPTLC fenolnih profila mešavina ekstrakata livadskog meda sa različitim udelom pčelinjeg polena nakon filtriranja kroz plavi kanal, a) grafik skorova latentnih varijabli, b) grafik vektora latentnih varijabli za PC1, c) grafik vektora latentnih varijabli za PC2.

Procenu autentičnosti meda u mešavini sa polenom nije bilo moguće izvršiti na osnovu ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti uzoraka. Međutim, posmatranjem celog hromatograma kao jedinstvenog multivarijantnog „otiska prsta”, odnosno skupa karakterističnih hromatografskih signala, koji su zatim obrađeni primenom statističkih procedura u cilju efikasnog odabira maksimuma korisnih informacija iz celokupnog skupa podataka, moguće je izvršiti datu procenu. PCA model za određeni udeo pčelinjeg polena u mešavinama sa različitim uzorcima meda primenom RP hromatografskog sistema prikazuje postojanje tri klastera koji odgovaraju različitom biljnom poreklu meda. Odabrani PCA model, predstavljen u nastavku, jeste model za mešavine u kojima je udeo pčelinjeg polena iznosio 20%, analizirane u RP HPTLC režimu, nakon čega je izvršeno filtriranje hromatograma kroz zeleni kanal (Slika 40 a). Dobijeni šestokomponentni PCA model objašnjava 93,04 % ukupne varijanse, 42,04 % ukupne varijanse podataka obuhvaćeno je sa PC1, dok PC2 obuhvata 28,64 % ukupne varijanse (Tabela 17). Najveći uticaj na takvu dispoziciju uzoraka na grafiku skorova imaju zone sa  $R_F$  vrednostima 0,33; 0,48 i 0,55 sa pozitivnim uticajem na PC1, a takođe i zone sa  $R_F$  vrednostima 0,43 i 0,60 koje ispoljavaju pozitivan uticaj na PC2, što se može uočiti sa grafika vektora latentnih varijabli.

Tabela 17. Broj glavnih komponentata i njima objašnjen procenat varijanse

| Broj glavnih komponentata | Vrednosti matrice kovarijanse (X) | % Varijanse | Ukupan % varijanse |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------|
| 1                         | $3,67 \times 10^{-5}$             | 42,04       | 42,04              |
| 2                         | $2,50 \times 10^{-5}$             | 28,64       | 70,67              |
| 3                         | $7,06 \times 10^{-6}$             | 8,08        | 78,76              |
| 4                         | $6,27 \times 10^{-6}$             | 7,18        | 85,94              |
| 5                         | $3,27 \times 10^{-6}$             | 3,74        | 89,68              |
| 6                         | $2,94 \times 10^{-6}$             | 3,36        | 93,04              |



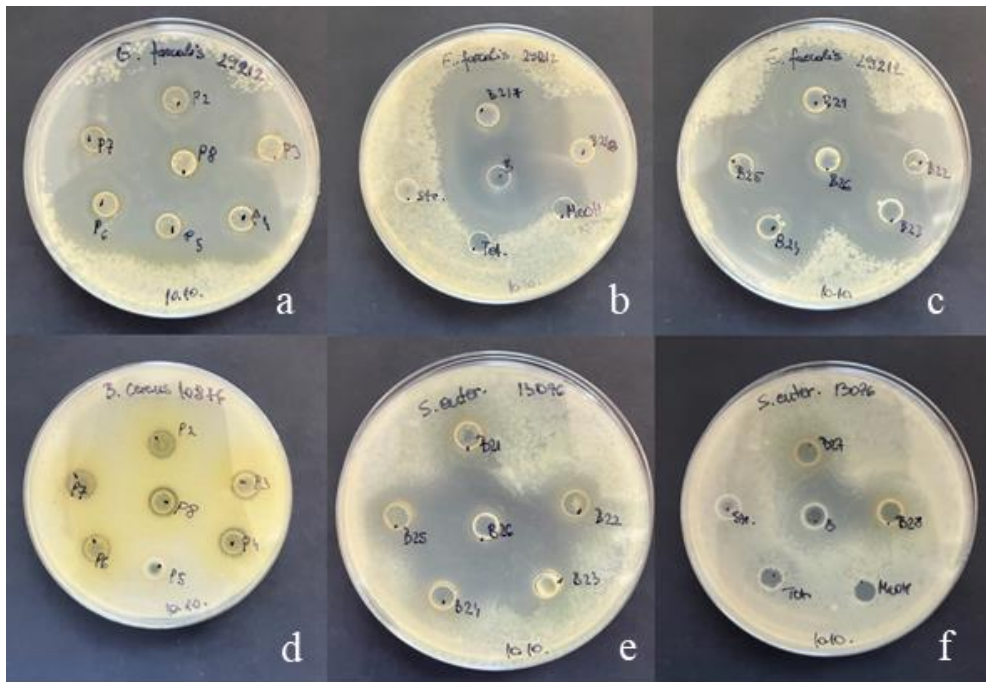
**Slika 40.** Analiza glavnih komponentata podataka iz RP HPTLC fenolnih profila ekstrakata smeša bagremovog, livadskog i suncokretovog meda sa 20% pčelinjeg polena, nakon filtriranja kroz zeleni kanal, a) grafik skorova latentnih varijabli, b) grafik vektora latentnih varijabli za PC1, c) grafik vektora latentnih varijabli za PC2

#### **4.2.5 Antimikrobna aktivnost pčelinjeg polena, meda i mešavina pčelinjeg polena i meda**

Otpornost bakterija na antibiotike je rastući globalni problem koji predstavlja jednu od glavnih pretnji javnom zdravlju. Potreba za hitnim pronalaženjem novih načina za borbu protiv rezistentnih bakterija uslovala je spovođenje sve većeg broja istraživanja u cilju identifikacije novih antimikrobnih agenasa. Teži se, između ostalog, pronalaženju prirodnih alternativa sintetičkim antibioticima, a pčelinji proizvodi, bogati bioaktivnim jedinjenjima, imaju važnu ulogu u borbi protiv patogenih mikroorganizama. Dosadašnja istraživanja potvrđuju antibakterijsko dejstvo meda i pčelinjeg polena (Didaras et al. 2020). U literaturi još uvek nema potvrđenih slučajeva mikroorganizama koji su razvili otpornost na ove prirodne proizvode. Izostanak antimikrobne rezistencije pripisuje se sinergiji velikog broja prisutnih bioaktivnih supstanci, poput polifenolnih jedinjenja za koje je takođe dokazano da ispoljavaju i sinergistički efekat u kombinaciji sa antibioticima (Manso, Lores, and de Miguel 2021).

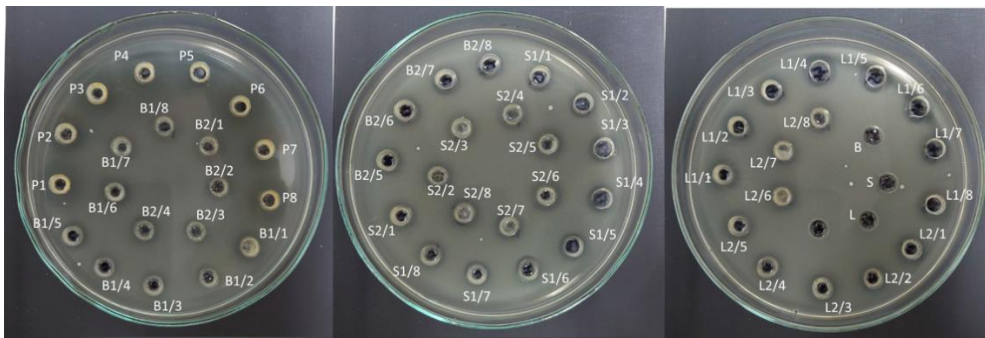
U okviru procene biološke aktivnosti meda obogaćenog pčelinjim polenom, pored određivanja antioksidativne aktivnosti, sprovedeno je i uporedno testiranje antibakterijske aktivnosti ekstrakata pčelinjeg polena, meda i mešavina pčelinjeg polena i meda. Osetljivost dostupnih bakterijskih sojeva iz grupe humanih patogena, testirana je u odnosu na ekstrakte uzoraka primenom difuzione metode sa bunarićima. Dobijeni rezultati, izraženi u mm prečnika zona inhibicije, dati su u Tabeli P1. Prečnici zona obuhvatali su opseg od 8 mm do 30 mm. Određen broj aktivnih uzoraka sa uočljivim zonama inhibicije prikazan je na Slikama 41 i 42.

Na osnovu dobijenih rezultata, uočava se da su svi ekstrakti uzoraka pčelinjeg polena i mešavina polena sa medom bili aktivni prema bar jednom od testiranih sojeva bakterija, dok je od analiziranih ekstrakata uzoraka meda, jedino ekstrakt uzorka **B** (med od bagrema) bio aktivan prema dva bakterijska soja, od kojih jedan Gram-pozitivan (*E. faecalis*) i drugi Gram-negativan (*S. enteritidis*). Podaci iz literature potvrđuju da su uzorci meda aktivni prema različitim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim sojevima bakterija, a takođe je uočeno i da je monofloralni med iskazao jači antibakterijski efekat u odnosu na polifloralni uzorak meda (Cianciosi et al. 2018). Najveći broj uzoraka ispitivanih u okviru ove disertacije ispoljio je antibakterijsko dejstvo prema soju *M. lysodeikticus*, prema kojem su bili aktivni svi ekstrakti uzoraka pčelinjeg polena i mešavina polena sa medom, dok ekstrakti uzoraka meda, u ovom slučaju, nisu bili aktivni. Ostali bakterijski sojevi su bili osetljivi prema znatno manjem broju analiziranih ekstrakata. Naime, nijedan od analiziranih ekstrakata nije bio aktivan prema svim testiranim sojevima. Aktivnost prema najvećem broju testiranih bakterijskih sojeva ispoljio je ekstrakt uzorka **P8**, i to prema pet od ukupno sedam sojeva. Karakteristično za uzorak **P8** je takođe i to da je ispoljio najvišu antioksidativnu aktivnost ( $63,9 \pm 0,7$  mmol TE/ kg). Što se tiče preostalih uzoraka, tri ekstrakta je bilo aktivno prema četiri bakterijska soja, zatim 13 ekstrakata prema tri soja, 21 ekstrakt prema 2 soja, dok je 19 ekstrakata bilo aktivno prema jednom od analiziranih bakterijskih sojeva.



**Slika 41.** Rezultati difuzije metode u bunarićima u odnosu na testirane sojeve bakterija: (a, b, c) *E. faecalis*; (d) *B. cereus*; (e, f) *S. enteritidis*

Upoređivanjem aktivnosti različitih tipova uzoraka (pčelinjeg polena, meda i mešavina polena i meda) u odnosu na ispitivane bakterijske sojeve uočavaju se značajne razlike. Bakterijski soj *E. faecalis* ATCC 29212 bio je osjetljiv na dejstvo ekstrakata svih uzoraka pčelinjeg polena, sem uzorka **P1**, zatim na šesnaest uzoraka mešavina polena i meda, kao i na uzorak bagremovog meda. Ispitivanjem osjetljivosti bakterijskog soja *A. baumannii* ATCC 19606 jedini aktivan uzorak bio je upravo uzorak pčelinjeg polena **P1**, koji je u prethodnom primeru bio jedini neaktivan uzorak iz date grupe. Uzorci pčelinjeg polena nisu iskazali aktivnost prema soju *S. enteritidis* ATCC 13076, dok su dvadeset tri mešavine pčelinjeg polena i meda bile aktivne, a takođe i uzorak meda od bagrema. Na osnovu toga može se pretpostaviti da je u ovom slučaju uticaj meda na antibakterijsku aktivnost dominantan u poređenju sa uticajem pčelinjeg polena. Bakterijski soj *S. typhimurium* ATCC 14028 bio je osjetljiv prema dva uzorka pčelinjeg polena, soj *B. cereus* ATCC 10876 prema šest, dok su prema soju *S. flexneri* ATCC 9199 bila aktivna tri ekstrakta uzoraka pčelinjeg polena i jedan ekstrakt uzorka mešavine polena i meda. Uzimajući u obzir sve vrste uzoraka i sve testirane sojeve bakterija uočeno je da je najveći broj uzoraka pčelinjeg polena bio aktivan. Osjetljivost prema većem broju uzoraka iskazali su sojevi Gram-pozitivnih bakterija. Povećana osjetljivost Gram-pozitivnih sojeva u odnosu na Gram-negativne sojeve uočena je i u prethodnim istraživanjima koja se odnose na antimikrobnu aktivnost pčelinjeg polena. U okviru istraživanja autora Didarasa i saradnika sumirani su rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti pčelinjeg polena sa različitih geografskih područja pri čemu je uočeno da u najčešće testirane bakterijske sojeve osjetljive na pčelinji polen spadaju: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Streptococcus pyogenes* (Didaras et al. 2020). Za većinu sojeva testiranih u okviru ove disertacije u literaturi ne postoje podaci o njihovoj osjetljivosti na uzorke pčelinjeg polena, što je bio i jedan od kriterijuma za njihov odabir koji je imao za cilj potencijalno proširenje spektra sojeva osjetljivih na pčelinji polen.



**Slika 42.** Difuziona metoda u bunarićima ekstrakata meda, pčelinjeg polena i mešavina polena i meda u odnosu na soj *M. lysodeikticus*

Uporedna analiza antibakterijske aktivnosti različitih grupa uzoraka testiranih u okviru ovog istraživanja izvršena je na primeru bakterijskog soja *M. lysodeikticus*. S obzirom da je ovaj soj bio osjetljiv na najveći broj uzoraka (Tabela P1 i Slika 42) jedino je u datom slučaju bilo moguće izvršiti statističku procenu njihovih aktivnosti na osnovu vrednosti prečnika nastalih zona inhibicije. Testirano je sedam grupa uzoraka koje obuhvataju ekstrakte pčelinjeg polena i ekstrakte mešavina meda od bagrema, meda od suncokreta i livadskog meda sa udelom polena od 20% i 30% (Tabela 4). Sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) u cilju provere pripadnosti grupa istoj populaciji, odnosno testiranja nulte hipoteze, čime je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u aktivnosti između različitih grupa uzoraka ( $F = 54,97 > F_{crit} = 2,29$ ). Dalja procena statistički značajne razlike među grupama uzoraka izvršena je testiranjem najmanje značajne razlike, odnosno primenom Fišerovog LSD testa (eng. *Least Significant Difference*) a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Rezultati Fišerovog LSD testa

| Oznake grupa uzoraka | Broj uzoraka unutar grupe | Srednja vrednost | Grupe u odnosu na koje postoji razlika                                       |
|----------------------|---------------------------|------------------|--|
| B1/1 - B1/8          | 8                         | 12,6             | S2/1 - S2/8, B2/1 - B2/8, L2/1 - L2/8, P1 - P8                               |
| L1/1 - L1/8          | 8                         | 13,0             | B2/1 - B2/8, L2/1 - L2/8, P1 - P8  |
| S1/1 - S1/8          | 8                         | 13,4             | L2/1 - L2/8, P1 - P8   |
| S2/1 - S2/8          | 8                         | 14,0             | B1/1 - B1/8, L2/1 - L2/8, P1 - P8  |
| B2/1 - B2/8          | 8                         | 14,4             | B1/1 - B1/8, L1/1 - L1/8, L2/1 - L2/8, P1 - P8                               |
| L2/1 - L2/8          | 8                         | 16,1             | B1/1 - B1/8, L1/1 - L1/8, S1/1 - S1/8, S2/1 - S2/8, B2/1 - B2/8, P1 - P8     |
| P1 - P8              | 8                         | 21,0             | B1/1 - B1/8, L1/1 - L1/8, S1/1 - S1/8, S2/1 - S2/8, B2/1 - B2/8, L2/1 - L2/8 |

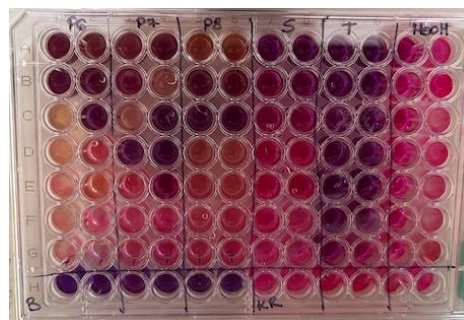
Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da se dve grupe uzoraka izdvajaju od ostalih uzoraka. Najviše se izdvajaju uzorci pčelinjeg polena a zatim mešavine livadskog meda sa 30% polena. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima antioksidativne aktivnosti (Tabela 11), na osnovu kojih uzorci pčelinjeg polena imaju najveću antioksidativnu aktivnost (13,30 mmol TE/ kg – 63,99 mmol TE/ kg) a zatim slede mešavine livadskog meda sa 30% polena (5,30 mmol TE/ kg – 19,40 mmol TE/ kg). Poređenjem preostalih grupa uzoraka uočeno je da različit udeo pčelinjeg polena ne utiče na aktivnost mešavina meda od suncokreta i polena, dok se u slučaju mešavina meda od bagrema sa 20% polena,

uočava razlika u odnosu na sve ostale mešavine sa udelom polena od 30%. Na osnovu HPTLC fenolnih profila uzoraka pčelinjeg polena i mešavina meda i polena određenih u okviru ovog istraživanja, kao i sadržaja ukupnih fenola i njihovog antioksidativnog potencijala, jasno se uočava dominantan uticaj pčelinjeg polena na polifenolni profil mešavina. Međutim, opšti obrazac po kojem obogaćivanje meda pčelinjim polenom nužno dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti mešavina ne važi u slučaju njihove antibakterijske aktivnosti. Takođe, profilisanje mešavina u odnosu na biljno poreklo meda nije bilo moguće izvršiti poređenjem njihove antibakterijske aktivnosti.

Na osnovu iskazane antimikrobne aktivnosti odabrano je nekoliko ekstrakata čije su minimalne inhibitorne koncentracije određene mikrodilucionom metodom:

- ekstrakti **P6, P7, P8** za *B. cereus*
- ekstrakt **B2/6** za *S. flexneri*
- ekstrakti **B, B1/5, B2/6, L1/6, S2/6, P6** za *E. faecalis, S. enteritidis*

Za procenu rasta ćelija korišćen je rasazurin, plavo obojeni indikator koji se u prisustvu živih bakterijskih ćelija ireverzibilno redukuje u ružičast i fluorescentan rezorufin, pri čemu se najmanja koncentracija ekstrakta koja ne dovodi do promene boje resazurina definiše kao MIK. Inhibicija rasta zabeležena je jedino u slučaju bakterijskog soja *B. cereus* i to pri sledećim koncentracijama ekstrakata: **P6** 25 mg/mL, **P7** 6,25 mg/mL i **P8** 12,5 mg/mL (Slika 43). U ostalim testiranim slučajevima nije bilo moguće odrediti MIK vrednosti tj. rast je zabeležen (ružičasta boja bunarića) čak i pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakata koja je iznosila 50 mg/mL. Koncentracije više od 50 mg/mL nisu bile testirane na ovaj način. Minimalne baktericidne koncentracije ekstrakata **P6, P7** i **P8** nisu određene s obzirom da je došlo do rasta na petri-šoljama nakon zasejavanja sadržaja bunarića, što znači da su ekstrakti doveli do bakteriostatskog efekta ali ne i do baktericidnog u slučaju ispitivanih koncentracija. Pascoal i saradnici su testirali komercijalne uzorke pčelinjeg polena pri čemu su MIK vrednosti za referentne bakterijske sojeve iznosile: 1,81 mg/mL - 3,55 mg/mL za *S. aureus*; 3,71 mg/mL - 5,69 mg/mL *P. aeruginosa*; *E. coli* 4,08 mg/mL - 5,65 mg/mL. Ekstrakti pčelinjeg polena sa teritorije Čilea ispoljili su antibakterijsku aktivnost u odnosu na bakterijski soj *S. pyogenes*, dok prema sojevima *E. coli* i *S. aureus* nisu bili aktivni (Pascoal et al. 2014; Bridi et al. 2019). MIK vrednosti svih uzoraka za soj *S. pyogenes* obuhvatale su opseg od 0,78 mg/mL do 6,25 mg/mL što je približnije vrednostima dobijenim u okviru našeg istraživanja.



**Slika 43.** Resazurinska reakcija na bakterijski soj *B. cereus* sa ekstraktima pčelinjeg polena **P6, P7** i **P8**.

Uzimajući u obzir rezultate brojnih istraživanja kojima su bili obuhvaćeni različiti uzorci pčelinjeg polena i meda zasebno, uočene su razlike u antibakterijskoj aktivnosti ne samo uzoraka različitog biljnog porekla već i uzoraka istog biljnog porekla ekstrahovani različitim rastvaračima (Morais et al. 2011; Šimunović et al. 2019; Majtan et al. 2021). Evidentan je uticaj polifenolne frakcije na antibakterijsku aktivnost ovih pčelinjih proizvoda, međutim postoje i slučajevi u kojima antimikrobna aktivnost nije bila u direktnoj korelaciji sa sadržajem fenola, što je posledica kvalitativnog sastava i relativne koncentracije pojedinačnih polifenolnih jedinjenja (Didaras et al. 2020). S obzirom na širok spektar biljnih vrsta sa kojih pčele sakupljaju polen i nektar očigledno je da je mali deo biodiverziteta do sada testiran. Mešavine meda i polena predstavljaju kombinaciju proizvoda sa složenim mehanizmima antimikrobnog delovanja a samim tim su za utvrđivanje veze između biljnog porekla, hemijskog sastava i antibakterijskih svojstava finalnog proizvoda neophodna dalja istraživanja.

## 5. ZAKLJUČAK

Pčelinji proizvodi se zbog svog bogatog nutritivnog sadržaja kao i visokog sadržaja bioaktivnih komponenata svrstavaju u funkcionalnu hranu. Polifenolna jedinjenja predstavljaju važne bioaktivne komponente pčelinjih proizvoda, koje zahvaljujući antioksidativnom dejstvu značajno doprinose terapeutskom svojstvu ovih prirodnih proizvoda i samim tim predstavljaju važan parametar njihovog kvaliteta. U okviru ovog istraživanja sprovedena je sveobuhvatna analiza polifenolnih jedinjenja pčelinjeg polena različitog biljnog porekla, kao i uporedna analiza polifenolnih jedinjenja pčelinjeg polena, meda i meda obogaćenog pčelinjim polenom. Bioaktivni potencijal svih uzoraka je takođe testiran.

Primenom ultra-efikasne tečne hromatografije (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) spregnute sa Orbitrap masenom spektrometrijom (UPLC-LTQ Orbitrap MS) u analiziranim uzorcima pčelinjeg polena identifikovano je dvadeset sedam flavonol-glikozida, od kojih je osam prvi put identifikovano u pčelinjem polenu. Identifikacija je izvršena na osnovu specifičnih spektralnih karakteristika hromatografskih parametara, dok su za određena jedinjenja, kao dodatna potvrda identifikacije, korišćeni dostupni standardi. Za karakterizaciju pčelinjeg polena u smislu biljnog porekla, odnosno identifikaciju tipova cvetnog polena koji ulaze u sastav uzoraka pomoću flavonol-glikozida kao markera potrebno je dodatno izvršiti i njihovu kvantifikaciju, što iziskuje dodatna istraživanja.

U cilju dodatne karakterizacije polifenolne frakcije uzoraka pčelinjeg polena, u okviru ove disertacije je, po prvi put, primenjena metoda normalno-fazne visokoefikasne tankoslojne hromatografije. Nakon izvršene optimizacije hromatografskih uslova, primenom dva sistema rastvarača, postignuto je optimalno razdvajanje komponenti različite polarnosti iz složene smeše polifenolnih jedinjenja. PCA model dobijen na osnovu HPTLC „otiska prsta“ u kombinaciji sa obradom slike omogućio je grupisanje analiziranih uzoraka u odnosu na biljno poreklo. Ovim je omogućeno izvršiti procenu autentičnosti pčelinjeg polena u pogledu njegovog biljnog porekla primenom HPTLC metode, znatno brže i efikasnije u odnosu na izuzetno zahtevnu palinološku analizu koja se inače primenjuje. Dodatna prednost HPTLC metode ogleda se u pružanju informacija o kvalitetu pčelinjeg polena u smislu njegove biološke aktivnosti, uslovljene polifenolnim sadržajem, što svakako utiče i na komercijalnu vrednost ovog prirodnog proizvoda.

Rezultati spektrofotometrijskih testova, kojima je određen ukupan sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost uzoraka pčelinjeg polena, zajedno sa rezultatima UHPLC-MS i HPTLC metoda, potvrđeno je da pčelinji polen predstavlja bogat izvor polifenolnih jedinjenja i kao takav predstavlja dodatak ishrani koji pozitivno utiče na zdravlje.

Uticaj pčelinjeg polena kao aditiva, tj. uticaj fenolne frakcije pčelinjeg polena na ukupan sadržaj polifenola i bioaktivni potencijal mešavina polena i meda je takođe proučen u okviru ove disertacije. Zasebno su analizirane mešavine monofloralnog i polifloralnog meda sa pčelinjim polenom čiji je udeo u mešavinama iznosio 20% i 30%. Za pripremu mešavina odabrani su: med od bagrema i med od suncokreta (dve najzastupljenije monofloralne vrste meda u Srbiji); kao i livadski (polifloralni) med. Na osnovu vrednosti parametara TPC i RSA, uočeno je da pčelinji polen značajno doprinosi poboljšanju antioksidativnih karakteristika meda. Rezultatima statističkih testova potvrđeno je da su sadržaj polifenola u mešavinama, kao i njihova antioksidativna aktivnost uglavnom određeni profilima pčelinjeg polena, dok biljno poreklo meda nije imalo uticaja na date

parametre. Mešavine su značajne jer predstavljaju pogodan način za uvođenje pčelinjeg polena u ishranu s obzirom da je pčelinji polen još uvek znatno potcenjen u odnosu na med. Posebno su interesantne mešavine sa bagremovim medom, omiljenim među potrošačima, čiji fenolni sadržaj i antioksidativna aktivnost biva znatno povećan obogaćivanjem pčelinjim polenom. Rezultati ovog istraživanja ukazuju takođe da je antioksidativna aktivnost mešavina proporcionalna udelu pčelinjeg polena u njima. Sa povećanjem udela polena takođe dolazi do promene ukusa i teksture mešavina, što može uticati na prihvatanje proizvoda od strane potrošača. Međutim, informacije o pojačanoj biološkoj aktivnosti su dragocene ljudima koji konzumiraju ove proizvode u cilju poboljšanja zdravstvenog stanja i samim tim ne daju primat njihovim senzornim karakteristikama.

U cilju dalje karakterizacije polifenolne frakcije mešavina meda i pčelinjeg polena, po prvi put je primenjena tehnika normalno-fazne HPTLC. U okviru ove disertacije je, takođe po prvi put, razvijena metoda reverzno-fazne HPTLC, o čijoj primeni u analizi pčelinjih proizvoda nije bilo literaturnih podataka. Tokom preliminarne analize odabrani su odgovarajući sistemi rastvarača i optimizovani uslovi koji su obezbedili najbolju rezoluciju polifenolnih jedinjenja iz analiziranih uzoraka (pčelinji polen, med i mešavine polena i meda). Uočene su razlike u polifenolnim profilima zavisno od vrste ispitivanih ekstrakata, pri čemu je utvrđeno da je uticaj polena na polifenolni profil u smešama pčelinjeg polena i meda dominantan u poređenju sa uticajem meda, i to u slučaju oba režima (NP i RP). Međusobnim poređenjem izgleda hromatograma dobijenih NP HPTLC i RP HPTLC tehnikama uočeno je da su optimalni rezultati sa velikim brojem oštrih traka, maksimalnom efikasnošću odvajanja i najnižim pozadinskim šumom, za sve analizirane ekstrakte, dobijeni korišćenjem RP hromatografskog sistema. Upotrebom RP hromatografskog sistema je takođe dat doprinos razvoju zelenih metoda u analizi prirodnih prehrambenih proizvoda, jer primena etanola kao komponente mobilne faze (nasuprot konvencionalnim organskim rastvaračima poput dihlormetana i *n*-heksana) čini RP HPTLC metodu ekološki prihvatljivijom.

Statistička obrada podataka sadržanih u polifenolnim profilima dobijenim primenom optimizovanih hromatografskih sistema (NP i RP), izvršena je primenom PCA na skupove podataka dobijenih nakon digitalne obrade slike hromatograma. Ispitivan je uticaj sadržaja pčelinjeg polena na polifenolni profil mešavina za svaku vrstu meda zasebno. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je razdvajanje uzoraka u dva klastera u odnosu na različit udeo pčelinjeg polena, sa jakim pozitivnim uticajem jedinjenja iz klase flavonoida na PC1. Takođe je izvršena procena autentičnosti meda u mešavinama sa polenom. Na osnovu grafičkog prikaza PCA modela za mešavine u kojima je udeo pčelinjeg polena iznosio 20%, analiziranih u RP HPTLC režimu, uočeno je grupisanje mešavina u tri klastera na osnovu različitog biljnog porekla meda (med od bagrema, med od suncokreta i livadski med). Datu procenu nije bilo moguće prethodno izvršiti na osnovu ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti.

U okviru ovog istraživanja, difuzionom metodom je testirana antibakterijska aktivnost mešavina meda i polena, a takođe i meda i pčelinjeg polena zasebno. Svi ekstrakti su testirani na tri Gram-pozitivna i pet Gram-negativnih sojeva bakterija. Veći broj uzoraka bio je aktivan u odnosu na Gram-pozitivne sojeve, pri čemu uzorci meda od suncokreta i livadskog meda nisu iskazali aktivnost ni prema jednom od testiranih sojeva. U poređnom analizom aktivnosti u odnosu na najosetljiviji soj (*M. lysodeikticus*) nije bilo moguće izvršiti procenu uticaja pčelinjeg polena na osnovu njegovog udela u mešavinama, kao ni profilisanje mešavina u odnosu na biljno poreklo meda. Najaktivniji su bili uzorci pčelinjeg polena **P6**, **P7**, **P8**, s obzirom da su jedino za date uzorke dobijene određene MIK vrednosti za bakterijski soj *B. cereus*. U ovom slučaju neophodna su dalja istraživanja kako bi se

detaljnije proučila veza između biljnog porekla, hemijskog sastava i antibakterijskih svojstava mešavina dva prirodna proizvoda koji ispoljavaju (svaki zasebno) složene mehanizme antimikrobnog delovanja.

Rezultati sveobuhvatne analize polifenolnih profila ispitivanih uzoraka pčelinjeg polena i mešavina polena i meda potvrđuju da analizirani uzorci predstavljaju bogat izvor bioaktivnih jedinjenja odgovornih za terapijsko delovanje ovih pčelinjih proizvoda. Primenjene analitičke procedure koje u kombinaciji sa hemometrijskim metodama omogućavaju procenu određenih bioloških svojstava predstavljaju osnovu za uspostavljanje standarda kvaliteta pčelinjeg polena i preparata na bazi pčelinjeg polena i meda.

---

## 6. LITERATURA

1. Ablajan, Keyume, Zeper Abliz, Xiao-Ya Shang, Jiu-Ming He, Rui-Ping Zhang, and Jian-Gong Shi. 2006. "Structural Characterization of Flavonol 3,7-Di-O-Glycosides and Determination of the Glycosylation Position by Using Negative Ion Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry: JMS* 41 (3): 352–60. <https://doi.org/10.1002/jms.995>.
2. Al, Mărghitaş Liviu, Dezmiorean Daniel, Adela Moise, Otilia Bobis, Laura Laslo, and Stefan Bogdanov. 2009. "Physico-Chemical and Bioactive Properties of Different Floral Origin Honeys from Romania." *Food Chemistry* 112 (4): 863–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.055>.
3. Algethami, Jari S., Aida A. Abd El-Wahed, Mohamed H. Elashal, Hanan R. Ahmed, Esraa H. Elshafiey, Eslam M. Omar, Yahya Al Naggar, et al. 2022. "Bee Pollen: Clinical Trials and Patent Applications." *Nutrients* 14 (14): 2858. <https://doi.org/10.3390/nu14142858>.
4. Almeida, Jacqueline de Florio, Amália Soares dos Reis, Leila Fernanda Serafini Heldt, Daiane Pereira, Mirelli Bianchin, Cristiane de Moura, Manuel Vicente Plata-Oviedo, et al. 2017. "Lyophilized Bee Pollen Extract: A Natural Antioxidant Source to Prevent Lipid Oxidation in Refrigerated Sausages." *LWT - Food Science and Technology* 76 (March):299–305. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.017>.
5. Alves, Andreia, Adalgiza Ramos, Maria Margarida Gonçalves, Maria Bernardo, and Benilde Mendes. 2013. "Antioxidant Activity, Quality Parameters and Mineral Content of Portuguese Monofloral Honeys." *Journal of Food Composition and Analysis* 30 (2): 130–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.009>.
6. Andrić, Filip, and Jelena Trifković. 2023. *Osnove Obrade Podataka u Hemiji*. Beograd: Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
7. Anjos, Ofélia, Rodrigo Fernandes, Susana M. Cardoso, Teresa Delgado, Nelson Farinha, Vanessa Paula, Letícia M. Estevinho, and Solange T. Carpes. 2019. "Bee Pollen as a Natural Antioxidant Source to Prevent Lipid Oxidation in Black Pudding." *LWT* 111 (August):869–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.105>.
8. Attimarad, Mahesh, K.K. Mueen Ahmed, Bandar E. Aldhubaib, and Sree Harsha. 2011. "High-Performance Thin Layer Chromatography: A Powerful Analytical Technique in Pharmaceutical Drug Discovery." *Pharmaceutical Methods* 2 (2): 71–75. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>.
9. Aylanc, Volkan, Soraia I. Falcão, Seymanur Ertosun, and Miguel Vilas-Boas. 2021. "From the Hive to the Table: Nutrition Value, Digestibility and Bioavailability of the Dietary Phytochemicals Present in the Bee Pollen and Bee Bread." *Trends in Food Science & Technology* 109 (March):464–81. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.042>.
10. Barth, Ortrud M., Alex S. Freitas, Erika S. Oliveira, Rosana A. Silva, Fernanda M. Maester, Raquel R. S. Andrella, and Gina M. B. Q. Cardozo. 2010. "Evaluation of the Botanical Origin of Commercial Dry Bee Pollen Load Batches Using Pollen Analysis: A Proposal for Technical Standardization." *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 82 (4): 893–902. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652010000400011>.
11. Bertoncej, Jasna, Urška Dobersek, Mojca Jamnik, and Terezija Golob. 2007. "Evaluation of the Phenolic Content, Antioxidant Activity and Colour of Slovenian Honey." *Food Chemistry* 105 (2): 822–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>.
12. Bogdanov, Stefan. 2012. "Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review."

13. Bogdanov, Stefan, Tomislav Jurendic, Robert Sieber, and Peter Gallmann. 2008. "Honey for Nutrition and Health: A Review." *Journal of the American College of Nutrition* 27 (6): 677–89. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>.
14. Bogdanov, Stefan, Peter Martin, and Cord Lüllmann. 1997. "Harmonised Methods of the European Honey Commission" 28 (extra issue): 1–59.
15. Bridi, Raquel, Elias Atala, Paula Núñez Pizarro, and Gloria Montenegro. 2019. "Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity." *Journal of Natural Products* 82 (3): 559–65. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00945>.
16. Campos, Maria G., Ofélia Anjos, Manuel Chica, Pascual Campoy, Janka Nozkova, Norma Almaraz-Abarca, Lidia M. R. C. Barreto, et al. 2021. "Standard Methods for Pollen Research." *Journal of Apicultural Research* 60 (4): 1–109. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948240>.
17. Campos, Maria G. R., Stefan Bogdanov, Ligia Bicudo de Almeida-Muradian, Teresa Szczesna, Yanina Mancebo, Christian Frigerio, and Francisco Ferreira. 2008. "Pollen Composition and Standardisation of Analytical Methods." *Journal of Apicultural Research* 47 (2): 154–61. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>.
18. Campos, Maria, Kenneth R. Markham, Kevin A. Mitchell, and A. Proenca da Cunha. 1997. "An Approach to the Characterization of Bee Pollens via Their Flavonoid/Phenolic Profiles." *Phytochemical Analysis* 8 (4): 181–85. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199707\)8:4<181::AID-PCA359>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199707)8:4<181::AID-PCA359>3.0.CO;2-A).
19. Carlos, Zuluaga, Juan Carlos Serrato, and Marta Quicazan. 2015. "Chemical, Nutritional and Bioactive Characterization of Colombian Bee-Bread." *Chemical Engineering Transactions* 43:175–80. <https://doi.org/10.3303/CET1543030>.
20. Carpes, Solange. 2009. "Chemical Composition and Free Radical Scavenging Activity of Apis Mellifera Bee Pollen from Southern Brazil." *BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY* 12 (October):220–29. <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900016>.
21. Castiglioni, Sara, Paola Astolfi, Carla Conti, Elga Monaci, Mariassunta Stefano, and Patricia Carloni. 2019. "Morphological, Physicochemical and FTIR Spectroscopic Properties of Bee Pollen Loads from Different Botanical Origin." *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (21): 3974. <https://doi.org/10.3390/molecules24213974>.
22. Cianciosi, Danila, Tamara Forbes-Hernández, Sadia Afrin, Massimiliano Gasparri, Patricia Reboredo-Rodríguez, Piera Manna, Jiaojiao Zhang, et al. 2018. "Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review." *Molecules* 23 (9): 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>.
23. Cieśla, Łukasz, Dorota Staszek, Michał Hajnos, Teresa Kowalska, and Monika Waksmundzka-Hajnos. 2011. "Development of Chromatographic and Free Radical Scavenging Activity Fingerprints by Thin-Layer Chromatography for Selected Salvia Species." *Phytochemical Analysis: PCA* 22 (1): 59–65. <https://doi.org/10.1002/pca.1251>.
24. Claessens, Henk and Marion van Straten. 2004. "Review on the Chemical and Thermal Stability of Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1060 (1–2): 23–41. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01438-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01438-4).
25. Clarke, Dominic, Erica Morley, and Daniel Robert. 2017. "The Bee, the Flower, and the Electric Field: Electric Ecology and Aerial Electoreception." *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 203 (9): 737–48. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1176-6>.
26. Clarke, William. 2017. "Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: Determining the Need and Avoiding Pitfalls." In *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, 1–15. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8>.

27. Conte, Giuseppe, Giovanni Benelli, Andrea Serra, Francesca Signorini, Matteo Bientinesi, Cristiano Nicoletta, Marcello Mele, and Angelo Canale. 2017. "Lipid Characterization of Chestnut and Willow Honeybee-Collected Pollen: Impact of Freeze-Drying and Microwave-Assisted Drying." *Journal of Food Composition and Analysis* 55 (January):12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.001>.
28. Conte, Paola, Alessandra Del Caro, Pietro Paolo Urgeghe, Giacomo Luigi Petretto, Luigi Montanari, Antonio Piga, and Constantino Fadda. 2020. "Nutritional and Aroma Improvement of Gluten-Free Bread: Is Bee Pollen Effective?" *LWT* 118 (January):108711. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108711>.
29. Costa, Maria Cristina A., Marcelo A. Morgano, Marcia Miguel C. Ferreira, and Raquel F. Milani. 2017. "Analysis of Bee Pollen Constituents from Different Brazilian Regions: Quantification by NIR Spectroscopy and PLS Regression." *LWT* 80 (July):76–83. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.003>.
30. Cuyckens, Filip, Raoul Rozenberg, Edmond de Hoffmann, and Magda Claeys. 2001. "Structure Characterization of Flavonoid O-Diglycosides by Positive and Negative Nano-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry: JMS* 36 (11): 1203–10. <https://doi.org/10.1002/jms.224>.
31. De-Melo, Adriane Alexandre Machado, and Ligia Bicudo de Almeida-Muradian. 2017. "Chemical Composition of Bee Pollen." In *Bee Products - Chemical and Biological Properties*, edited by José M Alvarez-Suarez, 221–59. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_11).
32. Didaras, Nikos Asoutis, Katerina Karatasou, Tilemachos G Dimitriou, Grigoris D. Amoutzias, and Dimitris Mossialos. 2020. "Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives." *Antibiotics* 9 (11): 811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>.
33. Dimkić, Ivica, Petar Ristivojević, Tamara Janakiev, Tanja Berić, Jelena Trifković, Dušanka Milojković-Opsenica, and Slaviša Stanković. 2016. "Phenolic Profiles and Antimicrobial Activity of Various Plant Resins as Potential Botanical Sources of Serbian Propolis." *Industrial Crops and Products* 94 (December):856–71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.065>.
34. Durazzo, Alessandra, Massimo Lucarini, Manuela Plutino, Luigi Lucini, Rita Aromolo, Erika Martinelli, Eliana B. Souto, Antonello Santini, and Giuseppe Pignatti. 2021. "Bee Products: A Representation of Biodiversity, Sustainability, and Health." *Life (Basel, Switzerland)* 11 (9): 970. <https://doi.org/10.3390/life11090970>.
35. Działo, Magdalena, Justyna Mierziak, Urszula Korzun, Marta Preisner, Jan Szopa, and Anna Kulma. 2016. "The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (2): 160. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>.
36. El-Seedi, Hesham R., Shaden A. M. Khalifa, Aida Abd El-Wahed, Ruichang Gao, Zhiming Guo, Haroon Elrasheid Tahir, Chao Zhao, et al. 2020. "Honeybee Products: An Updated Review of Neurological Actions." *Trends in Food Science & Technology* 101 (July):17–27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.026>.
37. Ferreres, Federico, R. Llorach, and A. Gil-Izquierdo. 2004. "Characterization of the Interglycosidic Linkage in Di-, Tri-, Tetra- and Pentaglycosylated Flavonoids and Differentiation of Positional Isomers by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry: JMS* 39 (3): 312–21. <https://doi.org/10.1002/jms.586>.
38. Ferreres, Federico, Sara C. Q. Magalhães, A. Gil-Izquierdo, Patrícia Valentão, Ana Rita Jordão Cabrita, António José Mira Fonseca, and Paula Branquinho Andrade. 2017. "HPLC-

- DAD-ESI/MS<sup>n</sup> Profiling of Phenolic Compounds from *Lathyrus Cicera* L. Seeds.” *Food Chemistry* 214 (January):678–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.129>.
39. Ferreres, Federico, David M. Pereira, Patrícia Valentão, and Paula B. Andrade. 2010. “First Report of Non-Coloured Flavonoids in *Echium Plantagineum* Bee Pollen: Differentiation of Isomers by Liquid Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry.” *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 24 (6): 801–6. <https://doi.org/10.1002/rcm.4454>.
  40. Foti, Mario C. 2015. “Use and Abuse of the DPPH • Radical.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (40): 8765–76. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03839>.
  41. Gašić, Uroš. 2017. “Fitohemijski Markeri Botaničkog i Geografskog Porekla Meda.” Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
  42. Gašić, Uroš, Silvio Kečkeš, Dragana Dabić, Jelena Trifković, Dušanka Milojković-Opsenica, Maja Natić, and Živoslav Tešić. 2014. “Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Serbian Polyfloral Honeys.” *Food Chemistry* 145 (February):599–607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.088>.
  43. Giampieri, Francesca, Jose Luis Quiles, Danila Cianciosi, Tamara Yuliett Forbes-Hernández, Francisco Josè Orantes-Bermejo, José Miguel Alvarez-Suarez, and Maurizio Battino. 2022. “Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70 (23): 6833–48. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05822>.
  44. Gonzales, Gerard Bryan, Katleen Raes, Sofie Coelus, Karin Struijs, Guy Smagghe, and John Van Camp. 2014. “Ultra(High)-Pressure Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Time-of-Flight-Ion Mobility-High Definition Mass Spectrometry for the Rapid Identification and Structural Characterization of Flavonoid Glycosides from Cauliflower Waste.” *Journal of Chromatography. A* 1323 (January):39–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.077>.
  45. Gorjanović, Stanislava Ž., José Miguel Alvarez-Suarez, Miroslav M. Novaković, Ferenc T. Pastor, Lato Pezo, Maurizio Battino, and Desanka Ž. Sužnjević. 2013. “Comparative Analysis of Antioxidant Activity of Honey of Different Floral Sources Using Recently Developed Polarographic and Various Spectrophotometric Assays.” *Journal of Food Composition and Analysis* 30 (1): 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.12.004>.
  46. Goupy, Pascale, Maryline Abert Vian, Farid Chemat, and Catherine Caris-Veyrat. 2013. “Identification and Quantification of Flavonols, Anthocyanins and Lutein Diesters in Tepals of *Crocus Sativus* by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array and Ion Trap Mass Spectrometry Detections.” *Industrial Crops and Products* 44 (January):496–510. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.004>.
  47. Guffa, Basem, Nebojša M. Nedić, Dragana Č Dabić Zagorac, Tomislav B. Tosti, Uroš M. Gašić, Maja M. Natić, and Milica M. Fotirić Akšić. 2017. “Characterization of Sugar and Polyphenolic Diversity in Floral Nectar of Different ‘Oblačinska’ Sour Cherry Clones.” *Chemistry & Biodiversity* 14 (9). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700061>.
  48. Habryka, Celina, Robert Socha, and Lesław Juszcak. 2021. “Effect of Bee Pollen Addition on the Polyphenol Content, Antioxidant Activity, and Quality Parameters of Honey.” *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (5): 810. <https://doi.org/10.3390/antiox10050810>.
  49. Halliwell, Barry, Robert Aeschbach, Jürgm Löliger, and Okezie I. Aruoma. 1995. “The Characterization of Antioxidants.” *Food and Chemical Toxicology* 33 (7): 601–17. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00024-V](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00024-V).
  50. Hu, Qizhi, Robert J. Noll, Hongyan Li, Alexander Makarov, Mark Hardman, and R. Graham Cooks. 2005. “The Orbitrap: A New Mass Spectrometer.” *Journal of Mass Spectrometry* 40 (4): 430–43. <https://doi.org/10.1002/jms.856>.
  51. Iftikhar, Arslan, Rimsha Nausheen, Humaira Muzaffar, Muhammad Ahsan Naem, Muhammad Farooq, Mohsin Khurshid, Ahmad Almatroudi, Faris Alrumaihi, Khaled S.

- Allemailem, and Haseeb Anwar. 2022. "Potential Therapeutic Benefits of Honey in Neurological Disorders: The Role of Polyphenols." *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (10): 3297. <https://doi.org/10.3390/molecules27103297>.
52. Juszczak, Lesław, Dorota Gałkowska, Małgorzata Ostrowska, and Robert Socha. 2016. "Antioxidant Activity of Honey Supplemented with Bee Products." *Natural Product Research* 30 (12): 1436–39. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1057582>.
53. Kalaycıoğlu, Zeynep, Hakan Kaygusuz, Serhat Döker, Sevgi Kolaylı, and F. Bedia Erım. 2017. "Characterization of Turkish Honeybee Pollens by Principal Component Analysis Based on Their Individual Organic Acids, Sugars, Minerals, and Antioxidant Activities." *LWT* 84 (October):402–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.003>.
54. Kazazić, Snježana. 2004. "ANTIOKSIDACIJSKA I ANTIRADIKALSKA AKTIVNOST FLAVONOIDA." *Arh Hig Rada Toksikol*, 279–90.
55. Kedare, Sagar B., and Ramnik P. Singh. 2011. "Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay." *Journal of Food Science and Technology* 48 (4): 412–22. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
56. Khider, Manal, Khaled Elbanna, Awad Mahmoud, and Ayman A. Oways. 2013. "Egyptian Honeybee Pollen as Antimicrobial, Antioxidant Agents, and Dietary Food Supplements." *Food Science and Biotechnology* 22 (5): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0238-y>.
57. Kieliszek, Marek, Kamil Piwożarek, Anna M. Kot, Stanisław Błażejak, Anna Chlebowska-Śmigić, and Iwona Wolska. 2018. "Pollen and Bee Bread as New Health-Oriented Products: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 71 (January):170–80. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>.
58. Komosinska-Vassev, Katarzyna, Paweł Olczyk, Justyna Kaźmierczak, Łukasz Mencner, and Krystyna Olczyk. 2015. "Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015:1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>.
59. Kostić, Aleksandar Ž. 2015. "Analiza Hemijskih i Nutritivnih Karakteristika Polena Koji Su Medonosne Pčele Sakupile u Različitim Regionima Srbije." *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
60. Kostić, Aleksandar Ž., Miroljub B. Barać, Sladjana P. Stanojević, Dušanka M. Milojković-Opsenica, Živoslav Lj. Tešić, Branko Šikoparija, Predrag Radišić, Marija Prentović, and Mirjana B. Pešić. 2015. "Physicochemical Composition and Techno-Functional Properties of Bee Pollen Collected in Serbia." *LWT - Food Science and Technology* 62 (1, Part 1): 301–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.031>.
61. Kostić, Aleksandar Ž., Danijel D. Milinčić, Miroljub B. Barać, Mohammad Ali Shariati, Živoslav Lj. Tešić, and Mirjana B. Pešić. 2020. "The Application of Pollen as a Functional Food and Feed Ingredient-The Present and Perspectives." *Biomolecules* 10 (1): 84. <https://doi.org/10.3390/biom10010084>.
62. Kostić, Aleksandar Ž., Danijel D. Milinčić, Uroš M. Gašić, Nebojša Nedić, Sladjana P. Stanojević, Živoslav Lj. Tešić, and Mirjana B. Pešić. 2019. "Polyphenolic Profile and Antioxidant Properties of Bee-Collected Pollen from Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Plant." *LWT* 112 (September):108244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.011>.
63. Kostić, Aleksandar Ž., Mirjana B. Pešić, Mirjana D. Mosić, Biljana P. Dojčinović, Maja M. Natić, and Jelena Đ Trifković. 2015. "Mineral Content of Bee Pollen from Serbia." *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 66 (4): 251–58. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2630>.
64. Kovačić, Zlatko. 1998. *Multivarijaciona Analiza*. Univerzitet u Beogradu - Ekonomski fakultet.
65. Krstić, Đurđa, Tomislav Tosti, Saša Đurović, Milica Fotirić Akšić, Boban Đorđević, Dušanka Milojković-Opsenica, Filip Andrić, and Jelena Trifković. 2022. "Primary Metabolite

- Chromatographic Profiling as a Tool for Chemotaxonomic Classification of Seeds from Berry Fruits.” *Food Technology and Biotechnology* 60 (3): 406–17. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.03.22.7505>.
66. Krystyan, Magdalena, Dorota Gumul, Rafał Ziobro, and Anna Korus. 2015. “The Fortification of Biscuits with Bee Pollen and Its Effect on Physicochemical and Antioxidant Properties in Biscuits.” *LWT - Food Science and Technology* 63 (1): 640–46. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.075>.
67. Küpeli Akkol, Esra, Didem Deliorman Orhan, İlhan Gürbüz, and Erdem Yesilada. 2010. “In Vivo Activity Assessment of a ‘Honey-Bee Pollen Mix’ Formulation.” *Pharmaceutical Biology* 48 (3): 253–59. <https://doi.org/10.3109/13880200903085482>.
68. Larbat, Romain, Cédric Paris, Jacques Le Bot, and Stéphane Adamowicz. 2014. “Phenolic Characterization and Variability in Leaves, Stems and Roots of Micro-Tom and Patio Tomatoes, in Response to Nitrogen Limitation.” *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* 224 (July):62–73. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.010>.
69. LeBlanc, Blaise W., Owen K. Davis, Stephen Boue, Anthony DeLucca, and Thomas Deeb. 2009. “Antioxidant Activity of Sonoran Desert Bee Pollen.” *Food Chemistry* 115 (4): 1299–1305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055>.
70. Lesław Juszczak, Adam Florkiewicz, and Dorota Gałkowska Robert Socha. 2018. “Effect of Honey Supplementation with Bee Products on Quality Parameters and Mineral Composition.” *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 990–97. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i12.1864>.
71. Li, Hua, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, and Hua Wang. 2008. “Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis Vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods.” *Journal of Food and Drug Analysis* 16 (6). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2321>.
72. Li, Qiangqiang, Xinwen Liang, Liang Zhao, Zhongyin Zhang, Xiaofeng Xue, Kai Wang, and Liming Wu. 2017. “UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS-Based Lipidomics Approach To Characterize Lipid Extracts from Bee Pollen and Their in Vitro Anti-Inflammatory Properties.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (32): 6848–60. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02285>.
73. Liolios, Vasilios, Chrysoula Tananaki, Athanasios Papaioannou, Dimitrios Kanelis, Maria-Anna Rodopoulou, and Nikolia Argenta. 2019. “Mineral Content in Monofloral Bee Pollen: Investigation of the Effect of the Botanical and Geographical Origin.” *Journal of Food Measurement and Characterization* 13 (3): 1674–82. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00084-w>.
74. Lozano-Sánchez, Jesús, Isabel Borrás-Linares, Agnes Sass-Kiss, and Antonio Segura-Carretero. 2018. “Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).” In *Modern Techniques for Food Authentication*, 459–526. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00013-X>.
75. Mačukanović-Jocić, Marina. 2010. *Biologija Medonosnog Bilja Sa Atlasom Apiflore Srbije*. Beograd: Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet.
76. Majtan, Juraj, Marcela Bucekova, Ioannis Kafantaris, Piotr Szweda, Katherine Hammer, and Dimitris Mossialos. 2021. “Honey Antibacterial Activity: A Neglected Aspect of Honey Quality Assurance as Functional Food.” *Trends in Food Science & Technology* 118 (December):870–86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.012>.
77. Makarov, Alexander. 2000. “Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis.” *Analytical Chemistry* 72 (6): 1156–62. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.

78. Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana Jiménez. 2004. "Polyphenols: Food Sources and Bioavailability." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5): 727–47. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
79. Manso, Tamara, Marta Lores, and Trinidad de Miguel. 2021. "Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates." *Antibiotics* 11 (1): 46. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046>.
80. March, Raymond E., Errol G. Lewars, Christopher J. Stadey, Xiu-Sheng Miao, Xiaoming Zhao, and Chris D. Metcalfe. 2006. "A Comparison of Flavonoid Glycosides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry." *International Journal of Mass Spectrometry* 248 (1): 61–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.09.011>.
81. Mărgăoan, Rodica, Mirela Stranț, Alina Varadi, Erkan Topal, Banu Yücel, Mihaiela Cornea-Cipcigan, Maria G. Campos, and Dan C. Vodnar. 2019. "Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits." *Antioxidants* 8 (12): 568. <https://doi.org/10.3390/antiox8120568>.
82. Mărghitaș, Liviu A., Oltica G. Stanciu, Daniel S. Dezmirean, Otilia Bobiș, Olimpia Popescu, Stefan Bogdanov, and Maria Graca Campos. 2009. "In Vitro Antioxidant Capacity of Honeybee-Collected Pollen of Selected Floral Origin Harvested from Romania." *Food Chemistry* 115 (3): 878–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014>.
83. Maruyama, Hiroe, Takashi Sakamoto, Yoko Araki, and Hideaki Hara. 2010. "Anti-Inflammatory Effect of Bee Pollen Ethanol Extract from *Cistus* Sp. of Spanish on Carrageenan-Induced Rat Hind Paw Edema." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-30>.
84. Mayda, Nazlı, Asli Özkök, Nesrin Ecem Bayram, Yusuf Gercek, and Kadriye Sorkun. 2020. "Bee Bread and Bee Pollen of Different Plant Sources: Determination of Phenolic Content, Antioxidant Activity, Fatty Acid and Element Profiles." *Journal of Food Measurement and Characterization* 14 (August). <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y>.
85. Medeiros, Karina.C.P., Camila Alexandrina V. Figueiredo, T.B. Figueredo, Kristerson R.L. Freire, F.A.R. Santos, Neuza Maria Alcântara-Neves, Tânia .Maria Sarmiento Da Silva, and Marcia R. Piuvezam. 2008. "Anti-Allergic Effect of Bee Pollen Phenolic Extract and Myricetin in Ovalbumin-Sensitized Mice." *Journal of Ethnopharmacology* 119 (1): 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.036>.
86. Mihajlovic, Luka, Jelena Radosavljevic, Lidija Burazer, Katarina Smiljanic, and Tanja Cirkovic Velickovic. 2015. "Composition of Polyphenol and Polyamide Compounds in Common Ragweed (*Ambrosia Artemisiifolia* L.) Pollen and Sub-Pollen Particles." *Phytochemistry* 109 (January):125–32. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.022>.
87. Milojković-Opsenica, Dušanka. 2000. "Sorbenti u Hromatografiji Na Tankom Sloju." *Hemijski Pregled*, no. 41, 38–43.
88. Milojković-Opsenica, Dušanka M, and Živoslav Lj Tešić. 2017. "Assessment of the Authenticity of Honey." *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 100 (4): 825–26. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0141>.
89. Milojković-Opsenica, Dušanka M., Jelena Đ. Trifković, Petar M. Ristivojević, and Filip Lj. Andrić. 2022. "Thin-Layer Chromatography in the Authenticity Testing of Bee-Products." *Journal of Chromatography B* 1188 (January):123068. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123068>.
90. Morais, Margarida, Leandro Moreira, Xesús Feás, and Leticia M. Estevinho. 2011. "Honeybee-Collected Pollen from Five Portuguese Natural Parks: Palynological Origin, Phenolic Content, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 49 (5): 1096–1101. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020>.

91. Morlock, Gertrud, and Wolfgang Schwack. 2010. "Hyphenations in Planar Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1217 (43): 6600–6609. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.058>.
92. Mosić, Mirjana, Aleksandra Dramićanin, Petar Ristivojević, and Dušanka Milojković-Opsenica. 2020. "Extraction as a Critical Step in Phytochemical Analysis." *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 103 (2): 365–72. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0251>.
93. Nainu, Firzan, Ayu Masyita, Muh Akbar Bahar, Muhammad Raihan, Shajuthi Rahman Prova, Saikat Mitra, Talha Bin Emran, and Jesus Simal-Gandara. 2021. "Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties." *Antibiotics* 10 (7): 822. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070822>.
94. Nicholls, Elizabeth, and Natalie Hempel de Ibarra. 2017. "Assessment of Pollen Rewards by Foraging Bees." *Functional Ecology* 31 (1): 76–87. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12778>.
95. Nogueira, Carla, Antonio Iglesias, Xesus Feás, and Leticia M. Estevinho. 2012. "Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach." *International Journal of Molecular Sciences* 13 (9): 11173–87. <https://doi.org/10.3390/ijms130911173>.
96. Note, Margot. 2011. "Digital Image Basics." In *Managing Image Collections*, 39–59. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84334-599-2.50002-7>.
97. Özkök, Duran, and Sibel Silici. 2017. "Antioxidant Activities of Honeybee Products and Their Mixtures." *Food Science and Biotechnology* 26 (1): 201–6. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0027-0>.
98. Pascoal, Ananias, Sandra Rodrigues, Alfredo Teixeira, Xesus Feás, and Leticia M. Estevinho. 2014. "Biological Activities of Commercial Bee Pollens: Antimicrobial, Antimutagenic, Antioxidant and Anti-Inflammatory." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 63 (January):233–39. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>.
99. Petretto, Giacomo L., Massimo Cossu, and Maria C. Alamanni. 2015. "Phenolic Content, Antioxidant and Physico-Chemical Properties of Sardinian Monofloral Honeys." *International Journal of Food Science & Technology* 50 (2): 482–91. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12652>.
100. Pietta, Pier-Giorgio. 2000. "Flavonoids as Antioxidants." *Journal of Natural Products* 63 (7): 1035–42. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.
101. Pinto, Barbara, Francesca Caciagli, Elisabetta Riccio, Daniela Reali, Ana Šarić, Tihomir Balog, Saša Likić, and Roberto Scarpato. 2010. "Anti-estrogenic and Antigenotoxic Activity of Bee Pollen from *Cystus Incanus* and *Salix Alba* as Evaluated by the Yeast Estrogen Screen and the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes." *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (9): 4122–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.06.001>.
102. Pita-Calvo, Consuelo, and Manuel Vázquez. 2017. "Differences between Honeydew and Blossom Honeys: A Review." *Trends in Food Science & Technology* 59 (January):79–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.015>.
103. Platzer, Melanie, Sandra Kiese, Thomas Herfellner, Ute Schweiggert-Weisz, and Peter Eisner. 2021. "How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay?" *Antioxidants* 10 (5): 811. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>.
104. Platzer, Melanie, Sandra Kiese, Thorsten Tybussek, Thomas Herfellner, Franziska Schneider, Ute Schweiggert-Weisz, and Peter Eisner. 2022. "Radical Scavenging Mechanisms of Phenolic Compounds: A Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Study." *Frontiers in Nutrition* 9 (April):882458. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.882458>.

105. Radziszewski, J. George, Michal Gil, Alexandr Gorski, Jens Spanget-Larsen, Jacek Waluk, and Bogusław J. Mróz. 2001. "Electronic States of the Phenoxyl Radical." *The Journal of Chemical Physics* 115 (21): 9733–38. <https://doi.org/10.1063/1.1415465>.
106. Reuhs, Bradley L. 2017. "High-Performance Liquid Chromatography." In *Food Analysis*, edited by S. Suzanne Nielsen, 213–26. Food Science Text Series. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13).
107. Rice-Evans, Catherine A., Nicholas J. Miller, and George Paganga. 1996. "Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids." *Free Radical Biology and Medicine* 20 (7): 933–56. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
108. Ristivojević, Petar, Filip Andrić, Jelena Trifković, Irena Vovk, Ljubiša Stanisavljević, Živoslav Lj. Tešić, and Dušanka Milojković-Opsenica. 2014. "Pattern Recognition Methods and Multivariate Image Analysis in HPTLC Fingerprinting of Propolis Extracts." *Journal of Chemometrics* 28 (4): 301–10. <https://doi.org/10.1002/cem.2592>.
109. Ristivojević, Petar, Jelena Trifković, Filip Andrić, and Dušanka Milojković-Opsenica. 2020. "Recent Trends in Image Evaluation of HPTLC Chromatograms." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 43 (9–10): 291–99. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725555>.
110. Ristivojević, Petar, Jelena Trifković, Irena Vovk, and Dušanka Milojković-Opsenica. 2017. "Comparative Study of Different Approaches for Multivariate Image Analysis in HPTLC Fingerprinting of Natural Products Such as Plant Resin." *Talanta* 162 (January):72–79. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.023>.
111. Rocchetti, Gabriele, Sara Castiglioni, Gianluca Maldarizzi, Patricia Carloni, and Luigi Lucini. 2019. "UHPLC-ESI-QTOF-MS Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of Bee Pollen from Different Botanical Origin." *International Journal of Food Science & Technology* 54 (2): 335–46. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13941>.
112. Rösch, Daniel, Angelika Krumbein, Clemens Mügge, and Lothar W. Kroh. 2004. "Structural Investigations of Flavonol Glycosides from Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) Pomace by NMR Spectroscopy and HPLC-ESI-MS(n)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (13): 4039–46. <https://doi.org/10.1021/jf0306791>.
113. Rzepecka-Stojko, Anna, Jerzy Stojko, Anna Kurek-Górecka, Michał Górecki, Agata Kabała-Dzik, Robert Kubina, Aleksandra Moździerz, and Ewa Buszman. 2015. "Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity." *Molecules* 20 (12): 21732–49. <https://doi.org/10.3390/molecules201219800>.
114. Sagona, Simona, Rachele Bozzicolonna, Roberta Nuvoloni, Giovanni Cilia, Beatrice Torracca, and Antonio Felicoli. 2017. "Water Activity of Fresh Bee Pollen and Mixtures of Bee Pollen-Honey of Different Botanical Origin." *LWT* 84 (October):595–600. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.015>.
115. Sánchez-Moreno, Concepción. 2002. "Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems." *Food Science and Technology International* 8 (3): 121–37. <https://doi.org/10.1177/1082013202008003770>.
116. Sawicki, Tomasz, Małgorzata Starowicz, Lucyna Kłębukowska, and Paweł Hanus. 2022. "The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products." *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (4): 1301. <https://doi.org/10.3390/molecules27041301>.
117. Senguttuvan, Jamuna, and Paulsamy Subramaniam. 2016. "HPTLC Fingerprints of Various Secondary Metabolites in the Traditional Medicinal Herb *Hypochaeris Radicata* L." *Journal of Botany* 2016 (February):e5429625. <https://doi.org/10.1155/2016/5429625>.
118. Shah, Aenakshi, Chitra Varma, Sandeep Patankar, and Vilasrao Kadam. 2013. "Plant Glycosides and Aglycones Displaying Antiproliferative and Antitumour Activities – A

- Review.” *Current Bioactive Compounds* 9 (4): 288–305. <https://doi.org/10.2174/1573407209999131231095332>.
119. Šimunović, Katarina, Helena Abramović, Nataša Lilek, Marija Angelova, Lucija Podržaj, and Sonja Smole Možina. 2019. “MICROBIOLOGICAL QUALITY, ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF SLOVENIAN BEE POLLEN.” *AGROFOR* 4 (1). <https://doi.org/10.7251/AGRENG1901082S>.
120. Singleton, Vernon L., Rudolf Orthofer, and Rosa M. Lamuela-Raventós. 1999. “[14] Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent.” In *Methods in Enzymology*, 299:152–78. Oxidants and Antioxidants Part A. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
121. Spanget-Larsen, Jens, Michał Gil, Alexandr Gorski, Daniel M. Blake, Jacek Waluk, and J. George Radziszewski. 2001. “Vibrations of the Phenoxy Radical.” *Journal of the American Chemical Society* 123 (45): 11253–61. <https://doi.org/10.1021/ja0113596>.
122. Stanković, Mirjana. 2012. “Analiza Polifenolnih Supstanci Iz Polena Medonosnih Biljaka.” *Master rad*, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
123. Tešević, Vele. 2013. *Osnove Masene Spektrometrije Organskih Jedinjenja*. Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
124. Thakur, Mamta, and Vikas Nanda. 2020. “Composition and Functionality of Bee Pollen: A Review.” *Trends in Food Science & Technology* 98 (April):82–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>.
125. Trifković, Jelena. 2013. “Određivanje Kvantitativnog Odnosa Strukture i Retencije Arilpiperazina Primenom Tečne Hromatografije i Multivarijantnih Hemometrijskih Metoda.” Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
126. Tsao, Rong. 2010. “Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols.” *Nutrients* 2 (12): 1231–46. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.
127. Turhan, Sadettin, Furkan Turker Saricaoglu, Mustafa Mortas, Fehmi Yazici, and Huseyin Gencecep. 2017. “Evaluation of Color, Lipid Oxidation and Microbial Quality in Meatballs Formulated with Bee Pollen During Frozen Storage: Evaluation of Quality of Meatballs with Pollen.” *Journal of Food Processing and Preservation* 41 (3): e12916. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12916>.
128. Valverde, Silvia, Jesús A. Tapia, Araceli Pérez-Sanz, Amelia V. González-Porto, Mariano Higes, Juan J. Lucena, Raquel Martín-Hernández, and José Bernal. 2023. “Mineral Composition of Bee Pollen and Its Relationship with Botanical Origin and Harvesting Period.” *Journal of Food Composition and Analysis* 119 (June):105235. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105235>.
129. Vasić, Vesna, Uroš Gašić, Dalibor Stanković, Dražen Lušić, Darija Vukić-Lušić, Dušanka Milojković-Opsenica, Živoslav Tešić, and Jelena Trifković. 2019. “Towards Better Quality Criteria of European Honeydew Honey: Phenolic Profile and Antioxidant Capacity.” *Food Chemistry* 274 (February):629–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.045>.
130. Waisi, Hadi, Aleksandra M. Dramićanin, Đurđa D. Krstić, Dušanka Milojković-Opsenica, Bogdan Nikolić, Vesna Dragilevic, and Jelena Trifković. 2015. “Polyphenolic Profile of Maize Seedlings Treated with 24-Epibrassinolide.” *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2015/976971>.
131. Wan Omar, Wan Adnan, Nur Asna Azhar, Nurdianah Harif Fadzilah, and Nik Nur Syazni Nik Mohamed Kamal. 2016. “Bee Pollen Extract of Malaysian Stingless Bee Enhances the Effect of Cisplatin on Breast Cancer Cell Lines.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (3): 265–69. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.011>.
132. Weis, Wilson, Nicolas Ripari, Fernanda Lopes Conte, Mariana Da Silva Honorio, Arthur Sartori, Ramon Matucci, and José Sforcin. 2022. “An Overview about Apitherapy and Its

- Clinical Applications.” *Phytomedicine Plus* 2 (February):100239. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100239>.
133. Xiao, Jianbo. 2015. “Dietary Flavonoid Aglycones and Their Glycosides: Which Show Better Biological Significance?” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, July, 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>.
134. Xu, Xiaoqing, Aimei Liu, Siyi Hu, Irma Ares, María-Rosa Martínez-Larrañaga, Xu Wang, Marta Martínez, Arturo Anadón, and María-Aránzazu Martínez. 2021. “Synthetic Phenolic Antioxidants: Metabolism, Hazards and Mechanism of Action.” *Food Chemistry* 353 (August):129488. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129488>.
135. Yıldız, Oktay, Zehra Can, Özlem Saral, Esin Yuluğ, Ferhat Öztürk, Rezzan Aliyazıcıoğlu, Sinan Canpolat, and Sevgi Kolaylı. 2013. “Hepatoprotective Potential of Chestnut Bee Pollen on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damages in Rats.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013:1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/461478>.
136. Zammit Young, Gerard-William, and Renald Blundell. 2023. “A Review on the Phytochemical Composition and Health Applications of Honey.” *Heliyon* 9 (2): e12507. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12507>.
137. Zhang, Xiaoxia, Zongtao Lin, Jinggui Fang, Meixian Liu, Yanyan Niu, Shizhong Chen, and Hong Wang. 2015. “An On-Line High-Performance Liquid Chromatography–Diode-Array Detector–Electrospray Ionization–Ion-Trap–Time-of-Flight–Mass Spectrometry–Total Antioxidant Capacity Detection System Applying Two Antioxidant Methods for Activity Evaluation of the Edible Flowers from *Prunus Mume*.” *Journal of Chromatography A* 1414 (October):88–102. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.033>.
138. Zhou, Jinhui, Yitao Qi, Joan Ritho, Yongxin Zhang, Xiaowei Zheng, Liming Wu, Yi Li, and Liping Sun. 2015. “Flavonoid Glycosides as Floral Origin Markers to Discriminate of Unifloral Bee Pollen by LC–MS/MS.” *Food Control* 57 (November):54–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.035>.

## 7. PRILOG

Tabela P1. Rezultati testiranja osetljivosti ispitivanih sojeva bakterija u odnosu na ekstrakte uzoraka difuzionom metodom

| Bakterije                         |   |  |                                   |                                    |  |   |  |
|-----------------------------------|---|--|-----------------------------------|------------------------------------|--|---|--|
| Gram pozitivni bakterijski sojevi |   |  |                                   | Gram negativni bakterijski sojevi  |  |   |  |
|                                   | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 | <i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199 | <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 |
| Oznake uzoraka                    | Prečnik zone (mm)                       |  |                                   |                                    |  |   |  |
| P1                                | /                                       | 21,0                                       | /                                 | /                                  | /  | 8,0                                       | /  |
| P2                                | 25,0                                    | 19,0                                       | 8,0                               | /                                  | /  | /   | /  |
| P3                                | 20,0                                    | 21,0                                       | 10,0                              | /                                  | /  | /   | /  |
| P4                                | 22,0                                    | 20,0                                       | 11,0                              | /                                  | /  | /   | /  |
| P5                                | 20,0                                    | 23,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | 11,0                                     |
| P6                                | 22,0                                    | 22,0                                       | 10,0                              | 15,0                               | /  | /   | /  |
| P7                                | 25,0                                    | 21,0                                       | 10,0                              | 12,5                               | /  | /   | /  |
| P8                                | 20,0                                    | 21,0                                       | 11,0                              | 30,0                               | /  | /   | 12,0                                     |
| B1/1                              | 27,0                                    | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 13,0                                     | /   | /  |
| B1/2                              | /                                       | 12,0                                       | /                                 | /                                  | 17,0                                     | /   | /  |
| B1/3                              | 22,0                                    | 11,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| B1/4                              | /                                       | 11,0                                       | /                                 | /                                  | 20,0                                     | /   | /  |
| B1/5                              | 28,0                                    | 12,0                                       | /                                 | /                                  | 17,0                                     | /   | /  |
| B1/6                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 13,0                                     | /   | /  |
| B1/7                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| B1/8                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L1/1                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 20,0                                     | /   | /  |
| L1/2                              | 20,0                                    | 12,0                                       | /                                 | /                                  | 12,0                                     | /   | /  |
| L1/3                              | 20,0                                    | 12,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L1/4                              | 20,0                                    | 12,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L1/5                              | 20,0                                    | 13,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |

Tabela P1. Nastavak

| Bakterije                         |   |  |                                   |                                    |  |   |  |
|-----------------------------------|---|--|-----------------------------------|------------------------------------|--|---|--|
| Gram pozitivni bakterijski sojevi |   |  |                                   | Gram negativni bakterijski sojevi  |  |   |  |
| Oznake uzoraka                    | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 | <i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199 | <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 |
| Prečnik zone (mm)                 |   |  |                                   |                                    |  |   |  |
| L1/6                              | 25,0                                    | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 27,0                                     | /   | /  |
| L1/7                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L1/8                              | /                                       | 15,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S1/1                              | /                                       | 15,0                                       | /                                 | /                                  | 12,0                                     | /   | /  |
| S1/2                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 11,0                                     | /   | /  |
| S1/3                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 13,0                                     | /   | /  |
| S1/4                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 12,0                                     | /   | /  |
| S1/5                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 11,0                                     | /   | /  |
| S1/6                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 17,0                                     | /   | /  |
| S1/7                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 25,0                                     | /   | /  |
| S1/8                              | /                                       | 12,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| B2/1                              | 25,0                                    | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 13,0                                     | /   | /  |
| B2/2                              | 25,0                                    | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 12,0                                     | /   | /  |
| B2/3                              | 26,0                                    | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| B2/4                              | 30,0                                    | 16,0                                       | /                                 | /                                  | 13,0                                     | /   | /  |
| B2/5                              | 25,0                                    | 15,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| B2/6                              | 25,0                                    | 15,0                                       | /                                 | 25,0                               | 26,0                                     | /   | /  |
| B2/7                              | 27,5                                    | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 11,0                                     | /   | /  |
| B2/8                              | 27,5                                    | 14,0                                       | /                                 | /                                  | 15,0                                     | /   | /  |
| L2/1                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L2/2                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L2/3                              | /                                       | 16,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L2/4                              | /                                       | 17,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L2/5                              | /                                       | 17,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |

Tabela P1. Nastavak

| Bakterije                         |   |  |                                   |                                    |  |   |  |
|-----------------------------------|---|--|-----------------------------------|------------------------------------|--|---|--|
| Gram pozitivni bakterijski sojevi |   |  |                                   | Gram negativni bakterijski sojevi  |  |   |  |
| Oznake uzoraka                    | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 | <i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199 | <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 | <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 |
| Prečnik zone (mm)                 |   |  |                                   |                                    |  |   |  |
| L2/6                              | /                                       | 18,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| L2/7                              | /                                       | 16,0                                       | /                                 | /                                  | 25,0                                     | /   | /  |
| L2/8                              | /                                       | 17,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/1                              | /                                       | 15,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/2                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/3                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/4                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/5                              | /                                       | 14,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/6                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | 18,0                                     | /   | /  |
| S2/7                              | /                                       | 13,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S2/8                              | /                                       | 15,0                                       | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| B                                 | 30,0                                    | /  | /                                 | /                                  | 20,0                                     | /   | /  |
| L                                 | /                                       | /  | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| S                                 | /                                       | /  | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |
| Tetraciklin                       | /                                       | /  | 8,5                               | 16,0                               | 16,5                                     | /   | /  |
| Streptomycin                      | /                                       | 44,0                                       | 14,0                              | /                                  | /  | /   | 32,0                                     |
| Metanol                           | /                                       | /  | /                                 | /                                  | /  | /   | /  |

---

## BIOGRAFIJA

Mirjana D. Mosić (rođ. Stanković) rođena je 03.02.1985. u Leskovcu, Republika Srbija. Osnovnu školu, muzičku školu i gimnaziju završila je u Lebanu. Osnovne akademske studije na studijskom programu Diplomirani hemičar na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/05. godine. Diplomirala je na Katedri za analitičku hemiju jula 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,10 i ocenom 10 na diplomskom ispitu, kod mentora dr Dušanke Milojković-Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, čime je stekla zvanje diplomirani hemičar. Master akademske studije na studijskom programu „Hemija“ na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je je školske 2011/12. godine, kod mentora dr Dušanke Milojković-Opsenice, redovnog profesora Hemijskog fakulteta. Master rad pod naslovom „Analiza polifenolnih supstanci iz polena medonosnih biljaka“ odbranila je u junu 2012. godine, sa ocenom 10 i stekla zvanje master hemičar. Doktorske akademske studije na studijskom programu „Hemija“ pri katedri za Analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2012/13. godine.

Od oktobra 2012. do februara 2023. godine bila je zaposlena kao stručno-tehnički saradnik, a od marta 2024. godine kao samostalni stručno-tehnički saradnik na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od aprila 2020. godine angažovana je u InovaLab – akreditovanoj laboratoriji Inovacionog centra Hemijskog fakulteta u Beogradu kao Analitičar.

Decembra 2021. godine izabrana je u zvanje Istraživač- saradnik.

U dosadašnjem naučno-istraživačkom radu Mirjana Mosić je bila angažovana kao istraživač na dva bilateralna projekta: „Unapređenje istraživačkih kapaciteta za pouzdanu potvrdu autentičnosti pčelinjih proizvoda” (Srbija – Slovenija, projektni ciklus 2016-2017) i „Jačanje bilateralnih institucija u cilju postizanja vodećih centara za određivanje autentičnosti pčelinjih proizvoda” (Srbija – Hrvatska, projektni ciklus 2015-2016).

Član je Srpskog hemijskog društva.

Mirjana D. Mosić je koautor pet naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima i to: dva rada kategorije M21, jedan M22 i dva rada kategorije M23, kao i tri saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja štampanih u izvodu. Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, prikazani su u okviru dva naučna rada i jednog saopštenja na naučnom skupu nacionalnog značaja (M64). Jedan rad štampan je u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), a drugi u istaknutom međunarodnom časopisu (M22).

---

## Bibliografija

### Naučni radovi

1. **Mosić Mirjana**, Trifković Jelena, Ristivojević Petar, Milojković-Opsenica Dušanka. 2023. **Quality Assessment of Bee Pollen-Honey Mixtures Using Thin-Layer Chromatography in Combination with Chemometrics.** *Chemistry and Biodiversity*, 20, e202201141. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201141>
2. Campos Maria G., ... Tešić Živoslav, **Mosić Mirjana**, Kostić Aleksandar, Pešić Mirjana, Milojković-Opsenica, Dušanka... 2021. Standard Methods for Pollen Research. *Journal of Apicultural Research*, 60 (4): 1–109. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948240>
3. **Mosić Mirjana**, Trifković Jelena, Vovk Irena, Gašić Uroš, Tešić Živoslav, Šikoparija Branko, Milojković-Opsenica Dušanka. 2019. **Phenolic Composition Influences the Health-Promoting Potential of Bee-Pollen.** *Biomolecules*, 9(12): 783-797. <https://doi.org/10.3390/biom9120783>
4. **Mosić Mirjana**, Dramićanin Aleksandra, Ristivojević Petar, Milojković-Opsenica Dušanka. 2019. Extraction as a critical step in phytochemical analysis. *Journal of AOAC International*, 103(2): 365–372. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0251>
5. Kostić Aleksandar, Pešić Mirjana, **Mosić Mirjana**, Dojčinović Biljana, Natić Maja., Trifković Jelena. 2015. Mineral content of bee pollen from Serbia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 66: 251-258. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2630>

### Saopštenja

1. Kostić Aleksandar, Pešić Mirjana, **Mosić Mirjana**, Natić Maja. 2014. Content of Sugars, Phenolics and Minerals in some Serbian Bee-collected Pollen. *International Symposium on Bee Products - 3rd Edition (Annual meeting of the International Honey Commission)*, Opatija, Croatia, Book of Abstracts, AT-P-3.pp 91
2. Milojković-Opsenica Dušanka, **Mosić Mirjana**, Kostić Aleksandar, Pešić Mirjana, Stanisavljević Ljubiša, Trbović Dejan, Tešić Živoslav. 2013. Chemical and nutritonal characterization of honeybee-collected pollen from Serbia. *XXXIII Apimondia International Apicultural Congress*, Kyiv, Ukraine, 29.09 -04.10.2013. Book of Abstracts, RD19
3. **Stanković Mirjana**, Trifković Jelena, Andrić Filip, Nedić Nebojša, Tešić Živoslav, Milojković-Opsenica Dušanka. 2012. **Determination of polyphenolic compounds in bee pollen from Serbia by UPLC-LTQ-orbitrap MS-MS.** *50th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia*, Book of Abstracts P16, ISBN 978-86-7132-048-1

---

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Мирјана Мосић**

Број индекса **ДХ38/2012**

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

#### **Упоредна анализа полифенолног састава, антиоксидативне и антимицробне активности пчелињег полена и мешавина полена и меда**

- 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 19.6.2024.

Потпис аутора Мирјана Мосић

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Мирјана Мосић**  
Број индекса **ДХ38/2012**  
Студијски програм **Хемија**  
Наслов рада **Упоредна анализа полифенолног састава, антиоксидативне и  
антимикробне активности пчелињег полена и мешавина  
полена и меда**

Ментор др Душанка Милојковић-Опсеница

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала 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.

У Београду, 19.6.2024.

Потпис аутора Мирјана Мосић

---

## Изјава о коришћењу

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

### Упоредна анализа полифенолног састава, антиоксидативне и антимикробне активности пчелињег полена и мешавина полена и меда

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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).

У Београду, 19. 6. 2024.

Потпис аутора Јелена Јосић

- 
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.