



UNIVERZITET U NIŠU
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



Jelena S. Mitrović

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL POLIFENOLA I ULJA SEMENA
KOPRIVE (*URTICA DIOICA* L.) I KARAKTERIZACIJA PROIZVODA
OD PŠENIČNOG BRAŠNA SA DODATKOM SEMENA KOPRIVE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Leskovac, 2023.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



Jelena S. Mitrović

**THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF POLYPHENOLS AND OIL
FROM NETTLE SEEDS (*URTICA DIOICA* L.) AND THE
CHARACTERIZATION OF PRODUCTS MADE FROM WHEAT
FLOUR WITH THE ADDITION OF NETTLE SEEDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2023.

MENTOR:

Prof. dr Nada Nikolić, redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Ivana Karabegović, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Prof. dr Mirjana Pešić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Poljoprivredni fakultet

Prof. dr Olivera Šimurina, viši naučni saradnik
Naučni institut za prehrambene tehnologije
Novi Sad

Dr Saša Savić, docent
Univerzitet u Nišu
Tehnološki fakultet u Leskovcu

Datum odbrane: 29.06.2023. godine

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: prof. dr Nada Nikolić, redovni profesor
Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Naslov: Antioksidativni potencijal polifenola i ulja semena koprive (*Urtica dioica* L.)
i karakterizacija proizvoda od pšeničnog brašna sa dodatkom semena koprive

Rezime: Savremeno čovečanstvo se decenijama suočava sa pojavom velikog broja bolesti nastalih nepravilnom i neuravnoteženom ishranom i drugim faktorima rizika. Prehrambena industrija je zbog toga sve više usmerena ka poboljšanju kvaliteta i zdravstvenoj bezbednosti proizvoda. Upotreba i primena biljaka i njihovih ekstrakata je široko zastupljena u proizvodnji funkcionalne hrane koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava, ispoljava farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje. Zbog svog nutritivnog i funkcionalnog bogatstva, ali i zbog njene vrednosti u pogledu iskorišćenja svih njenih delova (stabljika, lišće, koren i seme), kopriva je predmet sve većeg naučnog interesovanja i razvoja novih proizvoda. Seme koprive kao nedovoljno istraženi deo ove tradicionalne, široko korišćene lekovite biljke, zavređuje veliku pažnju naučne javnosti, ali i šire zdravstvene zajednice. Procena vrednosti semena koprive kao potencijalne funkcionalne hrane i prehrambene sirovine jedan je od bitnijih segmenata ovog naučnog istraživanja. Podjednaka važnost pripisuje se i karakterizaciji potencijalnog funkcionalnog proizvoda na bazi pšeničnog brašna obogaćenog biološki aktivnim komponentama iz semena koprive. S tim u vezi, izvršena je hemijska karakterizacija (sadržaj makronutrijenata i mineralnih materija, sadržaj slobodnih i vezanih polifenola i njihova antioksidativna i antimikrobna aktivnost) semena koprive i ispitane su njegove morfološke karakteristike. Analiziran je uticaj rastvarača na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja. Antioksidativni potencijal određen je primenom DPPH i FRAP testa i testom redukcione snage i određene su korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala. Izvršena je ekstrakcija ulja iz semena koprive i

njegova hemijska karakterizacija (saponifikacioni, jodni, kiselinski i estarski broj, sastav acilglicerola i masnih kiselina i antioksidativni potencijal). Ulje semena koprive je analizirano u pogledu oksidativne stabilnosti primenom ne-izotermnog i izotermnog režima diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), određeni su kinetički parametri oksidacije i vreme indukcije (otpornost na oksidaciju). Zamenom dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primenom vodenog ekstrakta semena koprive za zames testa, formirani su prehrambeni proizvodi i ispitan uticaj dodatka semena na sadržaj makronutrijenata, mineralnih materija i polifenolnih jedinjenja i njihov antioksidativni potencijal. Poseban deo predstavlja analiza promena sadržaja polifenola i njihovog antioksidativnog potencijala tokom termičke obrade proizvoda. Određeni su tehnološki parametri (zapremina i „širenje“ proizvoda) i senzorna svojstva (izgled, boja, konzistencija/tekstura i aroma) proizvoda i izvršeno poređenje sa proizvodom dobijenim samo od pšeničnog brašna. S obzirom na to da oksidativna stabilnost dobijenih prehrambenih proizvoda u najvećoj meri zavisi od ulja proizvoda, DSC analizom je analizirana njihova stabilnost. Rezultati su pokazali da je seme koprive pogodna sirovina za dobijanje proizvoda sa unapređenim funkcionalnim, nutritivnim i senzornim svojstvima. Zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive dovela je do značajnog povećanja sadržaja aktivnih komponenti (kao što su polifenolna jedinjenja) i značajno boljeg antioksidativnog potencijala proizvoda, ukazujući na dobar potencijal ove biljne sirovine u kreiranju funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Evidentno je i povećanje u sadržaju proteina, lipida, vlakana, pepela i svih esencijalnih minerala, pri čemu je kalcijum najzastupljeniji među makroelementima, a gvožđe među mikroelementima. Pokazatelji senzornog kvaliteta (izgled, tekstura, miris i ukus) proizvoda ukazuju da zamena pšeničnog brašna samlevenim semenom u proizvodnji proizvoda rezultira finalnim proizvodom boljeg kvaliteta. DSC analizom ustanovljena je i veća termooksidativna stabilnost proizvoda sa dodatkom semena koprive. Rezultati ukazuju da proizvod sa semenom koprive po svojim karakteristikama može doprineti proširenju asortimana funkcionalnih proizvoda na tržištu. Termička obrada proizvoda dovela je do značajnih promena sadržaja slobodnih i vezanih

polifenolnih jedinjenja i do različitog uticaja na antioksidativni potencijal, u zavisnosti od oblika polifenola (slobodni ili vezani), porekla polifenola (iz pšenice, ekstrakta ili semena koprive) i metode ispitivanja antioksidativnog potencijala (DPPH ili redukciona snaga). Ulje semena koprive pripada grupi jestivih ulja linolnog tipa, visokog je nutritivnog kvaliteta (sadržaj linolne masne kiseline iznosi 86,05%) i visoko nezasićeno ulje (vrednost jodnog broja je 117,54 mg J₂/g ulja). U pogledu antioksidativnog potencijala, hidrofilna frakcija ulja pokazuje veći antioksidativni potencijal u odnosu na lipofilnu frakciju i nefrakcionisano ulje. DSC analiza pokazuje da ulje semena koprive ima izraženu termooksidativnu stabilnost, a visoka koncentracija polinezasićenih masnih kiselina ga čini alternativnim izvorom sirovine za prehrambenu, kozmetičku i druge industrije.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Prehrambene tehnologije i biotehnologija

Ključne reči: Seme koprive, ulje, polifenolna jedinjenja, antioksidativni potencijal, DSC, oksidativna stabilnost, funkcionalni proizvodi, senzorna svojstva, nutritivna svojstva

UDK: 664.143/.149 : 582.635.5 + 615.322 : 547.565 (043.3)

CERIF
klasifikacija: T430 Tehnologija hrane i pića

Tip licence
Kreativne
zajednice: **CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral supervisor:

prof. dr Nada Nikolić, professor

Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš

Title:

The antioxidant potential of polyphenols and oil from nettle seeds (*Urtica dioica* L.) and the characterization of products made from wheat flour with the addition of nettle seeds

Abstract:

Modern-day humans are facing an increase in the number of diseases resulting from an inappropriate and unbalanced diet as well as from other risk factors. The food industry has, as a result, shifted more focus on the improvement of the quality and the health safety of its products. The use and implementation of plants and their extracts is widespread in the production of functional food, which in addition to satisfactory nutritional values, also has pharmacological and physiological effects on human health. Due to its nutritional and functional wealth, but also due to its value in terms of the viability of all its parts (the stalk, leaves, roots, and seeds), the nettle has been a topic of increased scientific interest and the development of new products. Nettle seeds, as an insufficiently studied part of this traditional, widely used medicinal plant, warrant considerable attention from the scientific public, but also the health community at large. An estimate of the value of nettle seeds as potential functional food and raw food material is one of the more important segments of this study. Equal importance is also ascribed to the characteristics of a potential functional product based on wheat flour enriched by biologically active components from nettle seeds. Therefore, a chemical characterization (the content of macronutrients and mineral matter, the content of free and bound polyphenols and their oxidative and antimicrobial activity) of nettle seeds was provided, and their morphological characteristics studied. The impact of a solvent on the content and antioxidative potential of polyphenol compounds was analyzed. The antioxidative potential was determined using the DPPH and FRAP test as well as reducing power test, and the correlations between the content of the polyphenol compounds and antioxidative potential

were determined. Oil was extracted from nettle seeds and its chemical characterization (its saponification, iodine, acid, and ester numbers, acylglycerol and fatty acid composition, as well as antioxidative potential) was given. Nettle seed oil was analyzed for its oxidative stability by means of a non-isothermal and isothermal regime of differential scanning calorimetry (DSC), the kinetic parameters of oxidation were determined, as well as induction time (resistance to oxidation). By substituting a portion of the wheat flour with ground nettle seeds and applying an aqueous extract of nettle seeds to knead the dough, food products were formed, and the impact of the addition of seeds to the macronutrient content, as well as that of mineral matter and polyphenolic compounds and their antioxidative potential, was studied. A special segment is the analysis of the change in the polyphenol content and its antioxidative potential during the thermal processing of the product. The technological parameters (the volume and „expansion“) and sensory attributes (appearance, color, consistency/texture and aroma) of the product were set, and a comparison was made with a product obtained solely from wheat flour. Considering that the oxidative stability of the obtained food products to the greatest extent depends on the oil of the product, the DSC method was used to analyze their stability. The results showed that nettle seeds are a suitable raw material for products with improved functional, nutritional, and sensory attributes. The substitution of wheat flour with ground nettle seeds led to a significant increase in the content of active components (such as polyphenolic compounds) and a significantly improved antioxidative potential of the product, indicating the good potential of this raw plant material for functional food products. An increase in the content of proteins, lipids, fiber, ash, and all essential minerals is evident, whereby calcium is the most prevalent among the macroelements, and iron among the microelements. The indicators of sensory attributes (appearance, texture, smell, and taste) of the product point out that the substitution of wheat flour with ground seeds in the product results in a final product of improved quality. The DSC analysis determined greater thermo-oxidative stability of the product with added nettle seeds. The results indicate that the product containing nettle seeds can, based on its characteristics, contribute to the expansion of the range of functional products

on the market. Thermal processing led to significant changes in the content of free and bound polyphenolic compounds and to various impacts on antioxidative potential, depending on the form of the polyphenol (free or bound), the origin of the polyphenol (from wheat, extract or nettle seeds) and the method used to study the antioxidative potential (DPPH or reducing power). Nettle seed oil belongs to a group of edible oils of the linoleic type, it is of high nutritional quality (linoleic fatty acid content is 86.05%) and is a highly unsaturated oil (iodine value is 117.54 mg J₂/g of oil). In terms of its antioxidative potential, the hydrophilic fraction of oil indicates greater potential compared to lipophilic fraction and unfractionated oil. The DSC analysis shows that nettle seed oil has a pronounced thermo-oxidative stability, and the high concentration of polyunsaturated fatty acids presents it as an alternative source of raw materials for the food, cosmetics and other industries.

Scientific field: Technological engineering

Scientific discipline: Food technology and biotechnology

Key Words: Nettle seeds, oil, polyphenolic compounds, antioxidant potential, DSC, oxidative stability, functional products, sensory properties, nutritional properties

UDK: 664.143/.149 : 582.635.5 + 615.322 : 547.565 (043.3)

CERIF classification: T430 Food and Beverage Technology

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

IZRAZI ZAHVALNOSTI

Duboku zahvalnost upućujem svom mentoru, prof. dr Nadi Nikolić, na pomoći i prenesenom znanju tokom izrade ove disertacije. Poštovani mentore, prihvatite moju iskrenu zahvalnost za vaše vreme, podršku i strpljenje. Bili ste sastavni deo moje dosadašnje karijere i cenim sve što ste me naučili.

Posebno sam zahvalna svim članovima komisije, prof. dr Ivani Karabegović, prof. dr Mirjani Pešić, dr Oliveri Šimurini i dr Saši Saviću, na pažljivom čitanju disertacije i korisnim i konstruktivnim savetima. Vaši saveti i sugestije su moju disertaciju učinili mnogo bogatijom i nešto na šta mogu da se ponosim. Njihov značaj za nastanak ove disertacije je dragocen.

Na ukazanoj pomoći pri realizaciji eksperimentalnih istraživanja, veliku zahvalnost dugujem:

mr Aniti Najdenkoskoj, magistru kvaliteta i bezbednosti hrane i specijalisti sanitarne hemije sa Instituta za javno zdravlje Republike Severne Makedonije,
prof. dr Ivanu Ristiću sa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,
prof. dr Mirjani Pešić sa Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu,
prof. dr Suzani Erić sa Rudarsko-geološkog fakulteta u Beogradu,
prof. dr Gordani Stojanović sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu,
prof. dr Vladimiru Ranđeloviću sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu,
prof. dr Suzani Cakić sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu,
prof. dr Ljubiši Nikolić sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu,
prof. dr Bojani Danilović sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu,
dr Saši Saviću, docentu Tehnološkog fakulteta u Leskovcu,
dr Sanji Petrović, docentu Tehnološkog fakulteta u Leskovcu.

Radujem se ponovnom radu sa vama u budućnosti, jer će naša istraživačka interesovanja nesumnjivo pozvati na buduću saradnju.

Deo doktorske disertacije koji se odnosi na određivanje senzorskih i teksturalnih karakteristika i boje proizvoda, aktivno je učestvovala i komentorisala dr Olivera Šimurina, viši naučni saradnik Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Ovim putem izražavam duboku zahvalnost dr Oliveri Šimurini.

Zahvaljujem prijateljima, kolegama i koleginicama na podršci i rečima ohrabrenja. Posebnu zahvalnost želim da izrazim koleginicama Jeleni Stanojević i Ani Tačić Dinić, koje su uz mene od samog početka mog „boravka“ na Tehnološkom fakultetu.

Svojim sestrama, Dragani, Milici i Jorgovanki, duboko se zahvaljujem na безусловnoj podršci, ljubavi i što su verovala u mene i moje ambicije.

Na kraju, najdublju zahvalnost dugujem svojim roditeljima. Ova diploma je rezultat napora koji ste uložili da me odgajate. Hvala vam što ste me učinili onim što jesam. Vama dvoma dugujem svoj život i sav uspeh, uključujući i ovaj doktorat. Bez vaše podrške, saveta i ljubavi, danas ne bih stajala među doktorima nauka. Hvala na svemu, mama i tata.

Doktorska disertacija je realizovana na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu Univerziteta u Nišu. Urađena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Program za finansiranje naučnog rada, ev. br. 451-03-47/2023-01/200133.

LISTA VAŽNIJIH SKRAĆENICA I SIMBOLA

Simboli

A	pred-eksponencijalni faktor
E_a	energija aktivacije
k	konstanta brzine reakcije
$T_{on,i}$	temperatura početka procesa oksidacije (<i>onset temperature</i>)
$T_{p,i}$	temperatura maksimuma (vrha) pika (<i>maximum peak temperature</i>)
R	univerzalna gasna konstanta
X_i	srednja vrednost ocene senzorskog svojstva od strane panela

Statistički simboli

SD	standardna devijacija
$R(r)$	koeficijent korelacije uzorka
R^2	koeficijent determinacije
p	nivo statističke značajnosti

Grčka slova

α	stepen konverzije
β	brzina zagrevanja
λ	talasna dužina

Skraćenice

ANOVA	analiza varijanse
BHA	terc-butyl-4-hidroksianizol
DSC	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
DPPH	1,1-difenil-2-5-pikril-hidrazil
EC ₅₀	efektivna koncentracija
FRAP	sposobnost redukcije jona Fe ³⁺ u Fe ²⁺
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom
FZ	faktor značajnosti
GC/MS	gasno-masena hromatografija

GAE	ekvivalent galne kiseline
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
HF	hidrofilna frakcija
ICP-OES	induktivno spregnuta plazma - optička emisija spektrometrija
KAS	Kissinger-Akahira-Sunose
LF	lipofilna frakcija
MPR	proizvodi Maillardove reakcije
PSK	proizvod obogaćen semenom koprive
PEK	proizvod obogaćen ekstraktom od semena koprive
PPB	proizvod od pšeničnog brašna (kontrolni proizvod)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin
UV/Vis	ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1. Taksonomija, svojstva i upotreba koprive (<i>Urtica dioica</i> L.)	5
2.1.1. Taksonomija i morfologija biljke.....	5
2.1.2. Tradicionalna i savremena upotreba koprive	6
2.1.3. Hemijski sastav koprive	8
2.2. Lipidi	10
2.2.1. Osnovna svojstva lipida	10
2.2.2. Lipidi semena.....	12
2.2.3. Kvarenje lipida.....	13
2.2.3.1. Oksidacija lipida.....	14
2.2.4. Oksidativna stabilnost lipida.....	16
2.2.4.1. Metode određivanja oksidativne stabilnosti lipida.....	16
2.2.4.1.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) ulja - osnovna razmatranja.....	17
2.3. Slobodni radikali i antioksidansi	24
2.3.1. Definicija slobodnih radikala i njihovo formiranje.....	24
2.3.2. Antioksidansi	26
2.3.3. Mehanizam delovanja antioksidanasa.....	29
2.4. Polifenolna jedinjenja	30
2.4.1. Osnovna svojstva polifenolnih jedinjenja i njihova klasifikacija	30
2.4.2. Polifenolna jedinjenja koprive	35
2.4.3. Biosinteza polifenolnih jedinjenja	36
2.4.4. Lokalizacija polifenolnih jedinjenja u biljkama.....	37
2.4.5. Ekstrakcija rastvorljivih (slobodnih i konjugovanih) i nerastvorljivih-vezanih polifenolnih jedinjenja	39
2.4.6. Određivanje antioksidativnog potencijala polifenolnih ekstrakata.....	41
2.4.6.1. Princip određivanja kapaciteta neutralisanja DPPH radikala.....	42
2.4.6.2. Redukciona snaga.....	43
2.4.6.3. Sposobnost redukcije jona gvožđa - FRAP metoda.....	43
2.5. Pojam funkcionalne hrane	44
2.5.1. Polifenolna jedinjenja kao funkcionalni agensi u prehrambenoj industriji.....	44
2.5.1.1. Uticaj polifenolnih jedinjenja na senzorna svojstva hrane.....	46
2.5.1.2. Uticaj termičke obrade na polifenolna jedinjenja	46

3. EKSPERIMENTALNI DEO	49
3.1. Materijal.....	49
3.1.1. Pšenično brašno i brašno semena koprive (<i>Urtica Dioica</i> L.)	49
3.1.2. Hemikalije i reagensi	49
3.2. Metode	49
3.2.1. Određivanje sadržaja vlage	49
3.2.2. Određivanje sadržaja pepela	50
3.2.3. Određivanje sastava pepela	50
3.2.3.1. Induktivno spregnuta plazma - optička emisiona spektrometrija (ICP-OES)..	50
3.2.3.2. Mikrotalasna digestija	51
3.2.3.3. Analiza uzoraka.....	51
3.2.4. Određivanje sadržaja sirovih vlakana (po Scharrer-Kirshner-u)	52
3.2.5. Određivanje sadržaja proteina.....	52
3.2.6. Određivanje sadržaja skroba i rastvorljivih šećera	53
3.2.7. Ekstrakcija lipida i određivanje sadržaja lipida	53
3.2.8. Određivanje sastava masnih kiselina lipida	54
3.2.8.1. Dobijanje metil-estara masnih kiselina	54
3.2.8.2. Gasnohromatografska analiza	54
3.2.9. Određivanje sastava acilglicerola HPLC metodom	55
3.2.10. Hemijska karakterizacija lipida.....	55
3.2.10.1. Kiselinski broj	55
3.2.10.2. Saponifikacioni broj	56
3.2.10.3. Jodni broj.....	56
3.2.10.4. Estarski broj.....	57
3.2.11. Određivanje termooksidativne stabilnosti ulja.....	57
3.2.11.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	57
3.2.12. Dobijanje hidrofilne i lipofilne frakcije ulja	59
3.2.13. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja	59
3.2.13.1. Ekstrakcija slobodnih polifenolnih jedinjenja.....	59
3.2.13.2. Ekstrakcija vezanih polifenolnih jedinjenja	59
3.2.13.3. Određivanje sadržaja suvog ostatka ekstrakta.....	60
3.2.13.4. Određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja.....	60
3.2.14. Određivanje antioksidativnog potencijala.....	60
3.2.14.1. Određivanje kapaciteta neutralisanja DPPH radikala	60

3.2.14.2. Određivanje redukcione snage	61
3.2.14.3. Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP metoda)	62
3.2.15. Određivanje antimikrobne aktivnosti polifenolnih jedinjenja	62
3.2.15.1. Disk-difuziona metoda	62
3.2.16. Određivanje sastava polifenolnih jedinjenja	63
3.2.17. Određivanje morfoloških karakteristika semena koprive i proizvoda	63
3.2.17.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM analiza)	63
3.2.18. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR).....	64
3.2.19. Priprema proizvoda od pšeničnog brašna, mešavine pšeničnog brašna i brašna semena koprive i mešavine pšeničnog brašna i ekstrakta semena koprive.....	64
3.2.20. Određivanje tehnološkog kvaliteta proizvoda i gubitka mase tokom termičke obrade.....	64
3.2.20.1. Gubitak mase tokom termičke obrade.....	64
3.2.20.2. Određivanje odnosa d/h.....	65
3.2.20.3. Određivanje zapremine	65
3.2.20.4. Senzorna analiza proizvoda.....	65
3.2.20.4.1. Određivanje boje proizvoda.....	65
3.2.20.4.2. Određivanje senzorskih karakteristika proizvoda metodom bodovanja..	65
3.2.20.4.3. Određivanje teksturnih karakteristika proizvoda.....	67
3.2.20.5. Energetska vrednost	68
3.2.21. Statistička obrada podataka.....	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA	70
4.1. Karakterizacija semena koprive.....	70
4.1.1. Hemijski sastav semena koprive.....	70
4.1.2. Mineralni sastav semena koprive	73
4.1.3. Morfološke karakteristike semena koprive.....	75
4.1.4. Infracrvena spektroskopija Fourier-ove transformacije (FTIR)	76
4.2. Hemijska karakterizacija ulja semena koprive	77
4.2.1. Sastav masnih kiselina ulja semena koprive	77
4.2.2. Sastav acilglicerola ulja semena koprive	79
4.2.3. Hemijski brojevi.....	80
4.2.4. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativni potencijal hidrofilne, lipofilne frakcije i nefrakcionisanog ulja semena koprive.....	82
4.2.5. Oksidativna stabilnost ulja semena koprive.....	84

4.2.5.1. Ne-izotermni režim DSC analize ulja semena koprive	84
4.2.5.2. Izotermni režim DSC analize ulja semena koprive	87
4.3. Karakterizacija polifenolnih jedinjenja semena koprive	90
4.3.1. Sadržaj slobodnih i vezanih polifenola semena koprive	90
4.3.2. Antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenola semena koprive	91
4.3.3. Uticaj rastvarača na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenola.....	92
4.3.3.1. Uticaj rastvarača na sadržaj polifenola.....	92
4.3.3.2. Uticaj rastvarača na antioksidativni potencijal polifenola	94
4.3.4. Korelacija između antioksidativnog potencijala i ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja.....	96
4.3.5. Antimikrobna aktivnost slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja.....	99
4.3.6. Sastav slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja.....	100
4.3.7. Karakterizacija polifenolnih jedinjenja ekstrahovanih vodom iz samlevenog i nesamlevenog semena koprive.....	102
4.3.7.1. Sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja.....	102
4.3.7.2. Sastav slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja vodenih ekstrakata.....	103
4.4. Karakterizacija proizvoda obogaćenih semenom koprive i ekstraktom od semena koprive.	106
4.4.1. Hemijski sastav proizvoda	106
4.4.2. Mineralni sastav finalnih proizvoda.....	107
4.4.3. Morfološke karakteristike finalnih proizvoda.....	109
4.4.4. Termooksidativna stabilnost ulja proizvoda	111
4.4.4.1. DSC analiza ulja proizvoda obogaćenih semenom koprive i ekstraktom od semena koprive i ulja kontrolnog proizvoda	111
4.4.5. Uticaj dodatka semena i ekstrakta od semena koprive na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja proizvoda na bazi pšeničnog brašna	112
4.4.6. Uticaj termičke obrade na sadržaj i antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenola proizvoda obogaćenih semenom i ekstraktom semena koprive.....	114
4.4.6.1. Sadržaj slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja proizvoda tokom termičke obrade.....	114
4.4.6.2. Antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja proizvoda tokom termičke obrade.....	116
4.4.7. Sastav polifenolnih jedinjenja u proizvodima sa semenom koprive i ekstraktom semena koprive	119

4.4.8. Tehnološka svojstva dobijenih prehrambenih proizvoda	121
4.4.8.1. Senzorna analiza proizvoda.....	122
4.4.8.1.1. Boja proizvoda sa semenom koprive i ekstraktom semena koprive.....	122
4.4.8.1.2. Senzorska ocena proizvoda određena metodom bodovanja	123
4.4.8.1.3. Teksturne karakteristike proizvoda sa semenom koprive, ekstraktom semena koprive i kontrolnog proizvoda	124
5. ZAKLJUČAK.....	127
6. PRILOZI.....	131
7. LITERATURA	140

1. UVOD

Ubrzano iscrpljivanje biljnih resursa usled rasta populacije iziskuje veću posvećenost istraživanju novih biljnih resursa koji imaju nutritivne i zdravstvene prednosti kako bi se zadovoljile rastuće potrebe ljudskog društva. Lekovite biljke su najbogatiji bio-resurs lekova tradicionalne i savremene medicine, dodataka ishrani i nutraceutika, zahvaljujući širokom spektru aktivnih jedinjenja (alkaloidi, terpenoidi, polifenolna jedinjenja i dr.) koja doprinose njihovim zdravstvenim prednostima (Ncube i sar., 2008; Wang i Weller, 2006). Tokom proteklih deset godina, zainteresovanost istraživača i proizvođača hrane postala je sve veća za polifenolna jedinjenja. Glavni razlog njihovog interesovanja je prepoznavanje antioksidativnih svojstava polifenola, njihova raspoloživost u našoj ishrani i njihova uloga u prevenciji raznih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom, kao što su kancer, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Dai i Mumper, 2010). Interesovanje za ove prirodne komponente nije samo zbog njihove biološke vrednosti, već i zbog njihovog ekonomskog značaja, jer se većina njih može ekstrahovati iz nusproizvoda hrane i nedovoljno eksploatisanih biljnih vrsta (Lourenço i sar., 2019).

U poslednje vreme posebna pažnja posvećuje se izolaciji i karakterizaciji polifenolnih jedinjenja iz biljnih ulja. Polifenolna jedinjenja značajno utiču na oksidativnu stabilnost ulja koja predstavlja važan parametar u ocenjivanju kvaliteta ulja, jer se odnosi na vreme u kome uzorak ne podleže oksidaciji (Blekas i sar., 2002; Franco i sar., 2014; Mansouri i sar., 2016; Redondo-Cuevas i sar., 2018). Oksidacija ulja izaziva proizvodnju nepoželjnih hemijskih jedinjenja, kao što su aldehidi, ketoni i organske kiseline, što dovodi do smanjenja roka trajanja, senzorne i nutritivne vrednosti hrane koja sadrži ulja (Ahmed i sar., 2016; Fereidoon i Ying, 2010). U ovom slučaju, antioksidativna polifenolna jedinjenja igraju važnu ulogu u održavanju ukupnog kvaliteta hrane. Znanje o njihovom sadržaju i antioksidativnom potencijalu moglo bi koristiti u cilju prevencije kvarenja i produženja održivosti hrane (Decker, 1998). Međutim, oksidativna stabilnost hrane ne zavisi samo od antioksidanasa, već i od sastava, koncentracije reakcionih supstrata i prisutnih prooksidanasa. Na oksidativnu stabilnost ulja će u velikoj meri uticati i njihov sastav masnih kiselina i manje komponente kao što su tokoferoli i tokotrienoli (Musakhanian i sar., 2022). Iz navedenih činjenica, može se zaključiti da su studije oksidacije i oksidativne stabilnosti hrane i komponenti hrane vrlo značajne zbog ekonomskih, nutritivnih i zdravstvenih razloga.

Upotreba lekovitog bilja i njihovih ekstrakata je poznati trend u prehrambenoj industriji koji je stvorio širok potencijal za razvoj novih proizvoda različite namene. Zahvaljujući

prisustvu bioaktivnih jedinjenja, lekovite biljke i njihovi ekstrakti su široko zastupljeni u proizvodnji hrane sa zdravstvenim prednostima. Ovakva hrana se naziva funkcionalnom, a njena osnovna uloga je da organizmu obezbedi ne samo neophodnu energiju i hranljive materije, već i da utiče na sprečavanje bolesti, kao i na poboljšanje određenih stanja organizma. Jedna od strategija za dobijanje funkcionalne hrane je „povećanje“ koncentracije bioaktivnih jedinjenja koja se prirodno nalaze u hrani, kakva su i polifenolna jedinjenja (Septoe i Town, 2011). Kvalitet biljnih ekstrakata, pored kvaliteta sirovine, zavisi i od tehnologije primenjene za njihovo dobijanje ili ekstrakciju (Lourenço i sar., 2019). Poznato je da prinos ekstrakcije zavisi od vrste rastvarača, vremena i temperature ekstrakcije, odnosa uzorak-rastvarač, kao i od hemijskog sastava i fizičkih karakteristika uzoraka. Rastvorljivost polifenolnih jedinjenja zavisi od hemijske prirode biljnog uzorka, ali i od polarnosti korišćenih rastvarača. Efikasna ekstrakcija i sveobuhvatne i tačne analize antioksidanasa iz biljaka presudni su za istraživanje potencijalnih izvora antioksidanasa i njihovu primenu u funkcionalnoj hrani, ali i u farmaceutskim proizvodima i aditivima za hranu.

Termička obrada hrane je jedan od uobičajenih koraka u procesu dobijanja funkcionalne hrane/proizvoda, i može dovesti do značajnih promena u teksturi i hemijskom sastavu hrane (Mandge i sar., 2014; Medoua i Oldewage-Theron, 2014; Osman i sar., 2010). Polifenolna jedinjenja nisu potpuno stabilna tokom termičke obrade (Talcott i sar., 2003). Temperatura kao fizički faktor, može dovesti do degradacije fenolnih antioksidanasa (fenolne kiseline i antocijanini), ali i do različitih njihovih transformacija. Stoga, termička obrada hrane ili njenih sastojaka je važan faktor koji utiče na funkcionalna svojstva gotovog proizvoda, među kojima je i antioksidativno svojstvo (Koponen i sar., 2008).

Zbog svog nutritivnog i funkcionalnog bogatstva, ali i zbog njene vrednosti u pogledu iskorišćenja svih njenih delova (stabljika, lišće, koren i seme), kopriva je predmet sve većeg naučnog interesovanja i razvoja novih proizvoda. Većina indikacija iz tradicionalne medicine je potvrđena, a otkrivena su i nova svojstva koprive. Mnoge studije su potvrdile prisustvo brojnih aktivnih jedinjenja (posebno u lišću koprive), kao što su polifenolna jedinjenja, karotenoidi, esencijalne masne kiseline, vitamini, minerali, fitosteroli i proteini, ukazujući na njenu najperspektivniju primenu u sektoru hrane, lekova i kozmetike (Di Virgilio i sar., 2015; Đurović i sar., 2020; Medicine i Voiume, 2007; Namazi i sar., 2012; Vogl i Hartl, 2003; Warren, 2006).

Razvoj funkcionalne hrane na bazi koprive, ekstrakcija jedinjenja za potencijalnu terapijsku upotrebu i važnost antioksidativne zaštite od štete prouzrokovane oksidativnim stresom u žiži su interesovanja savremenih naučnih istraživanja. Seme koprive kao nedovoljno

istraženi deo ove tradicionalne, široko korišćene lekovite biljke, zavređuje veliku pažnju naučne javnosti, ali i šire zdravstvene zajednice. S tim u vezi, procena vrednosti semena koprive kao potencijalne funkcionalne hrane i prehrambene sirovine jedan je od bitnijih segmenata ovog naučnog istraživanja. Podjednaka važnost pripisuje se razvoju i karakterizaciji potencijalnog funkcionalnog proizvoda na bazi pšeničnog brašna, koji će biti obogaćen biološki aktivnim komponentama iz semena koprive koje doprinose značajnom povećanju antioksidativnog potencijala.

Osnovna hipoteza ovog naučno-istraživačkog rada je da će dobijeni proizvodi, pored boljih funkcionalnih svojstava (veći sadržaj aktivnih komponenti i bolji antioksidativni potencijal), imati i bolji nutritivni i tehnološki kvalitet u odnosu na proizvode dobijene samo od pšeničnog brašna. Očekuje se visoki nutritivni kvalitet ulja semena koprive, zadovoljavajuća oksidativna stabilnost i dobar antioksidativni potencijal ulja koji bi trebao da doprinese boljoj oksidativnoj stabilnosti proizvoda sa semenom koprive.

Polazeći od navedenog problema sa kojim se savremeno čovečanstvo decenijama suočava i navedenih činjenica o upotrebi lekovitih biljaka i njihovih ekstrakata za razvoj adekvatnog funkcionalnog proizvoda, ciljevi ovog naučnog istraživanja usmereni su ka:

- karakterizaciji semena koprive u pogledu određivanja sadržaja makronutrijenata, mineralnih materija, sadržaja slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja i određivanja njihove antioksidativne i antimikrobne aktivnosti;
- izolovanju ulja iz semena koprive i njegovoj hemijskoj karakterizaciji (saponifikacioni, jodni, kiselinski i estarski broj, sastav acilglicerola i masnih kiselina, sadržaj polifenolnih jedinjenja, antioksidativni potencijal, otpornost ulja na oksidaciju);
- formulaciji prehrambenog proizvoda na bazi pšeničnog brašna sa dodatkom semena koprive i ekstrakta semena koprive;
- karakterizaciji dobijenih proizvoda na osnovu vrednosti gubitka mase tokom pečenja, zapremine i „širenja“ proizvoda (određivanjem odnosa između visine i prečnika proizvoda, koji karakteriše njegov oblik);
- karakterizaciji dobijenih proizvoda u pogledu određivanja sadržaja makronutrijenata, mineralnih materija, sadržaja slobodnih i vezanih polifenola, određivanja antioksidativnog potencijala i senzorne analize (izgled, boja, konzistencija/tekstura i aroma);

- ispitivanju uticaja termičke obrade na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja proizvoda sa semenom koprive, ekstraktom semena koprive i kontrolnog proizvoda;
- analizi uticaja dodatka semena koprive i ekstrakta semena koprive na sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativni potencijal dobijenih proizvoda;
- proceni mogućnosti korišćenja semena koprive u prehrambenoj industriji u cilju dobijanja prehrambenih proizvoda sa većim sadržajem biološki aktivnih komponenti i sa boljim funkcionalnim, nutritivnim i senzornim svojstvima u odnosu na proizvod dobijen samo od pšeničnog brašna (kontrolni proizvod).

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Taksonomija, svojstva i upotreba koprive (*Urtica dioica* L.)

2.1.1. Taksonomija i morfologija biljke

Kopriva (lat. *Urtica*) je višegodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Urticaceae i najvećoj i najraznovrsnijoj grupi Angiospermae (cvetnih biljaka). Poznata je kao kosmopolitska biljka koja se može naći svuda širom sveta (Evropa, Severna Amerika, Afrika i u delovima Azije), na staništima sa dosta vlage (pored reka ili potoka, na njivama, livadama, šumama) u umerenim i tropskim oblastima (Yener i sar., 2009). Reč „kopriva“ potiče od anglosaksonske reči „noedl“ što znači „igla“, dok je njeno latinsko ime „urtica“ izvedeno od reči „uro“ ili „urere“, što znači „pržiti/žariti/goreti“ (Dayu, 2012; Rajput, 2018). Reč „*dioica*“ potiče od grčkih reči „*dis*“ (dis) što znači „dva puta“ i „*oikía*“ (oikía) što znači „stanovanje“. Ovo nam pomaže da razumemo konačno značenje njenog latinskog imena koje glasi „dve kuće“ zbog muških i ženskih cvetova koji se nalaze na biljkama (Grauso i sar., 2020). Rod *Urtica* broji 46 vrsta cvetnih biljaka, a najistaknutiji članovi su *Urtica dioica* L. i mala kopriva *Urtica urens* L. Biljka je opšte poznata pod nazivom „Nettle“, „Common nettle“ ili „Stinging nettle“. Na slici 1 prikazana je taksonomija biljke.

TAKSONOMIJA	
CARSTVO	<i>Plantae</i>
FAMILIJA	<i>Magnoliophyta</i>
KLASA	<i>Magnoliopsida</i>
RED	<i>Rosales</i>
PORODICA	<i>Urticaceae</i>
ROD	<i>Urtica</i>
VRSTA	<i>Urtica dioica</i> L.

Slika 1. Taksonomija koprive

Koren biljke je žiličast i razgranat sa puno dugih rizoma. Stablo je uspravno, četvrtasto i može dostići visinu od 2 m. Kod mladih biljaka je zelene boje, a kod starijih ljubičaste/crvenkaste. Listovi su izduženi, hrapavi, jajasti i sa nazubljenim ivicama, tamno zelene boje i imaju naspraman raspored. Smešteni su na kratkim peteljkaama koje se nalaze na stabljici i obrasli žarnim i sitnim dlačicama koje u dodiru sa kožom izazivaju peckanje i

privremeni osip zbog kontakta sa tečnošću koja u sebi sadrži mravlju kiselinu, histamin, acetilholin i serotonin (Kregiel i sar., 2018). Cvetovi su neupadljivi, sitni i grupisani u izdužene cvasti koje se formiraju u pazušcima lista na vrhu stabla. Ženski cvetovi su zelenkaste boje, dok su muški cvetovi žućkasti. Seme je vrlo sitno ali brojno, ima veliki potencijal klijanja i preživljavanja nepovoljnih uslova. Biljka ga stvara i do 20 000 u sezoni, a zadržava sposobnost klijanja i nakon 600 godina. Smeđe do tamne je boje, a masa 1000 semenki je 0,14-0,15 g, što znači da u jednom gramu ima 7000–7500 zrna (Knežević, 2006).

Kopriva preferira rast na rastresitom tlu sa organskim materijama bogatim azotom i visokim nivoom fosfata. Kopriva je izrazito nitrofilna vrsta biljke i utvrđena je korelacija između sadržaja azota, prinosa biomase i sadržaja proteina (Szewczuk i Mazur, 2004). U pogledu pH vrednosti, rast koprive se postiže u opsegu od 5,6 do 7,6, pri čemu je najizraženiji pri neutralnoj vrednosti pH. Bogato plodno tlo doprinosi akumuliranju mnogo mineralnih soli u koprivi (Di Virgilio i sar., 2015). Duga vegetacijska doba dovode do stalnog rasta, dok oštre zime uzrokuju uništavanje koprive (Dayu, 2012). Vreme berbe koprive varira u zavisnosti od načina njene upotrebe. Ako se biljka koristi sveža, preporučeno vreme berbe je proleće ili rano leto. Listovi u ranoj sezoni mogu se koristiti kao sveže povrće ili se mogu osušiti i koristiti za dobijanje čaja. Stariji listovi nisu idealni za berbu, ali su još uvek prihvatljivi za dobijanje čaja ili tinkture. U medicinske svrhe lišće treba brati pre cvetanja koje se odvija u periodu od jula do septembra (Dayu, 2012).

2.1.2. Tradicionalna i savremena upotreba koprive

Hranljiva vrednost i lekovita svojstva koprive povezana su sa proizvodima koji se mogu dobiti iz nje i primeniti u oblasti medicine, kozmetike i hrane. Visoka primenljivost koprive se pored njenog bogatog i netoksičnog hemijskog sastava može objasniti i relativno niskim troškovima i širokom dostupnošću.

Kopriva ima dugu istoriju upotrebe u domaćinstvu kao „kućni lek“ i dodatak ishrani (Ji i sar., 2009). Sveža kopriva se od davnina koristila za mlaćenje artritičnih ili paralitičkih udova izazivajući toplinu u zglobovima i ekstremitetima u tretmanu poznatom kao „urtikacija“. Pomenuta praksa urtikacije postala je standard u narodnoj medicini kao lek za artritis, reumu i mišićnu paralizu i možda je najstarija medicinska upotreba koprive (Dayu, 2012; Rajput, 2018). Još u prvom veku, grčki lekari Pedanius Dioscorides i Galen izvestili su da list koprive ima diuretička i laksativna svojstva i bila je korisna za lečenje astme, pleuritisa i bolesti slezine (Ji i sar., 2009). Pored toga, ova biljka se koristila za lečenje kožnih tegoba, gihta, išijasa, neuralgije, hemoroida, problema sa kosom i dr. (Ahmed i Parsuraman, 2014). Iz koprive se

moгу izdvojiti vrlo elastična i čvrsta celulozna vlakna koja su se ranije koristila za užad i ribarske mreže, za proizvodnju tkanine, papira i prirodnih boja (Di Virgilio i sar., 2015; Vogl i Hartl, 2003). Sa pojavom drugih vlaknastih kultura kao što je lan, pamuk i konoplje, njena upotreba se drastično smanjila (Vogl i Hartl, 2003). Čaj napravljen od listova koprive korišćen je kao tonik za pročišćivanje krvi. Osim čaja, kopriva se koristila za dobijanje mnogobrojnih ukusnih jela kao što su čorbe, pite, salate i slično (Grauso i sar., 2020). Zbog visokog sadržaja hranljivih materija, kopriva se takođe koristila u narodnoj veterini (Safamehr i sar., 2012; Viegi i sar., 2003).

Danas se ekstrakti nadzemnih delova biljke koriste u kozmetičkoj industriji za dobijanje proizvoda kao što su sapuni, šamponi, losioni za kožu i dr., jer poseduju adstrigentne, kondicionirajuće, umirujuće i tonične efekte za kosu i kožu (Dayu, 2012; Vogl i Hartl, 2003). Postoje studije da se u nekim evropskim zemljama, na primer u Srbiji i Poljskoj, listovi koprive (do 1%) koriste u proizvodnji hleba koji se prodaje kao komercijalni proizvod (Đurović i sar., 2017). U poređenju sa ječmenim i pšeničnim brašnom, brašno od koprive ima mnogo veći sadržaj proteina, sirovih vlakana, masti, pepela, kalcijuma i gvožđa i ima nizak glikemijski indeks, ali i mnogo veći nivo tanina i ukupnih polifenola (Adhikari i sar., 2016). Međutim, iako je visokog tržišnog potencijala, kopriva ostaje nedovoljno iskorišćena u prehrambenom sektoru uglavnom zbog nedostataka upravljanja usevima, sezonskih uslova i upravljanja nakon berbe (Chakravartula i sar., 2021). U Evropskoj uniji, iako je moguće plasirati proizvode koji sadrže list koprive kao prehrambene proizvode, mnogi terapijski preparati od lista i korena koprive regulisani su kao tradicionalni biljni lekovi, što zahteva registraciju i odobrenje za stavljanje u promet. Upotreba koprive donekle varira u zavisnosti od delova biljke. Preparati nadzemnih delova (tečni ekstrakti, tinkture, sveži sokovi, koncentrovani biljni čajevi ili infuzije) mogu se prodavati pod određenom oznakom kao što je „Tradicionalni biljni lek za ispiranje urinarnog trakta kao pomoćno sredstvo pri manjim urinarnim tegobama“ ili „Tradicionalni biljni lek za ublažavanje bolova u zglobovima“ i dr. U SAD-u, delovi biljaka ili preparati koprive nisu generalno priznati kao bezbedni za upotrebu u prehrambenim proizvodima, ali su dozvoljeni kao dodatak ishrani. U Kanadi je kopriva regulisana kao aktivni sastojak licenciranih prirodnih zdravstvenih proizvoda, za šta je potrebno odobrenje za stavljanje u promet.

Pored toga što je nutritivno bogata i medicinski pogodna za lečenje mnogih bolesti, kopriva pokazuje društveno-ekonomski i ekološki značaj. Ima pozitivnu ulogu u održavanju plodnosti zemljišta i „nutrient cycle“, ukazujući na značajne komercijalne implikacije (Pant i Sundriyal, 2016). Klonske sorte koje datiraju s početka 20. veka i dalje se održavaju u evropskim istraživačkim institucijama (Vogl i Hartl, 2003). Tek je od početka 20. veka njena

medicinska važnost u velikoj meri proučavana i dramatično povećana, počevši od utvrđivanja hemijske strukture glavnih hemijskih aktivnih jedinjenja i njihovih farmakoloških svojstava. Treba naglasiti da je većina indikacija iz tradicionalne medicine potvrđena, a i otkrivena su nova svojstva. Zbog svoje tradicionalne upotrebe kao hrana, vlakna i lek, kao i zbog njene vrednosti u pogledu iskorišćenja svih njenih delova (stabljika, lišće, koren i seme), ova vrsta je i danas predmet sve većeg naučnog interesovanja i razvoja proizvoda. Postoji značajan broj objavljenih radova o upotrebi koprive i njenim proizvodima (Di Virgilio i sar., 2015; Đurović i sar., 2020; Namazi i sar., 2012; Vogl i Hartl, 2003).

2.1.3. Hemijski sastav koprive

Na hemijski sastav koprive utiču mnogobrojni faktori poput sorte, genotipa, klime, tla, vegetacije, vremena berbe, skladištenja, prerade i tretmana. Sveobuhvatna analiza pokazala je da se hemijski sastav koprive razlikuje u zavisnosti od delova biljke, a da je odlikuje visoka hranljiva vrednost i prisustvo brojnih biološki aktivnih supstanci (Biesiada i sar., 2010; Oñate i Munné-Bosch, 2009; Paulauskienė i sar., 2021; Shonte i sar., 2020).

Kopriva je bogat izvor proteina sa sadržajem od 4 do 6% u svežim i od 20 do 30% u suvim biljkama (Pradhan i sar., 2015; Rafajlovska i sar., 2013; Shonte i sar., 2020; Sekeroglu i sar., 2006). Proteini koprive sadrže značajne količine esencijalnih aminokiselina uključujući valin, fenilalanin, lizin, izoleucin i leucin, kao i histidin i metionin koji su prisutni u nižim koncentracijama (Rutto i sar., 2013; Yunuskhodzhaeva i sar., 2014). Prisustvo histidina ukazuje da su u koprivi prisutne aminokiseline u vezanom obliku (Lapinskaya i sar., 2008). Asparagin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, alanin i treonin su identifikovane kao najdominantnije aminokiseline u koprivi (Lapinskaya i sar., 2008).

Kopriva sadrži od 1 do 1,2% lipida u svežim i od 4,8 do 8,1% u suvim biljkama. Niži sadržaj od pomenutog zabeležen je u suvom odraslom lišću (2,92%) (Dayu, 2012; Pradhan i sar., 2015). Od masnih kiselina, posebno su zastupljene palmitinska, linolna i α -linolenska kiselina (Guil-Guerrero i sar., 2003; Đurović i sar., 2017). α -linolenska kiselina je najzastupljenija masna kiselina u listovima (posebno u zrelim listovima), dok je linolna kiselina dominantna u korenu i stabljikama. Primećeno je da je palmitinska kiselina preovlađujuća u semenu (Guil-Guerrero i sar., 2003).

Sadržaj ugljenih hidrata kreće se od 2,2 do 16,5% u svežim biljkama (Rutto i sar., 2013; Shonte i sar., 2020), a čak i do 47% u suvoj materiji koprive (Pradhan i sar., 2015).

Sadržaj mineralnih materija je 2,1% u svežoj (Rutto i sar., 2013) i oko 20% u suvoj materiji koprive (Chrubasik i sar., 2007; Pradhan i sar., 2015). Među najzastupljenijim

mineralima su gvožđe, cink, magnezijum, kalcijum, fosfor i kalijum. Utvrđeno je i prisustvo kobalta, nikla, molibdena i selen (Mihaljev i sar., 2014).

Koprivu takođe odlikuje i bogat vitaminski sastav: biljka sadrži vitamine rastvorljive u vodi, značajne količine vitamina C i vitamina B (B₁, B₂, B₃, B₆, B₉) i vitamine rastvorljive u mastima A, D, E, K, provitamin A (β-karoten) i vitamin E (α-tokoferol) (Said i sar., 2015). Sveže lišće u količini od 100 g sadrži 0,01 mg vitamina B₁ (tiamin), 0,23 mg vitamina B₂ (riboflavin), 0,62 g vitamina B₃ (niacin), 0,068 mg vitamina B₆, 238 mg vitamina C, 5 mg provitamina A i 14,4 mg vitamina E (Wetherilt, 1992).

Hlorofil, karotenoidi i organske kiseline takođe obiluju u koprivi (Biesiada i sar., 2010; Joshi i sar., 2014; Kregiel i sar., 2018; Kukrić i sar., 2012; Rafajlovska i sar., 2013; Rutto i sar., 2013). Sadržaj hlorofila se kreće od 0,08 do 0,3% u svežem lišću i od 0,6 do 1% u suvom lišću (Dayu, 2012). Hlorofil podstiče čišćenje i detoksikaciju, čisti probavni sistem i bori se protiv nadutosti i lošeg zadaha. Osim toga, hlorofil dovodi do regeneracije ćelija i aktivira zarastanje rana (Guil-Guerrero i sar., 2003; Orčić i sar., 2014). Karotenoidi su prekursori vitamina A i sličnih jedinjenja. β-karoten je jedan od najpoznatijih karotenoida koji je snažan antioksidans i faktor ishrane za rast. Prekursor je vitamina A koji je neophodan za dobar vid i ima glavnu ulogu u regulaciji ekspresije gena i diferencijacije tkiva (Bender, 2003). Pored β-karotena, u koprivi su prisutni i violaksantin, ksantofil, zeaksantin, luteoksantin i luteinski epoksid (Dayu, 2012; Guil-Guerrero i sar., 2003). Ukupna količina karotenoida u svežem lišću je 29,6 mg/100 g suve materije (Guil-Guerrero i sar., 2003). Zabeleženo je da su postojale razlike u sadržaju hlorofila i karotenoida u listovima različite starosti: koncentracija hlorofila u listovima raste prilikom njihovog rasta i smanjuje se tokom starenja biljaka (Kukrić i sar., 2012).

U koprivi je ustanovljeno i prisustvo različitih polifenolnih jedinjenja, sa kvercetinom, kempferolom i rutinom kao glavnim prisutnim flavonoidima. Najaktivniji flavonoid je kvercetin. Ima snažno antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo (Nair i sar., 2006), smanjuje incidencu tumora dojke (Verma i sar., 1988) i ima antitumorsko dejstvo protiv raka prostate (Nair i sar., 2004). Takođe je dokazano njegovo antiulcerogeno delovanje (Shin i sar., 2005). Antioksidativna aktivnost rutina je slična onoj kod kvercetina (Yang i sar., 2008). Pored toga, ima antiinflamatorna, antikancerogena svojstva i smanjuje citotoksičnost oksidovanog lošeg holesterola (Selloum i sar., 2003; Tian i sar., 2008). Prisustvo terpenoida kao glavne komponente eteričnog ulja, ali i tanina, sterola, izolektina takođe je dokazano u koprivi (Gül i sar., 2012; Guil-Guerrero i sar., 2003; Otes i Yalcin, 2012; Pinelli i sar., 2008).

2.2. Lipidi

2.2.1. Osnovna svojstva lipida

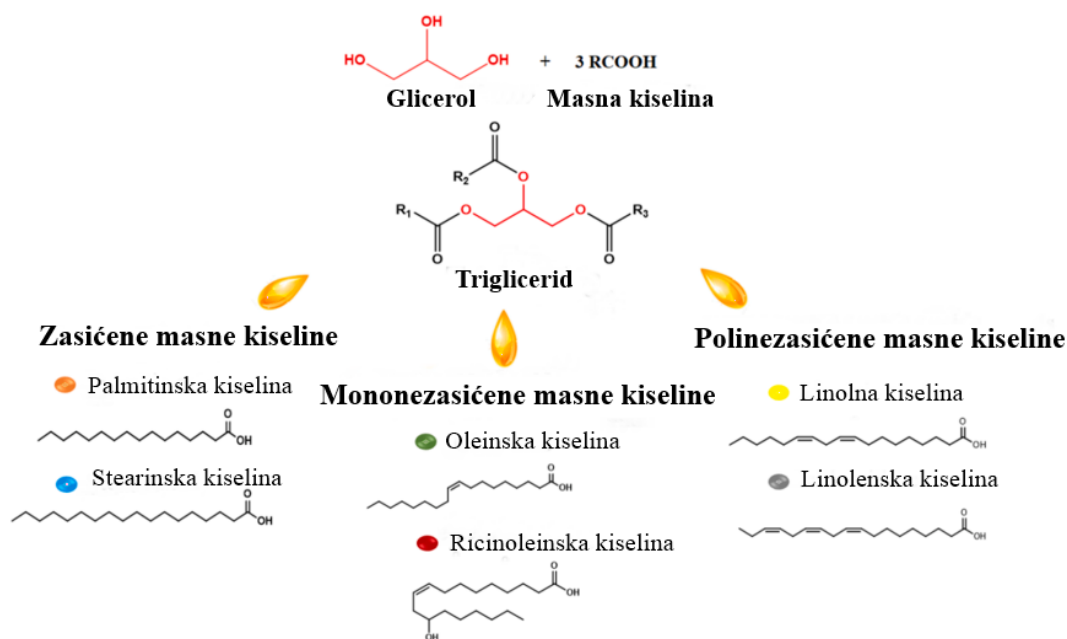
Lipidi su vrlo rasprostranjena grupa jedinjenja koju karakteriše relativna nerastvorljivost u vodi, a značajna rastvorljivost u organskim rastvaračima kao što su etar, hloroform, benzen i dr. Biološki su veoma značajna jedinjenja jer predstavljaju osnovnu komponentu bioloških membrana i utiču na njihovu propustljivost, učestvuju u predaji nervnih impulsa, stvaraju kontakte među ćelijama, čine energetske rezerve, štite organizam od mehaničkih povreda i formiraju termoizolacioni sloj. Lipidi obuhvataju širok spektar molekula raznovrsne hemijske strukture i biološkog porekla među kojima su masne kiseline, triacilgliceroli, voskovi, fosfolipidi, sfingolipidi, holesterol i drugi steroidi.

Masne kiseline su osnovni gradivni blokovi lipida. To su dugolančane organske kiseline sa 4–30 ugljenikovih atoma. Sadrže jednu COOH grupu i dug, nepolarni ugljovodonični „rep“ ili lanac koji većini lipida daje hidrofobnu, uljanu ili masnu prirodu. Poznato je preko 1000 masnih kiselina sa različitim dužinama lanca, položajima, konfiguracijama i tipovima nezasićenosti, kao i nizom dodatnih supstituenata duž alifatičnog lanca. Međutim, samo oko 20 masnih kiselina je široko rasprostranjeno u prirodi; od toga, palmitinska, oleinska i linolna kiselina čine ~80% ulja i masti. Lanac masne kiseline može biti zasićen (sadrži samo jednostruke veze) ili nezasićen, sa jednom (mononezasićene masne kiseline) ili više dvostrukih veza (polinezasićene masne kiseline). Zasićene masne kiseline su na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju, dok su nezasićene masne kiseline tečnosti na ovoj temperaturi. Čvrste masti čini spoj glicerola sa, uglavnom, zasićenom masnom kiselinom (kao što je palmitinska i stearinska), dok u sastav tečnih ulja ulaze uglavnom nezasićene masne kiseline (npr., oleinska). Slika 2 daje slikoviti prikaz strukture triacilglicerola i najznačajnijih predstavnika zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (Jain i sar., 2004; Moran i sar., 2012).

Od zasićenih masnih kiselina, palmitinska kiselina (16:0) je najzastupljenija i najrasprostranjenija masna kiselina, prisutna u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Od 20 do 30% se nalazi u lipidima životinjskog porekla, a 10 do 40% u lipidima semena. Stearinska kiselina (18:0) je takođe prisutna, obično u niskim koncentracijama, ali je u izobilju u kakao puteru (~34%) i nekim lipidima životinjskog porekla kao što su salo (5 do 24%) i goveđi loj (6 do 40%). Nekoliko tropskih biljnih vrsta (*Shorea*, *Garcinia*, *Allanblackia* i *Palakuium*) sadrži 50 do 60% stearinske kiseline. Arahidonska kiselina (20:0) čini 20 do 30% lipida semena nekih tropskih vrsta *Sapindaceae*, ali je obično prisutna u manjim količinama.

Od nezasićenih masnih kiselina, oleinska kiselina (18:1) je najčešća mononezasićena kiselina koja se nalazi u sastavu mnogih lipida biljnog i životinjskog porekla. Glavna je masna kiselina u maslinovom ulju (70 do 75%), a neka ulja orašastih plodova (makadamija, pistaći, badem i lešnik) sadrže je u količini od 50 do preko 70%. Visokooleinske sorte kao što su suncokret i šafranika sadrže od 75 do 80% oleinske kiseline (Jain i sar., 2004; Moran i sar., 2012).

Od polinezasićenih masnih kiselina, linolna kiselina (18:2 n-6, 2) je među najzastupljenijim kiselinama i u većini biljnih ulja je ima u izobilju. Na primer, u kukuruznom, suncokretovom i sojinom ulju sadrži se u količini većoj od 50%, dok u ulju šafranike prelazi 70%. α -Linolenska kiselina (18:3 n-3, 4) je prisutna u ulju listova biljaka i u nekim uljima semena. Na primer, u sojinom zrnu i repici sadrži se u količini od 8 do 10%, u lanenom ulju više od 50% i od 65 do 75% u perila ulju. Ulja semena mnogih vrsta *Labiatae* sadrže >50% α -linolenske kiseline (Gunstone i sar., 2007; Jain i sar., 2004).



Slika 2. Struktura triacilglicerola i najznačajnijih predstavnika zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (Lammari i sar., 2021)

Ljudsko telo može sintetisati sve masne kiseline koje su mu potrebne za rast i život (stearinsku, oleinsku kiselinu i dr.), ali ne i linolnu i linolensku. Za normalno funkcionisanje ćelije je potrebna bilo koja od ovih kiselina, pa se zbog značajne fiziološke uloge ove kiseline nazivaju *esencijalne masne kiseline* (termin je uveo Burr 1930. godine). Pošto se ne mogu sintetisati u ćelijama, moraju se unositi putem ishrane ili fitopreparata (Gunstone i sar. 2007; Jain i sar., 2004). Biljke su u stanju da sintetišu i međusobno konvertuju esencijalne masne kiseline i obezbeđuju izvore za ishranu ljudi i životinja. U grupu esencijalnih masnih kiselina

spadaju i neke omega-6 i omega-3 polinezasićene masne kiseline koje se dobijaju iz linolne i α -linolenske kiseline, redom, kroz elongaciju i desaturaciju. Esencijalne masne kiseline su prekursori metabolički aktivnih prostaglandina i leukotriena, koji igraju važnu ulogu u imunološkom odgovoru. Omega-3 polinezasićene kiseline su od biološkog i medicinskog interesa i pokazalo se da poseduju zdravstvene efekte, uključujući antiinflamatorne, kardioprotektivne i antikancerogene aktivnosti, između ostalog (Fereidoon i Ying, 2010; Nestel i sar., 1992). Za razliku od polinezasićenih, zasićene masne kiseline se smatraju manje poželjnim za zdravlje i ishranu, jer se veruje da štetno utiču na zdravlje. Zasićene masne kiseline su povezane sa povećanom incidencijom ateroskleroze i koronarne bolesti srca (Jakobsen i sar., 2004). Međutim, nedavno je otkriveno da je stearinska kiselina neutralna ili čak ima zaštitnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti.

Zdravstvene organizacije mnogih zemalja poput Francuske agencije za bezbednost hrane - AFSSA (French Food Safety Agency), kao i britanske i nemačke vlasti, promovisali su unos hrane koja sadrži velike količine omega-3 masne kiseline i povoljan omega-3/omega-6 odnos masnih kiselina. Iz tih razloga prehrambena industrija je usmerena ka optimizovanju „profila masti“ prehrambenih proizvoda (Ixtaina i sar., 2012). Upotrebom 30% životinjskih masti, a 70% biljnih ulja obezbeđuje se optimalna balansiranost masnih komponenti hrane i njihova najveća punovrednost. Zbog većeg sadržaja polinezasićenih masnih kiselina i svoje hranljive vrednosti, biljna ulja trebaju biti sastavni deo svakodnevne ishrane.

2.2.2. Lipidi semena

Triacilgliceroli (trigliceridi) predstavljaju estere masnih kiselina i glicerola i čine od 95 do 98% ukupnog sastava ulja. Osim triglicerida, ulja sadrže i raznovrsna druga netrigliceridna, tzv. „minorna“ jedinjenja (<5%) koja imaju nutritivnu vrednost i poseduju bitna biološka svojstva za farmaceutsku industriju i dobijanje nutraceutskih proizvoda. Ova jedinjenja mogu biti glicerolipidi uključujući monogliceride, digliceride i fosfolipide ili neglicerolipidi kao što su tokoferoli/tokotrienoli, steroli, slobodne masne kiseline, pigmenti, vitamini, fenolna jedinjenja i voda (Lammari i sar., 2010).

Kvalitet i nutritivna vrednost semena je zasnovana na sadržaju lipida, posebno nezasićenih masnih kiselina. Ulja iz semena sadrže masne kiseline različitih dužina ugljenikovog lanca, a uglavnom se ti lanci sastoje od 16, 18 ili 20 C atoma. Najzastupljenije su polinezasićene masne kiseline, linolna i linolenska kiselina. Prisustvo ovih kiselina povećava potencijalna korisna svojstva ulja. Osim što poboljšavaju funkcionalna svojstva, prisustvo polinezasićenih masnih kiselina u ulju povećava njihovu nutritivnu vrednost (Fuentes i sar.,

2012; Lampart-Szczapa, 2008). Prethodne studije su dokazale suštinsku ulogu polinezasićenih masnih kiselina u fluidnosti i selektivnoj permeabilnosti membrana. Sa druge strane, oleinska kiselina i palmitoleinska kiselina, kao mononezasićene masne kiseline, imaju važnu fiziološku ulogu (Youzbachi i sar., 2019).

2.2.3. Kvarenje lipida

Kvarenje masti i ulja u hrani dovodi do razvoja neprijatnog mirisa i ukusa, gubitka hranljivih materija i bioaktivnih materija, pa čak i stvaranja potencijalno toksičnih jedinjenja, čineći tako lipide ili hranu koja sadrži lipide neprikladnom za konzumiranje (Fereidoon i Ying, 2010). Kvarenje masti i ulja može biti posledica enzimskih (hidrolitička razgradnja lipida), mikrobioloških procesa (β – ketooksidacija) i hemijskih reakcija (autooksidacija, fotooksidacija/oksidacija, termooksidacija) (Matijašević i Turkulov, 1980).

Hidrolitička razgradnja lipida se javlja u prisustvu vode i lipolitičkih enzima, pri čemu dolazi do oslobađanja masnih kiselina usled cepanja estarske veze u molekulu triacilglicerola. Stepem nastalih hidrolitičkih promena prati se određivanjem sadržaja slobodnih masnih kiselina koji se izražava putem kiselinskog broja ili u procentima (Matijašević i Turkulov, 1980).

β -ketooksidacija se javlja usled prisustva mikroorganizama koji u prisustvu kiseonika napadaju zasićene masne kiseline, pri čemu se stvara β – keto kiselina kao primarni produkt i metil-ke-ton kao sekundarni produkt reakcije, što za posledicu ima povećanje kiselosti ulja. Istovremeno nastaju i mono- i digliceridi, kao i glicerol. Koja vrsta kvarenja i u kom stepenu će nastupiti zavisi od vrste ulja i uslova čuvanja. Bez obzira na to o kojoj se vrsti kvarenja radi, posledice su iste (Matijašević i Turkulov, 1980).

Autooksidacija je najčešći proces i definiše se kao spontana reakcija lipida sa atmosferskim kiseonikom koja uzrokuje niz lančanih reakcija slobodnih radikala. Ako se proces ubrzava na višim temperaturama radi se o termičkoj oksidaciji, dok fotooksidacija uključuje ekscitaciju fotosenzibilizatora i prenos energije na molekule lipida ili kiseonik. Proces autooksidacije i fotooksidacije praktično su neizbežni jer su posledica prisustva kiseonika u vazduhu, dok je u drugim reakcijama masni supstrat namerno izložen odabranim reagensima ili toploti (Fereidoon i Ying, 2010; Matijašević i Turkulov, 1980).

Kao glavni i najčešći uzročnik kvarenja lipida, oksidacija zavređuje posebnu pažnju, pa će nastavak ovog rada biti usmeren ka njenom detaljnijem opisu.

2.2.3.1. Oksidacija lipida

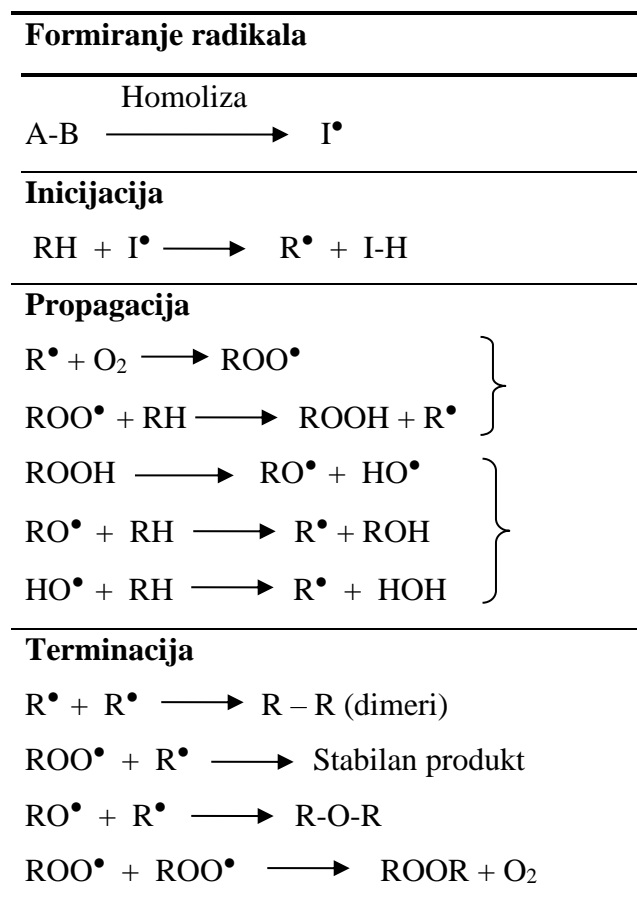
Oksidacija nezasićenih masnih kiselina je glavna reakcija koja narušava hemijska, fizička i organoleptička svojstva lipida. Oksidativno oštećenje lipida u hrani poznato je kao „užeglost“, pri čemu lipidi imaju neprijatan ukus, a proizvodi koji ga sadrže imaju manju nutritivnu vrednost i kraći rok trajanja (Cibulková i sar., 2014). Oksidacija rezultira proizvodnjom brojnih vrsta slobodnih radikala, primarnih produkata oksidacije (hidroperoksidi) i sekundarnih proizvoda oksidacije (ugljovodonici, epoksidi, ketoni i aldehidi). Nastali slobodni radikali i molekuli lako reaguju sa pigmentima, vitaminima, aminokiselinama, proteinima itd., dovodeći do promena senzornih osobina i biološke vrednosti prehrambenih proizvoda. Štaviše, oksidacija može stvoriti toksične proizvode koji mogu u velikoj meri uticati na biološka tkiva i imati nepovoljan uticaj na zdravlje (posebno nastali peroksidi i polimeri).

Proces oksidacije lipida se sastoji od niza lančanih reakcija slobodnih radikala i obuhvata tri uzastopne faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Adhvaryu i sar., 2000). Kada se radi o termooksidaciji, u fazi inicijacije se slobodni radikali stvaraju termolizom, gde se prekid kovalentnih veza izaziva toplotom. Jedinjenja koja se homolizuju na relativno niskoj temperaturi (<100 °C) važni su pokretači lančanih reakcija zasnovanih na radikalima. Nezasićene masne kiseline se razgrađuju na nižim temperaturama u odnosu na zasićene. Stoga, kvantitativni i kvalitativni sastav masnih kiselina u acilglicerolu, kao i broj i položaj dvostrukih veza, imaju ključnu ulogu u procesu oksidacije i stabilnosti lipida (Choe i Min, 2006).

Pri razgradnji nezasićenih masnih kiselina stvaraju se hidroksilni radikali (HO[•]), alkilni radikali (RO[•]) i hidroperoksilni radikali (HOO[•]). Hidroksilni radikali su uglavnom odgovorni za pokretanje oksidacije lipida zbog njihove jake tendencije da preuzimaju elektrone (Choe i Min, 2006). Ovi proizvodi dalje reaguju sa kiseonikom i stvaraju peroksilne radikale (ROO[•]), koji dalje u reakciji sa vodonikom iz molekula masnih kiselina oslobađaju nove radikale (R[•]) i hidroperoksidi (ROOH) - primarne produkte oksidacije. Hidroperoksidi su nestabilni molekuli i dalje se razlažu na dva nova radikala, RO[•] i HO[•], započinući sledeću fazu oksidacije – propagacija (tabela 1). Ova faza se sastoji u daljoj razgradnji hidroperoksida ili bilo kog drugog primarnog produkta oksidacije (Eldin i Pokorn, 2005). Postoje uglavnom dve vrste proizvoda koji nastaju kao posledica razgradnje hidroperoksida. Prvi, hidroperoksidi u interakciji sa dvostrukim vezama formiraju monomerne produkte razgradnje, kao što su ketoni. Reakcija se odvija redukcijom hidroperoksilne grupe u hidroksilni derivat. Drugi, proizvodi niske molekulske mase koji su rezultat cepanja hidroperoksidnog lanca, formiraju aldehide, ketone, alkohole i ugljovodonike. Ova jedinjenja niske molekulske mase odgovorna su za užeglost i

neprijatnu aromu koju proizvode oksidovane masti (Eldin i Pokorn, 2005; Gray i Monahan, 1992; O'Connor i O'Brien, 2006). Konačno, hidroperoksidi i primarni oksidacioni produkti homolizuju se u peroksilne ili alkoksi radikale koji dalje reaguju i formiraju stabilne proizvode slične dimerima. Osim toga, alkoholi i nezasićene masne kiseline (sekundarni oksidacioni produkti) takođe dovode do stvaranja produkata terminacije. Dobijena jedinjenja formiraju viskozne materijale polimerizacijom kao daljim tokom oksidacije. Ovi polimeri su nerastvorljivi u lipidima i predstavljaju završnu fazu oksidacije (Jensen, 2002; O'Connor i O'Brien, 2006). Brzine stvaranja lipidnog peroksi radikala i hidroperoksida zavise od dostupnosti kiseonika i temperature (Velasco i sar., 2004). Vreme formiranja sekundarnog proizvoda iz primarnog produkta oksidacije, hidroperoksida, varira u zavisnosti od lipida. Na primer, sekundarni proizvodi oksidacije nastaju neposredno nakon stvaranja hidroperoksida u maslinovom ulju i ulju repice. Međutim, u ulju suncokreta i šafranike, sekundarni produkti oksidacije nastaju kada je koncentracija hidroperoksida visoka (Guillén i Cabo, 2002).

Tabela 1. Glavne reakcije oksidacije lipida (Fok i Stachowiak, 2007)



Stepen oksidacije i formiranje produkata oksidacije umnogome zavisi od uslova obrade i skladištenja (temperatura, svetlost, kiseonik, metali, enzimi), sadržaja nezasićenih masnih kiselina i njihove raspodele u molekulu triacilglicerola, ali i od prisustva antioksidanasa (inhibitora) ili prooksidanasa (katalizatora). Svi ovi faktori, zajedno ili pojedinačno, mogu promeniti specifična jedinjenja koja nastaju i brzinu njihovog formiranja (Coates i Setti., 1985).

Oksidativna oštećenja lipida mogu nastati tokom proizvodnje, skladištenja, distribucije i konačne pripreme hrane. Pored narušavanja kvaliteta lipida, oksidacija uzrokuje i veliki ekonomski gubitak u prehrambenoj industriji i može uticati na zdravlje ljudi. Zbog toga je oksidativna stabilnost lipida veoma važan i nezaobilazan faktor u određivanju biološke ili nutritivne vrednosti lipida (Rafalowski i sar., 2008).

2.2.4. Oksidativna stabilnost lipida

Poznavanje oksidativne stabilnosti lipida je veoma važno kako bi se unapred utvrdilo vreme tokom kojeg se ulja i masti mogu sačuvati bez bitnih promena kvaliteta. Oksidativna stabilnost ili održivost lipida predstavlja vremenski period tokom kojeg oksidacione reakcije nisu izražene i zavisi od prisustva prirodnih antioksidanasa i prooksidanasa, kao i od strukture i stepena nezasićenosti masnih kiselina (polinezasićene masne kiseline oksiduju brže od mononezasićenih ili zasićenih) (O'Connor i O'Brien, 2006). Na primer, brzina reakcije nezasićene linolne i linolenske kiseline sa kiseonikom je 10 puta, odnosno 25 puta veća od brzine reakcije oleinske kiseline. Ovo ukazuje na mogućnost poboljšanja oksidativne stabilnosti lipida modifikacijom sastava masnih kiselina (O'Keefe i sar., 1993; Shen i sar., 1997). Brzina oksidacije raste sa povećanjem temperature, pritiska kiseonika i zračenja. Oksidaciju katalizuju teški metali, a inhibiraju antioksidansi. Voda i razne „nelipidne“ komponente hrane takođe mogu značajno uticati na proces oksidacije. Oksidacija sporo napreduje u slučaju skladištenja pri nižim temperaturama i pod smanjenim pritiskom kiseonika ili u inertnom gasu i da antioksidansi mogu samo smanjiti brzinu oksidacije, a ne i potpuno je zaustaviti (Eldin, 2005).

2.2.4.1. Metode određivanja oksidativne stabilnosti lipida

Zbog kompleksnosti procesa oksidacije, praćenje reakcija oksidacije lipida i njenih produkata ne može se vršiti jednom metodom. Stoga se preporučuje primena više metoda koje analiziraju sadržaj ukupnih, tj. i primarnih i sekundarnih produkata oksidacije, da bi uvid u stepen nastalih oksidativnih promena bio kompletan (Eldin, 2005). Metode koje se primenjuju za procenjivanje stepena oksidacije lipida mogu se podeliti u tri grupe i to:

a) senzorne metode (zasnivaju se na određivanju pojave neprijatnog, užeglog mirisa i ukusa nastalog usled prisustva razgradnih, sekundarnih produkata oksidacije);

b) hemijske metode (peroksidni broj ili volumetrijsko merenje koncentracije hidroperoksida, anisidinski broj koji se zasniva na merenju neisparljivih karbonilnih jedinjenja i dr.);

c) fizičke metode (spektrofotometrijska merenja koja se zasnivaju na merenju konjugovanih diena/triena – UV spektrofotometrija ili na merenju primarnih i sekundarnih produkata oksidacije - IR spektrofotometrija; gasna hromatografija – merenje nastalih isparljivih jedinjenja; nuklearna magnetna rezonanca – merenje hidroperoksida i alkohola; HPLC – analiza malonildialdehida i sekundarnih proizvoda i dr.).

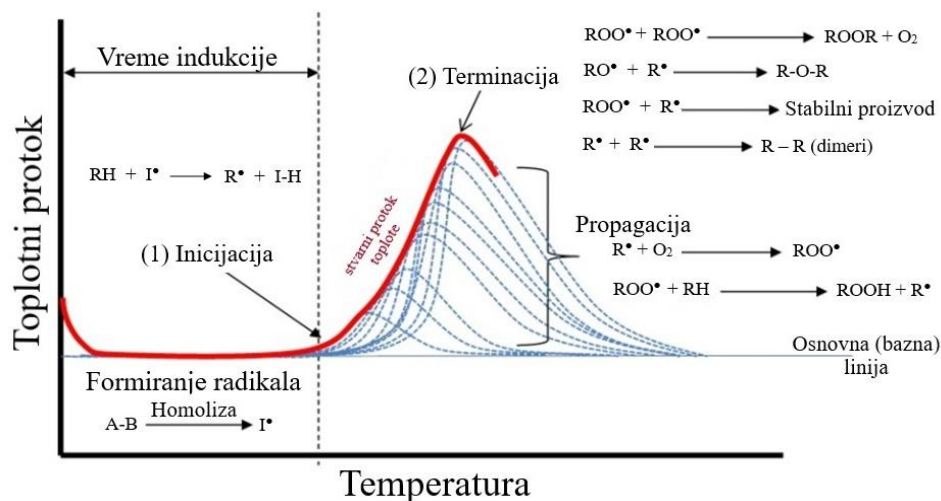
Tokom godina, veliki broj studija se fokusiralo na praćenje i procenu oksidacije lipida primenom Rancimat metode, peroksidnog i anisidinskog broja, spektrofotometrijske i gasno-hromatografske analize masti i ulja iz različitih izvora (Eldin, 2005; Gray i Monahan, 1992; O'Connor i O'Brien, 2006). Međutim, izvan opsega ovog poglavlja je pružiti sveobuhvatan pregled istraživanja koja koriste ove metode.

Da bi se procenila stabilnost ulja i masti, uzorci se obično podvrgavaju ubrzanoj oksidaciji pod uticajem jednog ili više faktora koji ubrzavaju proces. U praksi su najveću primenu našle metode kod kojih je zagrevanje najčešći način ubrzavanja oksidacije, kao i produvanje vazduha kroz uzorak (Delbert, 1990). Od svih metoda pomoću kojih se može odrediti stepen oksidacije lipida, diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) se široko koristi kao analitički, dijagnostički i istraživački metod.

2.2.4.1.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) ulja - osnovna razmatranja

DSC je termoanalitička tehnika koja se zasniva na merenju razlike između brzine protoka toplote u uzorku za ispitivanje i referentnom materijalu koji je podvrgnut istim temperaturnim uslovima. DSC tehnika pruža informacije o važnim toplotnim parametrima (Biliaderis, 1983), a posebno je važna zbog mogućnosti određivanja kinetičkih parametara kao što je energija aktivacije i konstanta brzine reakcije, i termodinamičkih parametara kao što je toplotni kapacitet, entalpija i entropija određenih procesa (Biliaderis, 1983; Litwinienko i Kasprzycka-Guttman, 1998). Toplotne promene koje nastaju kao rezultat apsorpcije ili oslobađanja toplote izazivaju promenu diferencijalnog toplotnog toka koji se na DSC termogramu beleži kao pik. Površina ispod pika je direktno proporcionalna entalpijskoj promeni i njen pravac pokazuje da li je termalni događaj endotermni ili egzotermni (Biliaderis, 1983). Oksidacija lipida je egzotermni proces, te kada dođe do oksidacije uzorka, zabeležena

toplota pokazuje maksimum koji je proporcionalan sa količinom toplote koja se oslobađa iz uzorka. Oslobođena toplota se na DSC termogramu može zabeležiti kao zavisnost protoka toplote (y-osa) i temperature (x-osa). Slika 3. pokazuje idealan termogram za neizotermnu oksidaciju ulja koja obuhvata tri uzastopne faze reakcije - inicijacija, propagacija i terminacija.



Slika 3. Termogram oksidacije ulja u ne-izotermnom režimu

Vremenski period u kome ne dolazi do promene signala protoka toplote je vreme indukcije i prikazan je na početku termograma. Dužina induktionog vremena se često smatra merom stabilnosti ulja. Za vreme ovog perioda ne dolazi do nikakvih hemijskih reakcija. U trenutku u kojem se signal protoka toplote odvaja od bazne (prave) linije se smatra krajem vremena indukcije. Strelica (1) takođe ukazuje na početak oksidacije ili na fazu inicijacije. Ova faza je kratka i može se teorijski protumačiti kao reakcija između radikala, koji su formirani tokom vremena indukcije i nezasićenih masnih kiselina. Proizvodi ove reakcije su nestabilni hidroperoksidi koji dalje reaguju propagirajući oksidaciju. Nagli porast signala protoka toplote se odnosi na fazu propagacije. Plave isprekidane linije ilustruju oksidacione reakcije koje se dešavaju i ne mogu da se vide preko DSC metode zato što su manje egzotermalne. Strelica (2) ilustruje završnu fazu gde se formiraju stabilni proizvodi. Crvena linija je stvarni protok toplote zabeležen DSC metodom (Saldaña i Martínez-Monteaudo, 2013).

DSC ispitivanja oksidacionih promena ulja mogu biti sprovedena u izotermnom i ne-izotermnom režimu.

Ne-izotermna merenja pružaju informacije o kinetičkim parametrima procesa i daju procenu njegove entalpije pri određenoj brzini zagrevanja (Riva i Schiraldi, 1993). U ovom režimu, na DSC krivoj se obično javljaju dva egzotermna pika (Adhvaryu i sar., 2000; Litwinienko i sar., 1997; Litwinienko i Kasprzycka-Guttman, 1998; Litwinienko, 2001;

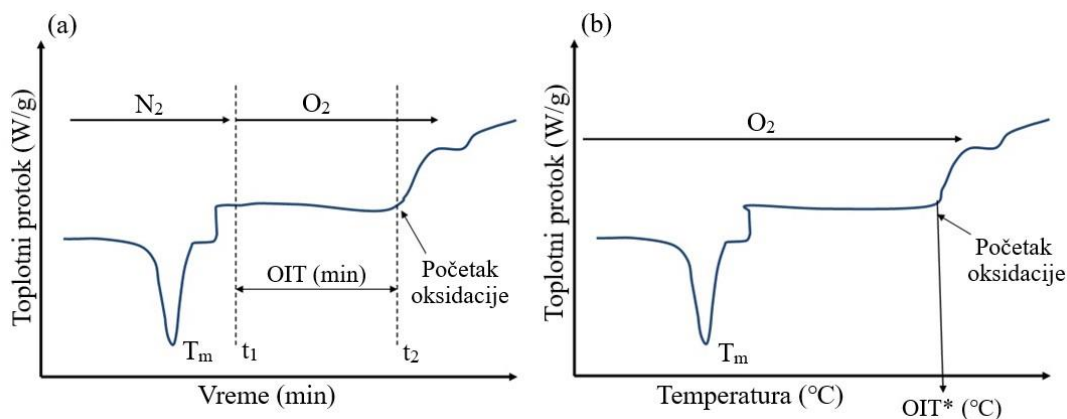
Ulkowski i sar., 2005) kao rezultat razvijanja dva glavna procesa tokom termoksidacije. Prvi pik posledica je stvaranja hidroperoksida, dok je drugi posledica razlaganja hidroperoksida na sekundarne produkte oksidacije. Shodno tome, pri proračunu kinetičkih parametara oksidacije lipida u neizotermnim uslovima i radi procene termooksidativne stabilnosti lipida, najreprezentativnije tačke koje treba uzeti u obzir su početna temperatura procesa oksidacije (T_{on} – onset temperature) i temperatura prvog pika (T_{p1}) (Litwinienko i Kasprzycka-Guttman, 1998). Ne-izotermna DSC merenja su od praktične analitičke vrednosti jer su jednostavna, ne zahtevaju mnogo vremena i mogu se primeniti za analizu malih uzoraka (2–10 mg) (Ixtaina i sar., 2012).

U slučaju izotermnih merenja, signal protoka toplote se generiše na konstantnoj temperaturi. Ranije studije navode da je izotermnu oksidaciju bilo teško izvesti zbog nepreciznih reakcija inicijacije i dobijanja vrlo nestabilnih osnovnih linija, otežavajući na taj način dobijanje vremena početka oksidacije. Međutim, ovi problemi su prevaziđeni uvođenjem argona ili azota i tretiranjem uzoraka u struji argona ili azota radi postizanja toplotne ravnoteže pre početka procesa oksidacije lipida (sprečava se oksidacija do toplotne ravnoteže koja se postiže na izabranoj temperaturi) (Raemi i sar., 1987). Treba napomenuti da se proces oksidacije treba obaviti na temperaturi ispod temperature samozapaljenja lipida (oko 350 °C). U tom slučaju, zabeleženi toplotni događaji posledica su oksidacije lipida, a ne sagorevanja, dok dobijeno vreme indukcije zavisiće od odabira temperature i sastava uzorka (Schmid i Affolter, 2003). Vreme oksidativne indukcije (OIT) je kinetički parametar za procenu oksidativne stabilnosti lipida u izotermnim uslovima (Blaine i Harris, 1997; Schmid i Affolter, 2003). DSC izotermna temperatura ima značajan uticaj na indukcioni period. Povećanje izotermne temperature dovodi do smanjenja perioda indukcije, što je u skladu sa odnosom između brzine hemijske reakcije i temperature (Aktaş i sar., 2018).

Često se postavlja pitanje da li su bolji eksperimenti sa izotermnim uslovima ili konstantnom brzinom zagrevanja. Odgovor je da oba imaju prednosti i mane. U stvari, striktno izotermni eksperimenti nisu mogući, jer uvek postoji neizotermno vreme zagrevanja koje obično traje nekoliko minuta. Najveći nedostatak izotermnih eksperimenata je ograničen temperaturni opseg. Na nižim temperaturama može biti veoma teško postići potpunu konverziju u razumnom vremenskom periodu, dok na višim temperaturama, vreme zagrevanja postaje uporedivo sa karakterističnim vremenom procesa, što znači da je značajan stepen konverzije postignut pre nego što nastupi izotermni režim (Vyazovkin i sar., 2011).

Treba naglasiti da je pored prirode lipida kao što su dužina ugljovodoničnog lanca, položaj dvostrukih veza, stepen nezasićenosti masnih kiselina, prisustvo prirodnih antioksidanasa, eksperimentalni protokol (predtretman i priprema uzoraka, količina uzorka, brzina zagrevanja, kao i interpretacija DSC termograma) od izuzetne važnosti za dobijanje pouzdanih rezultata DSC analize. Eksperimentalni protokol, pored uticaja na oksidativni profil, može imati uticaj i na izgled DSC termograma, a samim tim i na određivanje kinetike oksidacije lipida. Kao najznačajniji parametri eksperimentalnog DSC protokola mogu se izdvojiti brzina zagrevanja, atmosfera u kojoj se izvode DSC merenja i analiza DSC termograma.

U većini dostupne literature, brzina zagrevanja je ispod $25\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Niža brzina zagrevanja je poželjna jer veća brzina zagrevanja može dovesti do stvaranja temperaturnog gradijenta. DSC merenja se mogu izvoditi u atmosferi vazduha i kiseonika. Atmosfera kiseonika se preporučuje jer se oksidacija dešava mnogo brže u poređenju sa vazдушnom atmosferom. Takođe, dokazano je da su u atmosferi kiseonika oksidacioni pikovi izraženiji i da imaju oštiji početak u poređenju sa vazduhom (Cibulková i sar., 2014).



Slika 4. *Određivanje indukcionog vremena oksidacije - OIT (a), i indukcione temperature oksidacije - OIT* (b). T_m - temperatura topljenja, t_1 - početak indukcionog vremena, t_2 - kraj indukcionog vremena (Schmid i Affolter, 2003)*

U slučaju analize DSC termograma, treba obratiti pažnju na čitanje početne temperature oksidacije i na vreme indukcije koji predstavljaju meru oksidativne stabilnosti lipida. Početna temperatura oksidacije (T_{on} ili OIT^*) dobija se iz preseka osnovne linije i tangente povučene na zabeleženom signalu egzotermnog toplotnog toka (Martínez-Monteagudo i sar., 2012). Schmid i Affolter (2003) u svojoj studiji opisuju način određivanja indukcionog perioda oksidacije lipida i ovaj način interpretacije izotermnog DSC termograma je zastupljen u većini literature. Kada se odgovarajući uzorci (lipidi i referentni uzorak) unesu u DSC peć, u mernoj ćeliji se uspostavlja atmosfera azota i zagreva do temperature na kojoj će se odvijati proces oksidacije i

odrediti vrednost OIT kao što je opisano na slici 4. Vreme t_2 se često poistovećuje sa T_{on} i ukazuje na početak degradacije lipida.

U većini literature određivanje kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja vršeno je prema uputstvima i preporukama za prikupljanje kinetičkih podataka i izvođenje kinetičkih proračuna od strane Kinetičkog komiteta ICTAC (International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry) (Vyazovkin i sar., 2011; Vyazovkin i sar., 2014). Preporuke pokrivaju najčešće kinetičke metode koje mogu biti izokonverzijske (model-free methods - bez modela), kao i sa razvijanjem modela (model-fitting methods). Međutim, izvan opsega ovog istraživanja je diskutovati o svim metodama izračunavanja kinetičkih parametara. Poželjno je naglasiti da se u svrhu izračunavanja kinetičkih parametara najčešće koriste metode Ozawa-Flynn-Wall (OFW) (Flynn i Wall, 1966; Ozawa, 1965) i Kissinger-Akahira-Sunose (KAS) metod (Akahira i Sunose, 1971; Kissinger, 2002).

U DSC metodama koje se zasnivaju na snimanju oslobođene toplote u izotermnom ili ne-izotermnom režimu, potrošnja kiseonika se može zanemariti zbog velikog viška kiseonika koji se generiše konstantnom brzinom protoka. To bi takođe značilo da je pod ovim uslovom brzina reakcije nezavisna od koncentracije kiseonika i može se pretpostaviti da je reakcija prvog reda sve dok je brzina inicijacije oksidacije konstantna (Blaine i Harris, 1997; Martínez-Monteagudo i sar., 2012), odnosno takvi uslovi omogućavaju formiranje peroksida nezavisno od koncentracije kiseonika, što čini oksidaciju ulja reakcijom prvog reda. Ovo je osnovna aproksimacija koja se koristi za izračunavanje kinetičkih parametara procesa oksidacije kao što su energija aktivacije, E_a ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$), pred-eksponencijalni faktor, A (min^{-1}) i konstanta brzine reakcije, k (min^{-1}).

Energija aktivacije je parametar koji definiše osetljivost brzine reakcije na temperaturu. Veća vrednost E_a za bilo koju reakciju znači da je brzina reakcije podložna uticaju promene temperature. Prema *Arrhenius*-ovom principu, ulja sa visokom E_a vrednošću brže oksiduju na visokim temperaturama, dok ulja sa niskom E_a vrednošću brže oksiduju na niskim temperaturama (Tan i sar., 2002; Tan i sar., 2001).

Tabela 2. Rezultati određivanja kinetičkih parametara oksidacije lipida semena različitog porekla u ne-izotermnim uslovima

Vrsta lipida	E_a ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)* (energija aktivacije)	A (min^{-1})* (pred-eksponencijalni faktor)	k (min^{-1})** (konstanta brzine reakcije)	Literatura
Lipidi semena lana	$E_{a,\text{on}} = 132,7^{\text{OFW}}$ $E_{a,\text{p1}} = 73,1^{\text{OFW}}$	$A_{\text{on}} = 1,15 \times 10^{16}$ OFW $A_{\text{p1}} = 1,10 \times 10^8$ OFW	-	Litwinienko, 2001
Lipidi semena uljane repice	$E_{a,\text{p1}} = 48,3^{\text{OFW}}$	$A_{\text{p1}} = 9,8 \times 10^3$ OFW	$k_{\text{p1}} = 0,1573^{\text{OFW}}$	Litwinienko i sar., 1995
Lipidi semena pamuka	$E_{a,\text{p1}} = 63,30^{\text{OFW}}$	$A_{\text{p1}} = 9,2 \times 10^6$ OFW	$k_{204,\text{p1}} = 0,37^{\text{OFW}}$	Adhvaryu i sar., 2000
Lipida semena maline	$E_{a,\text{on}} = 102^{\text{KAS}}$ $E_{a,\text{p1}} = 85^{\text{KAS}}$	$A_{\text{on}} = 37,3 \times 10^{10}$ KAS $A_{\text{p1}} = 0,69 \times 10^{10}$ KAS	$k_{25} = 4,50 \times 10^{-7}$ KAS $k_{120} = 9,62 \times 10^{-3}$ KAS	Mićić i sar., 2015
Lipida semena kupine	$E_{a,\text{on}} = 101^{\text{KAS}}$ $E_{a,\text{p1}} = 90^{\text{KAS}}$	$A_{\text{on}} = 19,7 \times 10^{10}$ KAS $A_{\text{p1}} = 0,17 \times 10^{10}$ KAS	$k_{25} = 3,41 \times 10^{-7}$ KAS $k_{120} = 6,68 \times 10^{-3}$ KAS	Mićić i sar., 2015
Lipidi čia semena	$E_{a,\text{on}} = 71,9^{\text{OFW}}$ $E_{a,\text{p1}} = 59,9^{\text{OFW}}$	$A_{\text{on}} = 0,02 \times 10^{12}$ OFW $A_{\text{p1}} = 0,06 \times 10^9$ OFW $A_{\text{on}} = 7,58 \times 10^4 - 4,74 \times 10^7$ OFW	-	Ixtaina et al, 2011
Lipidi semena peršuna	$E_{a,\text{on}} = 43,24 - 66,05^{\text{OFW}}$ $E_{a,\text{p1}} = 30,52 - 52,65^{\text{OFW}}$ $E_{a,\text{on}} = 38,04 - 62,13^{\text{KAS}}$ $E_{a,\text{p1}} = 23,84 - 47,61^{\text{KAS}}$	$A_{\text{p1}} = 1,36 \times 10^3 - 4,50 \times 10^5$ OFW $A_{\text{on}} = 5,91 \times 10^3 - 9,64 \times 10^6$ KAS $A_{\text{p1}} = 3,86 \times 10 - 4,93 \times 10^4$ KAS	$k_{\text{on}} = 44,26 - 470,23^{\text{OFW}}$ $k_{\text{p1}} = 7,13 - 50,62^{\text{OFW}}$ $k_{\text{on}} = 0,62 - 2,97^{\text{KAS}}$ $k_{\text{p1}} = 0,77 - 4,83^{\text{KAS}}$	Drăghici i sar., 2018

*Oznaka on/p1 u subscript-u odnosi se na parametre dobijene iz $T_{\text{on}}/T_{\text{p1}}$.

**Broj u subscript-u za k označava temperaturu ($^{\circ}\text{C}$) na kojoj se izračunava konstanta brzine

***Oznaka OFW/KAS u superscript-u odnosi se na Ozawa-Flynn-Wall i Kissinger-Akahira-Sunose metode

Na energiju aktivacije utiče stepen polinezasićenosti u biljnim uljima. Generalno se primećuje da bi visoka polinezasićenost (sadržaj linolne i linolenske kiseline) smanjila, a da bi visok sadržaj oleinske kiseline u lancu masnih kiselina povećao E_a u procesu oksidacije. Slično, procentualno povećanje zasićenih ugljenika povećanjem broja metilenskih grupa ($-\text{CH}_2-$) u lancu masnih kiselina bi poboljšalo otpornost na početak procesa oksidacije. Energija aktivacije bi u tom slučaju bila znatno visoka. Ovo bi rezultiralo odlaganjem početka inicijalnog procesa oksidacije. Oksidacija je veoma složen proces koji dovodi do brojnih proizvoda oksidacije koji uključuju različite intermedijere. Ova intermedijarna jedinjenja imaju sopstvenu konstantu brzine. Ukupna E_a je kumulativni efekat svih energija aktivacije dostupnih u sistemu tokom perioda oksidacije (Adhvaryu i sar., 2000). Međutim, izračunate vrednosti E_a ne bi trebalo da se koriste kao jedini parametar za rangiranje oksidativne stabilnosti ulja i drugih lipidnih sistema. U tabeli 2 i tabeli 3, prikazani su literaturni podaci kinetičkih parametara oksidacije ulja različitih semena koja su podvrgnuta režimu izoternog i ne-izoternog merenja, redom. Kao što se može videti iz tabele 2, povećanje temperature za svakih 10 $^{\circ}\text{C}$ izaziva dvostruko

povećanje vrednosti konstante brzine reakcije (k). Ovo je pokazatelj uticaja temperature na brzinu reakcije u procesima oksidacije. k vrednosti se značajno menjaju sa količinom zasićenih masnih kiselina. Međutim, upotreba k vrednosti za procenu oksidativne stabilnosti može biti validna samo na određenoj testiranoj temperaturi, pošto promene u reakcionim mehanizmima mogu nastati kao funkcija temperature (Çiftçi i sar., 2009).

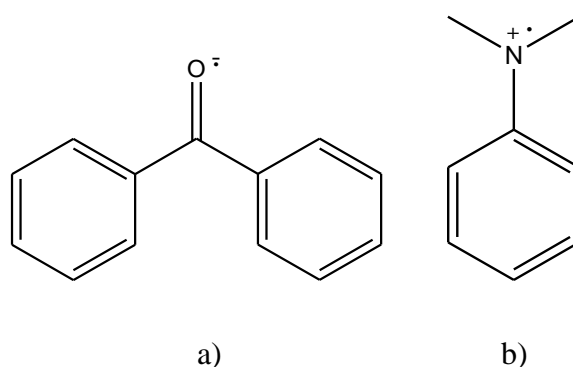
Tabela 3. Rezultati određivanja kinetičkih parametara oksidacije lipida semena različitog porekla u izotermnim uslovima

Vrsta ulja	OIT (vreme indukcije, min)				E_a (kJ·mol ⁻¹)*	A (min ⁻¹)*	k (min ⁻¹)**	Literatura
	110°C	120°C	130°C	140°C				
Lipidi semena kupine	284,93	138,27	62,37	31,44	96	$A_{OIT} = 5 \times 10^{10}$	$k_{25,OIT} = 6,09 \times 10^{-7}$ $k_{120,OIT} = 7,47 \times 10^{-3}$	Micić i sar., 2015
Lipidi semena maline	142,68	72,25	42,98	19,16	92	$A_{OIT} = 2,49 \times 10^{10}$	$k_{25,OIT} = 16,64 \times 10^{-7}$ $k_{120,OIT} = 13,53 \times 10^{-3}$	Micić i sar., 2015
Lipidi semena uljane repice	-	-	33,9	-	$64,4 \times 10^{-3}$	$A_{OIT} = 3536,0$	-	Litwinienko i sar., 1995
Lipidi semena pamuka	172,41	92,00	42,74	20,30	-	-	-	Arafin i sar., 2009
Lipidi semena uljane repice	-	1,4-1,9	-	-	-	-	-	Gromadzka i sar., 2010
Lipidi lana	-	-	23,1	-	-	-	-	Rudnik i sar., 2001
Lipidi lanenog semena i semena crne ribizle	-	50	11	5	-	-	-	Raemy i sar., 1987
Lipidi semena bundeve	42,75-511,70	20,96-256,08	10,28-128,91	6,58-65,78	83,41-99,48	$A_{OIT} = 10,03 - 11,97$	$k_{110} = 0,002-0,024$ $k_{120} = 0,004 - 0,05$ $k_{130} = 0,008 - 0,088$ $k_{140} = 0,015 - 0,162$	Aktaş i sar., 2018
Lipidi semena grožđa	74,49	36,29	17,60	7,53	-	-	-	Tan i sar., 2002
Lipidi semena grožđa	-	-	-	-	99,9	-	$k_{110} = 13,4 \times 10^3$ $k_{120} = 27,6 \times 10^3$ $k_{130} = 56,8 \times 10^3$ $k_{140} = 132,9 \times 10^3$	Tan i sar., 2001

2.3. Slobodni radikali i antioksidansi

2.3.1. Definicija slobodnih radikala i njihovo formiranje

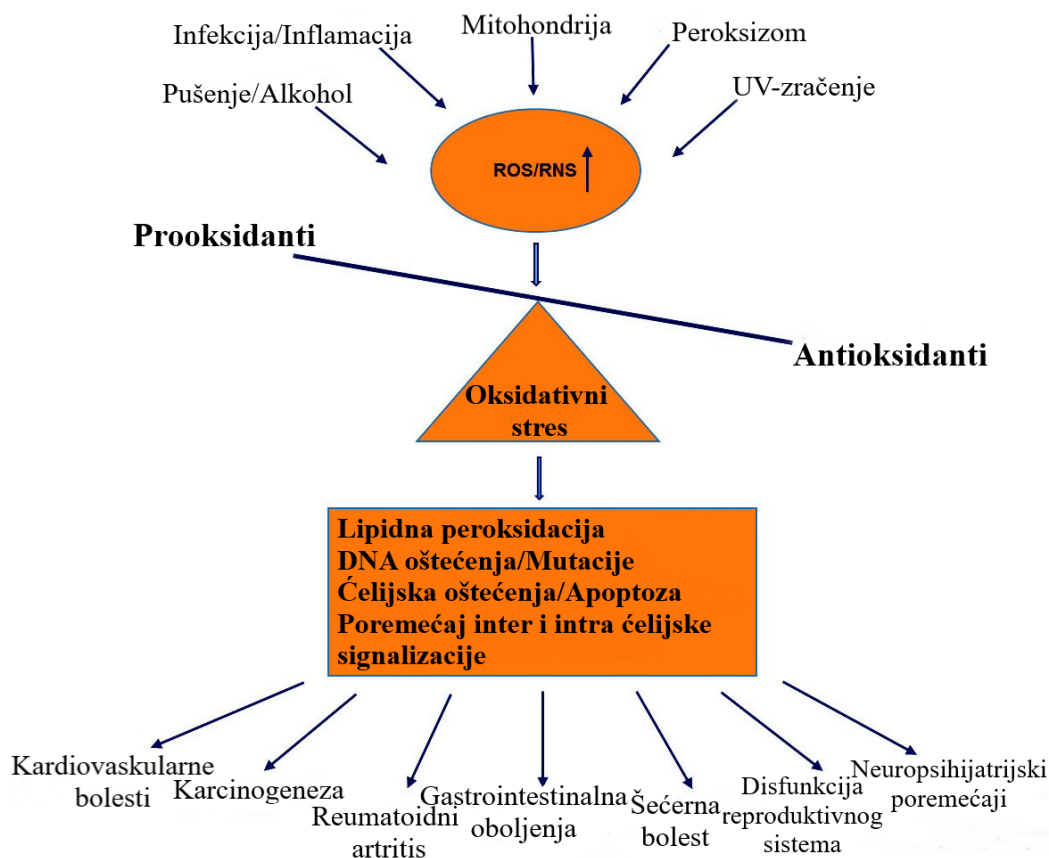
Slobodni radikal se može definisati kao atom ili molekul koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nesparani broj elektrona ga čini nestabilnim, kratkotrajnim i visoko reaktivnim. Zbog svoje visoke reaktivnosti, oni mogu prihvatiti elektrone iz drugih jedinjenja/molekula da bi postigli stabilnost. Molekul koji je u tom slučaju napadnut gubi svoj elektron i sam postaje slobodni radikal, započinjući kaskadu lančane reakcije koja oštećuje živu ćeliju (Dukić i sar., 2008; Kaur i Kapoor, 2001).



Slika 5. a) Radikal anjon (benzofenon anjon radikal) i b) radikal katjon (N,N-dimetilbenzen radikal katjon) (Stojković, 2014)

Ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanasa neophodna je za pravilno fiziološko funkcionisanje organizma. Ako slobodni radikali prevladaju sposobnost tela da ih reguliše, dolazi do stanja poznatog kao oksidativni stres. Oksidativni stres je normalna pojava, odnosno prisutan je i kod zdravih osoba jer je, npr., usko povezan sa starenjem i procesom oksidacije koja je deo biohemijskog procesa stvaranja energije koja nam je neophodna za život. Na nižim, umerenim ili fiziološkim nivoima, slobodni radikali služe nekim veoma vitalnim funkcijama kao što su odbrambeni mehanizam organizma, zarastanje rana, fiziološka regulacija ćelijske signalizacije, ćelijski rast, regulacija citokina, neuromodulacija, imunološka modulacija i imunološka odbrana, inflamatorni odgovor, apoptoza, transport jona, regulacija T-ćelija, adhezija i širenje fibroblasta, regulacija ekspresije gena itd. (Bisht i Dada, 2017). Problem nastaje kada se poremeti fina ravnoteža i kada otkazu prirodni mehanizmi odbrane pa nivo slobodnih radikala počne da prevazilazi kapacitet organizma da ih neutrališe, što menja oksidativni status i ćelija ulazi u zonu povećanog oksidativnog stresa ili stanje visokog rizika za nastajanje najrazličitijih poremećaja i bolesti (slika 6). Slobodni radikali mogu biti

elektroneutralni, ali i pozitivno ili negativno naelektrisani (radikal katjoni i radikal anjoni, slika 5). Izvori formiranja slobodnih radikala se mogu podeliti na endogene i egzogene. Na slici 6 dati su primeri endogenog i egzogenog izvora formiranja slobodnih radikala i slikoviti prikaz nastanka oksidativnog stresa i njegovih posledica na ljudsko zdravlje.



Slika 6. Šema nastanka slobodnih radikala i njihova patološka uloga (Bisht i Dada, 2017)

Najvažniji slobodni radikali proizvedeni tokom metaboličkih reakcija su radikali dobijeni iz kiseonika ili reaktivne vrste kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species, ROS). Pored kiseoničnih vrsta, u slobodne radikale ubrajaju se i reaktivne vrste azota (engl. Reactive Nitrogen Species, RNS).

Reaktivne vrste kiseonika i reaktivne vrste azota se mogu klasifikovati u radikalsku i ne radikalsku grupu jedinjenja (tabela 4). Reaktivnost radikalske grupe je jača od ne radikalskih stabilnih vrsta (Sen i sar., 2010). Visoka reaktivnost radikalske grupe je rezultat prisustva jednog nesporenog elektrona koji teži da ga donira ili da dobije drugi elektron da bi postigao stabilnost. Jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi sadrže najmanje jedan nesporeni elektron i sposobna su za nezavisno postojanje. Sam molekul kiseonika spada u ovu grupu jedinjenja, a zbog prisustva dva nesporena elektrona naziva se biradikalnim (Phaniendra i sar., 2015).

Tabela 4. Najvažnije reaktivne slobodno radikalske i ne radikalske vrste kiseonika i azota
(Phaniendra i sar., 2015)

Slobodno radikalske vrste	Neradikalske vrste
Kiseonične vrste	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroperoksil radikal, HO_2^{\cdot}	Hipobromna kiselina, $HOBr$
Hidroksil radikal, $\cdot OH$	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
Peroksil radikal, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksil radikal, RO^{\cdot}	Singletni kiseonik, 1O_2
Karbonatni radikal, $CO_3^{\cdot-}$	Organski peroksid, $ROOH$
Ugljenoksidni radikal, $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot-}$
Azotne vrste	
	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot-}$
	Nitrozil katjon, NO^+
	Nitroksil anjon, $NO^{\cdot-}$
Azotni oksid (azot monoksid), NO^{\cdot}	Diazot trioksid, N_2O_3
	Diazot tetraoksid, N_2O_4
Azot dioksid, NO_2^{\cdot}	Azotastu kiselinu, HNO_2
	Nitril hlorid, NO_2Cl
	Peroksiazotasta kiselina, ONOOH

Ne radikalska grupa jedinjenja se ne ubraja u slobodne radikale, ali lako može dovesti do nastanka lančanih reakcija slobodnih radikala u živim organizmima (Phaniendra i sar., 2015).

2.3.2. Antioksidansi

Svaka diskusija o korišćenju antioksidanasa u ljudskom zdravlju mora započeti razumevanjem endogene proizvodnje slobodnih radikala i mehanizmom ljudskog tela za suzbijanje takvih. Antioksidativni sistem zaštite se može definisati kao sistem koji uključuje *endogene* i *egzogene* komponente koje funkcionišu interaktivno i sinergijski u cilju neutralizacije slobodnih radikala, čime se postiže suprotstavljanje štetnom efektu fiziološkog procesa oksidacije u ljudskom organizmu (Mohammed i sar., 2015). *Endogene* komponente predstavljaju antioksidanse koji nastaju u ljudskom organizmu, dok *egzogene* komponente obuhvataju antioksidanse koji se unose putem hrane ili lekova. U nastavku teksta biće razmatrane samo egzogene komponente sistema antioksidativne zaštite (antioksidansi hrane),

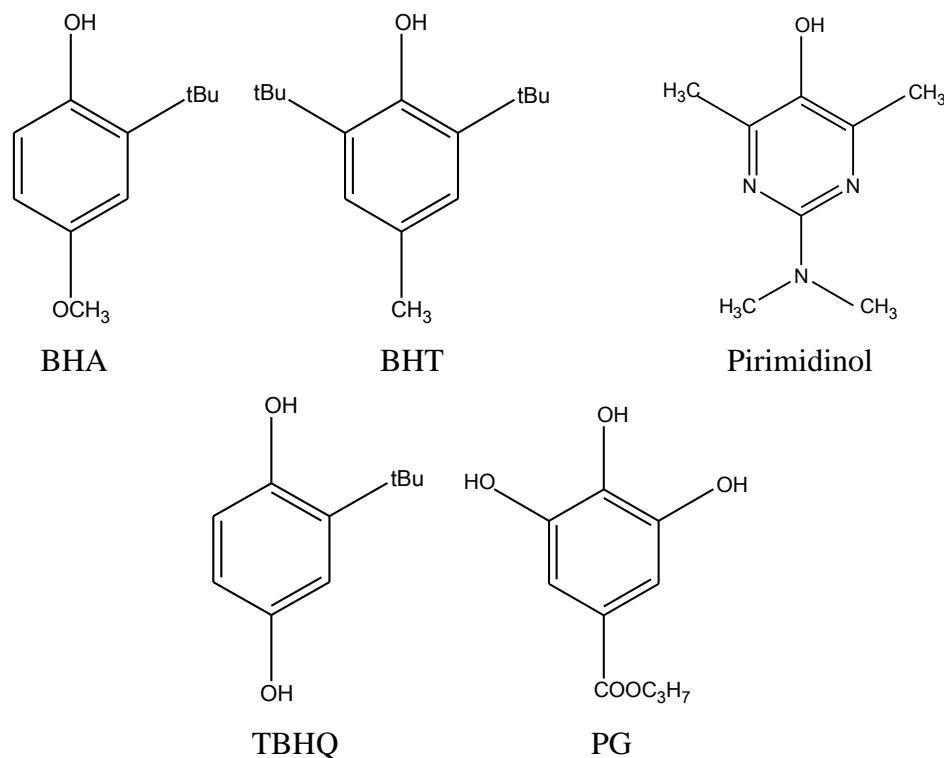
obzirom da endogene komponente obuhvataju enzimske i neenzimske antioksidanse koji nisu predmet ovog rada.

Prema Pravilniku o kvalitetu i uslovima upotrebe aditiva u namirnicama i drugim zahtevima za aditive i njihove mešavine (Sl. list SCG, br 56/03), antioksidansi su supstance koje produžavaju trajnost prehrambenih proizvoda štiteći ih od kvarenja prouzrokovanog oksidacijom. Drugim rečima, antioksidansi su jedinjenja koja inhibiraju ili odlažu oksidaciju supstrata, iako su prisutni u znatno manjoj količini od supstrata koji podleže oksidaciji. Da bi antioksidans bio primenjiv u prehrambenoj industriji mora ispuniti određene zahteve: ne bi trebalo negativno da utiče na boju, miris i ukus; treba da bude efikasan u niskim koncentracijama (0,001%–0,01%); da bude kompatibilan sa hranom i ima laku primenu; da bude stabilan tokom obrade i skladištenja; i da njegova upotreba bude ekonomična.

Antioksidansi se dele na prirodne i sintetičke. Među najznačajnijim *prirodnim* antioksidansima nalaze se polifenolna jedinjenja, vitamini i karotenoidi. Izvori ovih antioksidanasa mogu biti razni biljni materijali, poput lekovitog bilja, začina, semena, voća i povrća. Polifenolna jedinjenja su glavna biljna jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem. Pored antioksidativnog delovanja, nosioci su mnogo drugih bioloških aktivnosti što ukazuje na njihov pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Sa druge strane, ova jedinjenja imaju i važne efekte na aromu i teksturu prehrambenih proizvoda. Pokazuju veliku raznolikost struktura, od jednostavnih molekula (npr. ferulinska kiselina, galna kiselina, vanilin i kafeinska kiselina) do polifenola poput tanina i flavonoida. Što se tiče vitamina, najvažniji su vitamin C i vitamin E (tokoferoli i tokotrienoli, od kojih postoje po četiri vrste, α , β , γ , δ , ali je najvažniji α -tokoferol koji pokazuje značajnu biološku aktivnost). Vitamin E se uglavnom može naći u mahunarkama i žitaricama. Vitamin C je rastvorljiv u vodi i prisutan je u mnogim vrstama voća i povrća. β -karoten, α -karoten, likopen i lutein su glavni karotenoidi sa antioksidativnom aktivnošću. Pored antioksidativnog potencijala, oni imaju mogućnost da se koriste kao prehrambene boje za hranu. Većina karotenoida se nalazi u voću i povrću (Choi i sar., 2009).

Sva ova jedinjenja prisutna u biljkama se jednim imenom mogu nazvati fitohemikalijama. Fitohemikalije kao što su polifenoli imaju više od jedne hidroksilne grupe vezane za jedan ili više benzenovih prstenova, dok fenolne kiseline sadrže jednu hidroksilnu grupu vezanu za benzenov prsten, ali i više benzenovih prstenova sa različitim drugim grupama. Veći broj hidroksi grupa na benzenovom prstenu omogućava veću antioksidativnu moć jedinjenja (Choe i sar., 2009). Iz tih razloga, ovakva jedinjenja pokazuju visoki antioksidativni potencijal unutar biljnih tkiva gde se nalaze, što zauzvrat povećava potencijalni antioksidativni efekat hrane u kojoj su ugrađeni. Mnoge blagodatne povezane sa funkcionalnim namirnicama

pripisuju se upravo prisustvu antioksidativnih jedinjenja. Skorija istraživanja pokazuju da što je ishrana bogatija prirodnim antioksidansima to je manja učestalost bolesti u ispitivanoj populaciji (Krishnaiah i sar., 2011).



Slika 7. Struktura sintetičkih antioksidanasa (Gunstone i sar. 2007)

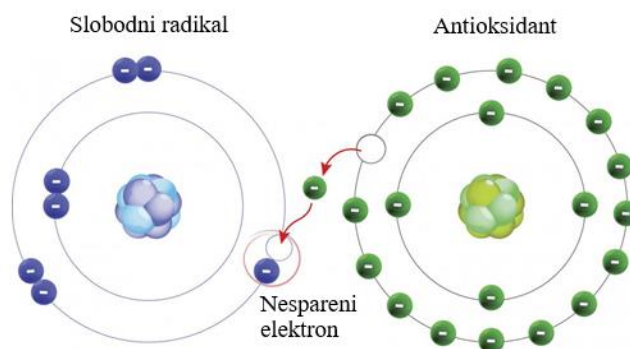
Najpoznatiji *sintetički* antioksidansi u prehrambenoj industriji su terc-butil-4-hidroksianizol (BHA), terc-butil-4-hidroksitoluen (BHT), propil-galat (PG), terc-butil-hidrohinon (TBHQ), askorbil-palmitat (AP), butil-galat (BG), oktil-galat (OG), dodecil-galat (DG) i limunska kiselina (Lourenço i sar., 2019). Pre nekoliko godina, prijavljeni su pirimidinoli - antioksidansi koji sadrže dialkilamino grupu koja snažno donira elektrone i među najjačim su poznatim sintetičkim antioksidansima (Kenar i sar., 2007). Piridinoli, koji u prstenu imaju samo jedan azot, mogu biti još efikasniji (Wijtmans i sar., 2004). Iako pokazuju bolje performanse (veća stabilnost, niski troškovi i široka dostupnost) u odnosu na prirodne, zbog mogućih toksičnih i/ili mutagenih efekata, prekomerna upotreba sintetičkih antioksidanasa je dovedena u pitanje, što je podstaklo interes mnogih istraživača da istražuju prirodne antioksidanse (Sen i sar., 2010). Da bi se hrana zaštitila od nepoželjnih oksidativnih promena i da bi se ukupni kvalitet i rok trajanja hrane povećao, dodatak antioksidanasa je jedan od načina rešavanja ovog problema.

Treba naglasiti da u slučaju dodataka određenih antioksidanasa (sintetičkih ili prirodnih), njihova efikasnost može zavisiti od različitih faktora, uključujući količinu prirodnih

antioksidanasa, profil masnih kiselina, skladištenje i druge uslove (Kenar i sar., 2007). Upotreba antioksidanasa nije metoda za sprečavanje oksidacije. Njihova upotreba samo usporava početak oksidacije, odnosno produžava period indukcije. Stoga je preporučljivo sprečiti izlaganje lipidnog materijala faktorima koji podstiču oksidaciju, čak i kada se koriste antioksidansi (Choe i Min, 2006). Yanishlieva i Marinova (1992) sugerirše da bi procena antioksidativne efikasnosti trebalo da se usredsredi ne samo na produženje indukcionog perioda, već i na brzinu oksidacije tokom indukcionog perioda. Neki antioksidansi, poput α -tokoferola, gube efikasnost što može biti svedok paradoksalnih ishoda kada su prisutne vrlo visoke koncentracije (Huang i sar., 1994; Porter, 1980, Porter i sar., 1989; Porter, 1993). Takođe je moguće koristiti više od jednog antioksidansa za uticaj na različite faze procesa reakcije, što može uticati na njihovu efikasnost zbog sinergističkog dejstva (Drusch i sar., 2008; Serfert i sar., 2009).

2.3.3. Mehanizam delovanja antioksidanasa

Reakcija između antioksidanasa i slobodnih radikala je reakcija drugog reda i ne zavisi samo od koncentracije antioksidanasa i slobodnih radikala, već i od faktora koji se odnose na hemijsku strukturu oba reagensa, medijuma i reakcionih uslova. Stoga, mehanizmi reakcije antioksidativnih jedinjenja usko su povezani sa reaktivnošću i hemijskom strukturom slobodnih radikala, kao i sa okruženjem u kojem se nalaze ove reaktivne vrste (Santos-Sánchez i sar., 2019). Na slici 8, prikazan je osnovni mehanizam razmene elektrona između slobodnog radikala (reaktivne vrste sa nesparenim elektronom) i antioksidansa (donor elektrona) kojim se postiže stabilnost reaktivnih vrsta.



Slika 8. Mehanizam delovanja antioksidanasa

Generalno, antioksidansi mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima zahvaljujući njihovoj sposobnosti da:

- deluju kao „hvatači” (skevindžeri) slobodnih radikala,
- deluju kao donori elektrona,

- donori H-atoma peroksil ili hidrokasil radikalima,

ili da:

- deluju kao akseptori elektrona,
- akseptori H-atoma ugljenikovih slobodnih radikala.

2.4. Polifenolna jedinjenja

2.4.1. Osnovna svojstva polifenolnih jedinjenja i njihova klasifikacija

Polifenoli predstavljaju veliku grupu jedinjenja (najmanje 10 000) koja pripada sekundarnim metabolitima i derivatima pentozna fosfatnog puta, puta šikiminske kiseline i fenilpropanoide u biljkama. Nalaze se u gotovo svim delovima biljke, ali sa kvantitativnom raspodelom koja varira između različitih tkiva biljke i unutar različitih populacija iste biljne vrste (Robards, 2003). Polifenolna jedinjenja sadrže jedan ili više aromatičnih prstenova sa vezanim jednim ili više hidrokasilnih supstituenata i kreću se od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimerizovanih jedinjenja (Ajila i sar., 2008). Klasifikuju se na osnovu nekoliko kriterijuma u skladu sa izvorom, biološkom funkcijom ili hemijskom strukturom (Mocanu i sar., 2015). Prema jednoj od klasifikacija, polifenoli se mogu podeliti u dve velike grupe: flavonoidi i neflavonoidi. Ne flavonoidi obuhvataju fenolne kiseline (benzoeve i cimetne kiseline), stilbene, lignane, tanine i druge polifenole (uključujući kurkumin, gingerol itd.). Od svih klasa polifenola, flavonoidi predstavljaju 60%, a fenolne kiseline 30% (Mocanu i sar., 2015). Klasifikacija polifenolnih jedinjenja i njihovi najznačajniji predstavnici prikazani su na slici 10.

Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka prisutni u jestivom voću, povrću, začinskom bilju, začinicima, mahunarkama, orašastim plodovima i u napicima biljnog porekla, kao što su čaj i vino. Pored toga što doprinose boji i senzornim karakteristikama biljaka, flavonoidi igraju važnu ulogu u rastu i razmnožavanju biljaka, pružajući zaštitu od patogena i predatora (Dai i Mumper, 2010). U biljkama su uglavnom prisutni kao glikozidi gde su sa šećernim delom (glukoza, galaktoza, ramnoza, ksiloza, rutinoza, arabinopiranoza i arabinofuranoza) povezani preko OH grupe (*O*-glikozidi) ili preko ugljenik-ugljenik veza (*C*-glikozidi). Većina flavonoida u biljkama je vezana za šećer pre kao flavonoid *O*-glikozid nego kao flavonoid *C*-glikozid. Neki flavonoidi su u biljkama prisutni i kao aglikoni (slobodni oblici) (Cai i sar., 2004).

Osnovni strukturni skelet flavonoida sačinjen je od 15 atoma ugljenika (C6-C3-C6) od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenov prsten A, kondenzovan sa piranskim prstenom C). Ostalih šest C-atoma čine benzenov prsten (B) povezan sa benzopiranskim

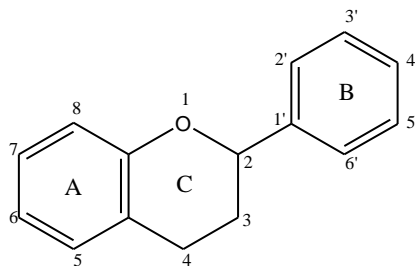
prstenom na poziciji dva (flavoni, dihidroflavoni, flavonoli, katehini, flavani i antocijanidini), tri (izoflavonoidi) i četiri (4-fenil-kumarini). Obrasci supstitucije uključuju hidroksilaciju prstenova A i B, metilaciju hidroksilnih grupa, prenilaciju i glikozilaciju. Supstitucija sa hidroksil, metoksil ili drugim grupama i glikozilacija utiče na hidrofilitnost i mnoge biološke aktivnosti flavonoida i fenolnih jedinjenja uopšte. Struktura najvažnijih podklasa flavonoida prikazana je na slici 9.

Antioksidativna svojstva flavonoida su jedno od najbitnijih svojstava ovih jedinjenja. Utvrđeno je da mnoge biološke funkcije, uključujući antimutagenost, antikarcinogenost i „antiaging“ mogu poticati od ovog svojstva (Cai i sar., 2004). Antiinflamatorna, antimikrobna, antivirusna i imunomodulatorna aktivnost flavonoida na ljudsko zdravlje je takođe istražena i dokazana (Alzaabi i sar., 2022; Khayri i sar., 2022). Sa druge strane, flavonoidi se takođe mogu ponašati kao prooksidansi jer njihova oksidacija stvara slobodne radikale koji mogu oštetiti DNK, lipide i druge biološke molecule (Cao i sar., 1997).

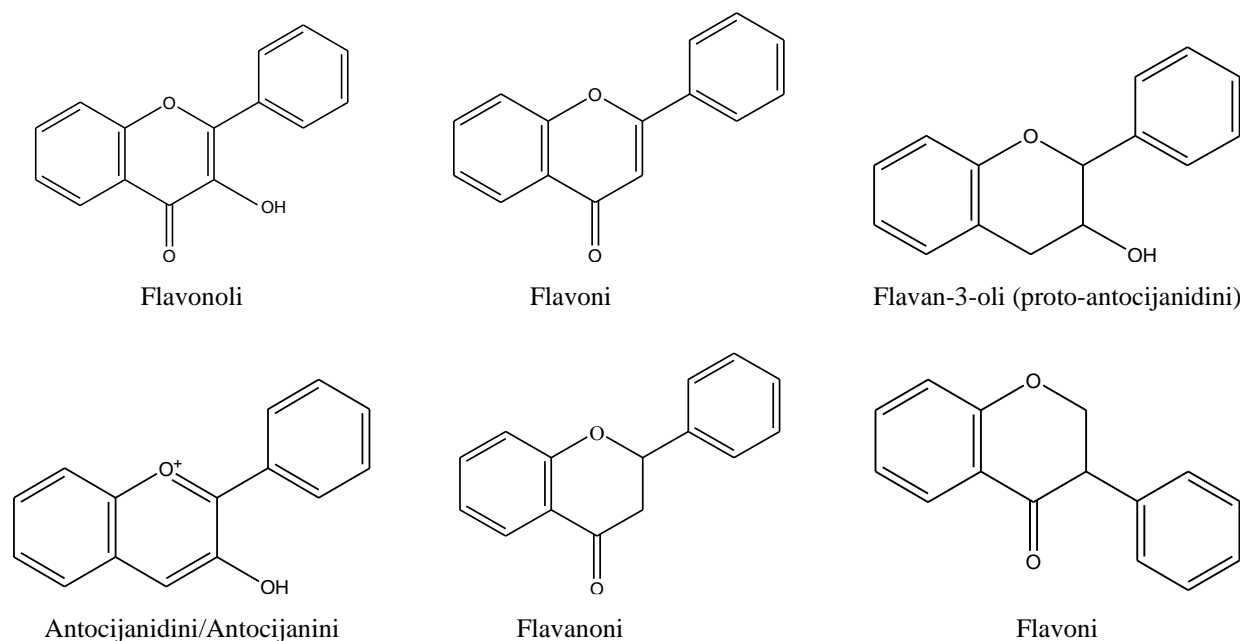
Sa stanovišta ishrane, najreprezentativnije i najvažnije podklase flavonoida su flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, antocijanini, flavanoni i izoflavoni (Fantini i sar., 2015).

Flavonoli su prisutni u biljkama u glikozilovanom obliku (-O glikozidi). Komponenta šećera, najčešće glukoza ili ramnoza, nalazi se na poziciji 3 C-prstena. Glavni flavonoli su kvercetin, kempferol i miricetin, koji se nalaze uglavnom u voću, jestivim biljkama, vinu i čaju (Manach i sar., 2004). Iako flavonoli predstavljaju najzastupljenije flavonoide koji se nalaze u hrani, njihov dnevni unos je generalno nizak. Nekoliko studija je procenilo da je prosečni dnevni unos od 5,4 do 27,4 mg (Marzocchella i sar., 2011).

Flavoni su prisutni u biljkama uglavnom kao 7-O-glikozidi i njihova hemijska struktura može imati širok spektar supstitucija, uključujući hidroksilaciju, metilaciju, O- i C-alkilaciju i glikozilaciju (Crozier i sar., 2009). Najzastupljeniji predstavnici u hrani su apigenin (peršun, celer, crni luk, beli luk, biber, čaj od kamilice) i luteolin (tajlandski čili, listovi luka, celer). Manje zastupljeni flavoni su tangeretin, nobiletin, baicalein, vagonin i krizin. Procenjeni dnevni unos flavona je 0,3–1,6 mg (Marzocchella i sar., 2011).



Osnovna struktura



Slika 9. *Struktura najvažnijih podklasa flavonoida*

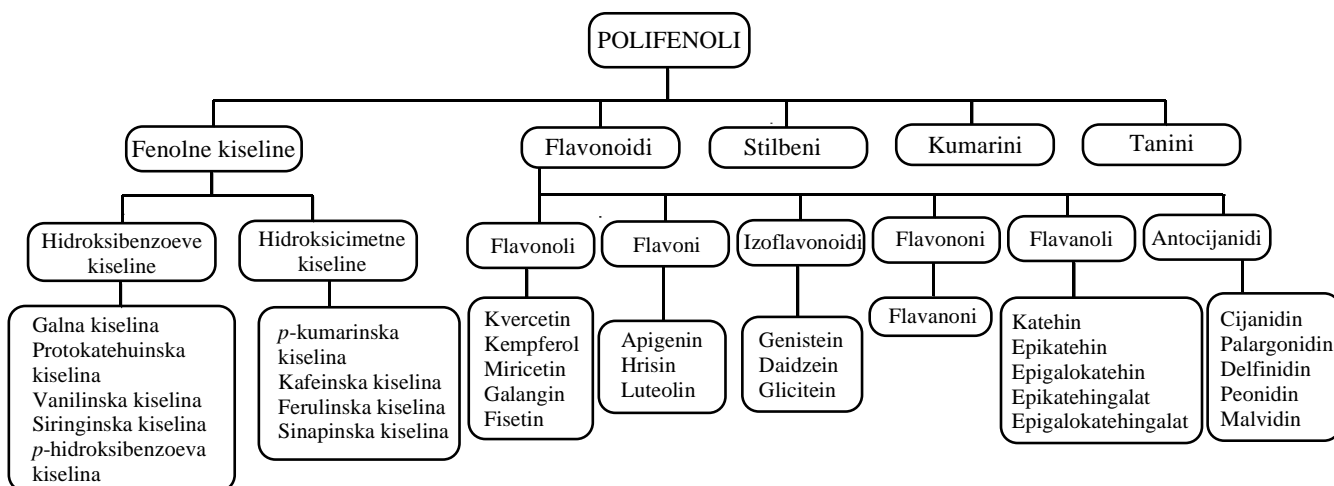
Flavan-3-oli su hemijski najsloženija podklasa flavonoida, sadrže hidroksilnu grupu na poziciji 3 C-prstena. Postoje u monomernim, oligomernim i polimernim oblicima i nisu glikozilovani u hrani. Najjednostavniji monomeri su (+)katehin i njegov izomer (–)epikatehin, čija hidroksilacija stvara (+)galokatehin i (–)epigalokatehin. Dodatnom esterifikacijom sa galnom kiselinom na poziciji 3 C-prstena nastaju (–)epikatehin-3-*O*-galat i (–)epigalokatehin-3-*O*-galat. Zatim, monomeri se mogu vezati jedni za druge preko C-C ili C-O-C (retko) veza kako bi formirali polimerne strukture nazvane proantocijanidini. Postoje u tri oblika - dimeri, oligomeri i polimeri katehina i podeljeni su na tipove A, B i C. Najčešći proantocijanidini koji se nalaze u biljkama su procijanidini B1, B2, B3 i B4 (Manach i sar., 2004; Crozier i sar., 2009). Flavan-3-oli se nalaze uglavnom u voću, bobicama, žitaricama, orašastim plodovima, čokoladi, crvenom vinu i čaju. Procenjeni dnevni unos je veoma visok 12–189,2 mg (Marzocchella i sar., 2011).

Antocijanini su pigmenti rastvorljivi u vodi i javljaju se u dva oblika: aglikonskom obliku (antocijanidin) koji predstavlja osnovnu hemijsku strukturu i heterozidnom obliku (antocijanin) koji je uglavnom prisutan u prirodi. Antocijanin predstavlja glikozidni oblik aglikona koji je vezan za nekoliko šećera (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza i ksiloza) preko C₃ hidroksilne grupe C-prstena. U prirodi postoji više od 550 antocijana. Oni variraju u zavisnosti od broja hidroksilnih grupa i stepena metilacije u molekulu aglikona, broja i položaja šećera povezanih sa molekulom aglikona i broja i prirode alifatičnih ili aromatičnih kiselina povezanih sa ovim šećerima. Najzastupljeniji antocijanini su cijanidin, pelargonidin, delfinidin, peonidin,

petunidin i malvidin. Njihovi glavni izvori su bobičasto voće, trešnje, crne sorte grožđa i ribizla, crvena vina, crne sorte soje, pirinač, pasulj i crvene sorte luka, krompira i kupusa. Procenjeni dnevni unos antocijanina je visok u poređenju sa drugim flavonoidima i iznosi 180–215 mg (Crozier i sar., 2009; Marzocchella i sar., 2011).

Flavanoni se nalaze uglavnom u citrusnom voću, gde se javljaju uglavnom kao mono- i diglikozidi ili, ređe, u obliku aglikona. Najvažniji aglikonski flavanoni su naringenin i hesperetin. Odgovarajući glikovani oblici su neohesperidozidi i rutinozidi. Od neohesperidozida poznati je naringin (naringenin-7-*O*-neohesperidozid) i neohesperidin (hesperetin-7-*O*-neohesperidozid), a od rutinozida narirutin (naringenin-7-*O*-rutinozid) i hesperidin (hesperetin-7-*O*-rutinozid). Hesperetin, naringenin, neohesperidin i naringin su u izobilju u narandžama, grejpfrutu i paradajzu, dok su hesperidin i narirutin najzastupljeniji u slatkoj narandži, limunu, mandarini i grejpfrutu. Procenjeni dnevni unos flavanona u ishrani je najveći u Evropi (20,4–50,6 mg), a relativno niži u SAD (14,4 mg) (Crozier i sar., 2009; Clifford i Toma, 2000; Marzocchella i sar., 2011).

Izoflavoni se klasifikuju kao fitoestrogeni zbog strukturnih sličnosti sa estrogenima, posebno 17- β -estradiolom, koji daju pseudohormonsku aktivnost. Daidzein, genistein i glicitein su najčešći članovi ove podklase. Nalaze se uglavnom u soji i proizvodima od soje i u mahunarkama. U proizvodima od soje, izoflavoni se javljaju kao aglikoni (genistein i daidzein) ili glikozidi (genistin i daidzin), u zavisnosti od toga kako se proizvodi od soje obrađuju. Procenjeni dnevni unos izoflavona ishranom je veoma nizak u Evropi i SAD (0,1–1,2 mg), a veći u Japanu i Kini, gde je potrošnja proizvoda od soje češća (Cassidy-Aedin i sar., 2000; Marzocchella i sar., 2011; Spencer, 2003).



Slika 10. Klasifikacija polifenolnih jedinjenja i njihovi najznačajniji predstavnici (Nayak i sar., 2015)

Fenolne kiseline su hidroksi derivati benzoeve i cimetine kiseline. Razlike među derivatima navedenih kiselina proizilaze kako iz osnovne strukture, tako i iz različitih stepena hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Jolić, 2017).

Hidroksibenzoeve kiseline imaju strukturu C₆-C₁, i najjednostavniji su predstavnici fenolnih jedinjenja koji su pronađeni u prirodi. Nalaze se u nekoliko jestivih biljaka ali je njihov sadržaj veoma nizak, sa izuzetkom crne rotkve, luka i nekih crvenih plodova, u kojima se mogu sadržati od nekoliko desetina miligrama u kilogramu sveže mase. Od derivata hidroksibenzoeve kiseline najzastupljenija je galna kiselina. Glavni izvori galne kiseline u hrani su grožđe, vino, zeleni i crni čajevi i mango, gde se nalazi u obliku ne šećernih galoil-estara. Galna kiselina je takođe biosintetički prekursor hidrolizujućih tanina (galotanina i elagitanina), gde se javlja u obliku kompleksnih estara šećera. Galotanini se nalaze u mangu, a elagitanini se nalaze u crvenom voću kao što su jagode, maline i kupine (Crozier i sar., 2009; Manach i sar., 2004). Pored galne kiseline, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehuinska kiselina i vanilinska kiselina takođe se kotiraju među najzastupljenijim hidroksibenzoevim kiselinama (Cai i sar., 2004).

Hidroksicimetine kiseline su češće u odnosu na hidroksibenzoeve i imaju strukturu C₆-C₃. Najčešće hidroksicimetine kiseline su kofeinska, ferulinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina. Ove kiseline se retko nalaze u slobodnom obliku, osim u prerađenoj hrani koja je podvrgnuta zamrzavanju, sterilizaciji ili fermentaciji. Uglavnom se nalaze u glikozilovanim oblicima ili estrima hininske, šikiminske i vinske kiseline. Kofeinska i hininska kiselina se kombinuju i formiraju hlorogenu kiselinu, koja se nalazi u mnogim vrstama voća (borovnice, kivi, šljive, trešnje, jabuke) i u visokim koncentracijama u kafi: jedna šolja može da sadrži 70–350 mg hlorogene kiseline. Kofeinska kiselina, slobodna ili esterifikovana, je generalno najzastupljenija fenolna kiselina i predstavlja između 75% i 100% ukupnog sadržaja hidroksicimetine kiseline u većini voća. Hidroksicimetine kiseline se nalaze u svim delovima voća, iako se najveće koncentracije zabeležene u spoljašnjim delovima zrelog voća (0,5–2 g hidroksicimetine kiseline/kg sveže mase). Ferulinska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u zrnu žitarica i čini do 90% ukupnog sadržaja polifenola u zrnu pšenice. Nalazi se uglavnom u *trans* obliku, esterifikovana sa arabinoksilanom i hemicelulozom u aleuronu i perikarpu. Samo 10% ferulinske kiseline nalazi se u slobodnom rastvorljivom obliku u pšeničnim mekinjama (Manach i sar., 2004).

2.4.2. Polifenolna jedinjenja koprive

Fitohemijско istraživanje koprive često se povezivalo sa njenom farmakološkom, kozmetičkom, industrijskom i prehrambenom primenom. U novijim studijama razmatrana je upotreba koprive kao hrane, a veliki interes je dat kvalitativnom i kvantitativnom polifenolnom sastavu ekstrakata koprive. Antioksidativno i antimikrobno delovanje prirodnih ekstrakata obično je povezano sa kvalitativnim i kvantitativnim sastavom polifenolnih jedinjenja (Bhusal i sar., 2022; Zeković i sar., 2017).

Proestos i sar. (2006) vršili su identifikaciju polifenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu lista koprive primenom RP-HPLC, dok je GC-MS primenjena za karakterizaciju različitih fenola kao trimetilsilil derivata. Od fenolnih jedinjenja identifikovane su ferulinska i siringinska kiselina, a od flavonoida (+)-katehin hidrat i (-)-epikatehin.

Primenom tečne hromatografije veoma visokih performansi (UHPLC) kombinovane sa HESI-MS/MS (zagrejana elektrosprej jonizacija-tandem masena spektrometrija) i detektorom umreženih dioda (DAD), kao i HPLC-DAD i primenom nekonvencionalnih tehnika ekstrakcije kao što su ultrazvučna, mikrotalasna i subkritična ekstrakcija, Zeković i sar. (2017) su identifikovali rutin kao najdominantniji flavonoid (flavonoidni glikozid) u svim ekstraktima lista koprive, dok je sinapinska kiselina identifikovana kao najdominantnija fenolna kiselina.

U cilju poređenja sastava polifenolnih jedinjenja i utvrđivanja njihove varijacije u različitim vrstama i sortama nadzemnih delova koprive, Bucar i sar. (2006) analizirali su ovu klasu jedinjenja metodom LC-PDA-MS (tečna hromatografija kombinovana sa detektorom umreženih fotodioda i masenom spektrometrijom). U svim uzorcima, glavne fenolne komponente bile su neohlorogena kiselina, hlorogena kiselina i kafeoil malična kiselina, kao i kvercetin, kempferol i izoramnetin glikozidi (kao rutinozidi i glukozidi).

Dvanaest polifenolnih jedinjenja (hlorogena kiselina, rutin, kempferol-3-*O*-rutinozid, izoramnetin-3-*O*-rutinozid, kafeoil-mlečna, kafeoil-vinska kiselina i dr.) identifikovano je u hidroetanolnom ekstraktu nadzemnih delova koprive primenom tečne hromatografije visokih performansi u kombinaciji sa elektrosprej jonizacionom masenom spektrometrijom (HPLC-PDA-ESI-MSⁿ) (Carvalho i sar., 2017), a najveću koncentraciju pokazala su hidrokisicinaminska jedinjenja.

Pinelli i sar. (2008) proučavali su fenolni sastav listova i stabljika iz gajenih i samoniklih biljaka koprive za njenu potencijalnu primenu kao prirodnog vlakna. Jedinjenja koja su analizirana pomoću HPLC-DAD i HPLC-MS sistema su derivati hidrokisicinaminske kiseline, flavonoidi i antocijanini. Hlorogena kiselina, 2-*O*-kafeoil malična kiselina i rutin su bila

najzastupljenija jedinjenja. Uopšteno govoreći, hidrokisicinaminske kiseline su bile najzastupljenija jedinjenja u lišću, flavonoidi u stabljikama, praćeni antocijaninima, koji nisu otkriveni u lišću.

Primenom tačne hromatografije visokih performansi-tandem masene spektrometrije (HPLC–MS/MS) identifikovano je i kvantifikovano 45 fenolnih jedinjenja u ekstraktima koprive iz tri različita dela Srbije (Orčić i sar., 2014). Posebno su analizirani koren, stabljika, lišće i cvet. Rezultati su pokazali vrlo sličan kvalitativni sastav za svaki deo biljke, iako se njihov sadržaj znatno razlikovao. Najzastupljenija jedinjenja bila su hlorogena kiselina, rutin i izokvercitrin.

Cilj rada Francišković i sar. (2017) bio je da utvrdi hemijski sastav koprive koji je povezan sa njenom imuno-modulatorskom aktivnošću. Autori su analizirali dve različite sorte i dva različita dela biljke: bilje i koren. Svaki hidroalkoholni ekstrakt bilja analiziran pomoću tačne hromatografije-tandem masene spektrometrije (LC–MS/MS) pokazao je dominaciju fenilpropanoida i flavonol glikozida: hlorogena kiselina je bila najzastupljenije fenolno jedinjenje, praćeno rutinom i izokvercitrinom. Niža koncentracija fenolnih jedinjenja utvrđena je u ekstraktima korena, pri čemu su lignani pronađeni samo u korenu; hininska i *p*-kumarinska kiselina su bile najzastupljenije kiseline, a zatim lignan sekoizolaricirezinol i kumarin skopoletin.

Kopriva se, zahvaljujući prisustvu polifenolnih jedinjenja kao bioaktivnih jedinjenja, može koristiti za poboljšanje funkcionalnih svojstava prehrambenih proizvoda zbog svoje *in vivo* i *in vitro* aktivnosti (Balpetek i sar., 2019; Carvalho i sar., 2017; Dar i sar., 2013; Farzami i sar., 2003; Gülçin i sar., 2004; Kukrić i sar., 2012; Otles i Yalcin, 2012; Pinelli i sar., 2008).

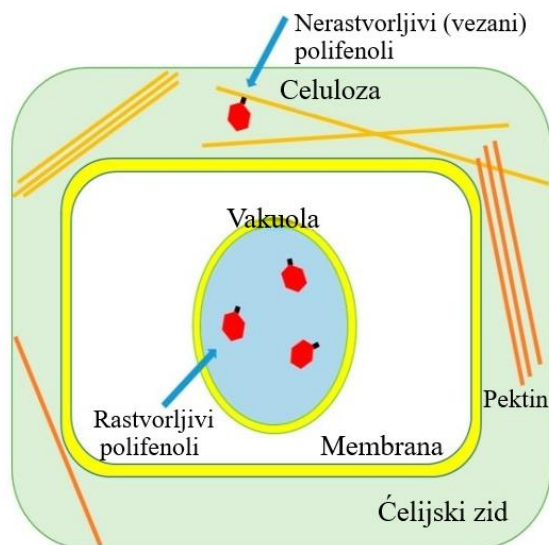
2.4.3. Biosinteza polifenolnih jedinjenja

Biosintezom polifenola detaljno su se bavili mnogi istraživači što je opisano u objavljenim preglednim radovima i knjigama (Knaggs, 2001; Tsao i McCallum, 2009). Kao i sva fenolna jedinjenja, fenolne kiseline kao što su galna kiselina i cimetna kiselina se smatraju metabolitima šikimatnog puta. Biosinteza složenih polifenola kao što su flavonoidi je povezana sa primarnim metabolizmom preko plastida i intermedijera dobijenih iz mitohondrija, od kojih svaki zahteva prelazak u citoplazmu gde su ugrađeni u odvojene delove molekula. Smatra se da aromatični prsten B i hromanski prsten potiču od aminokiseline fenilalanina, koji je sam proizvod šikimatnog puta, dok prsten A od tri jedinice malonil-CoA (Fatland i sar., 2002; Tsao i McCallum, 2009).

Fenilalanin amonijak liaza je ključni enzim fenilpropanoidnog puta koji katalizuje konverziju fenilalanina u cinamat, što zatim dovodi do C₆-C₃ struktura. Konačni intermedijer 4-kumaroil-CoA i tri molekula malonil-CoA se zatim kondenzuju da bi se dobila prva flavonoidna struktura naringenin halkona pomoću enzima halkon sintaze. Halkon je izomerizovan pomoću halkon flavanon izomeraze u flavanon. Ovaj flavanonski intermedijer je ključan jer se u suštini odatle granaju sve klase flavonoida — uključujući njihove podgrupe. Halkon je takođe mesto gde se izoflavoni i kumestrol granaju kroz različite enzime uključujući halkon flavanon izomerazu i izoflavon sintazu. Na primer, međuproducti (2S)-flavanoni su katalizovani flavanon 3-hidroksilazom u dihidroflavonole, koji se zatim redukuju dihidroflavonol reduktazom u flavan-3,4-diole (leukoantocijanine), koji se pretvaraju u antocijanidine pomoću antocijanidin sintaze. Glukozilaciju flavonoida katalizuje glukoziltransferaza (Tsao i McCallum, 2009; Tsao i sar., 2006). Razumevanje biosintetskih puteva polifenola može pomoći u programu formiranja hrane sa povećanim sadržajem polifenola i zdravstvenim prednostima (Tsao i sar., 2006).

2.4.4. Lokalizacija polifenolnih jedinjenja u biljkama

Polifenolna jedinjenja (jednostavne fenolne kiseline i flavonoidi) se javljaju u rastvorljivom-konjugovanom (glikozidi) i nerastvorljivom-vezanom obliku (Nardini i Ghiselli, 2004). U prirodi se fenolne kiseline uglavnom javljaju u nerastvorljivim ili vezanim oblicima, dok su flavonoidi uglavnom prisutni kao glikozidi (*O*-glikozidi ili *C*-glikozidi). Većina rastvorljivih polifenola je lokalizovana u vakuolama biljnih ćelija, dok su nerastvorljivi oblici polifenola lokalizovani u matrici ćelijskog zida gde su kovalentnim vezama preko etarskih, estarskih i ugljenik-ugljenik veza vezani za makromolekule kao što su strukturni proteini, celuloza i pektin (slika 11) (Shahidi i Yeo, 2016). U ćelijskom zidu, ova jedinjenja imaju važnu funkciju koja se ogleda u pružanju fizičke i hemijske barijere, zaštiti od invazije patogena i adstringencije koja odvrća od napada insekata i životinja (Acosta-Estrada i sar., 2014).



Slika 11. Lokalizacija rastvorljivih i nerastvorljivih-vezanih polifenola u biljnoj ćeliji (drugi organi nisu prikazani) (Shahidi i Yeo, 2016)

Klasifikacija polifenolnih jedinjenja na rastvorljive i nerastvorljive oblike je korisna sa nutritivne tačke gledišta, jer će metabolička sudbina u gastrointestinalnom traktu i fiziološki efekti svake grupe u velikoj meri zavisiti od njihove karakteristike rastvorljivosti. Nerastvorljiva polifenolna jedinjenja se ne razgrađuju i mogu se delimično ili potpuno kvantitativno izlučiti u fecesu, dok deo rastvorljivih materija može proći crevnu barijeru i naći se u krvi, nepromenjen ili u obliku metabolita (Reis Giada, 2013).

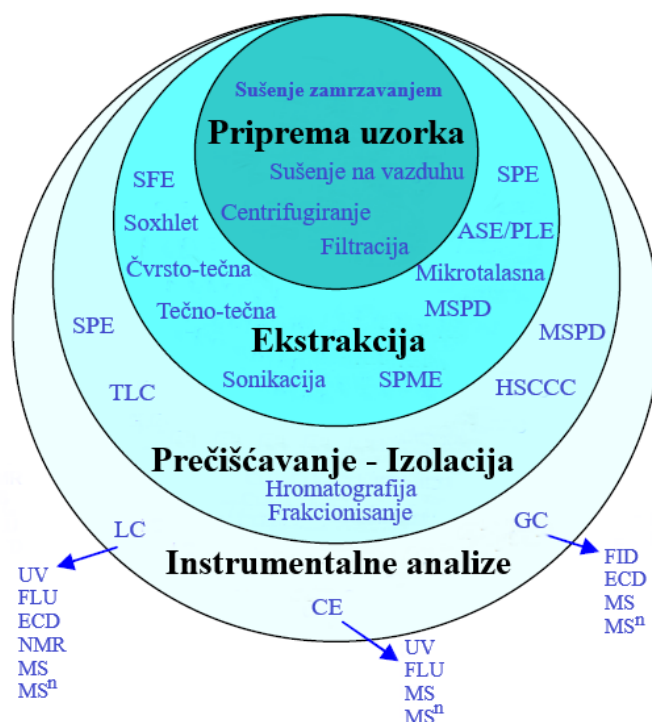
Bioraspoloživost polifenola predstavlja veliku prepreku jer do ciljnih organa stižu u vrlo niskim koncentracijama. Jedno od povoljnih rešenja za ovaj problem predstavlja nanoformulacija polifenola koja donosi neke obećavajuće rezultate (Tabrez i sar., 2013). Sa druge strane, neke studije (Khan i sar., 2008; Lambert i Elias, 2010) su ustanovile da neki polifenoli, u visokim koncentracijama, deluju čak i suprotno: umesto da spreče određenu bolest (kancer), oni mogu doprineti nastanku i napredovanju. Sinergijsko delovanje polifenolnih smeša dodatno rezultira istovremenim uticajem na različite puteve bolesti, što doprinosi bržem i efikasnijem ozdravljenju (De Kok i sar., 2008), dok raznolikost polifenolnih jedinjenja odražava veoma različite biološke funkcije koje se odvijaju u organizmu (Mojzer i sar., 2016).

2.4.5. Ekstrakcija rastvorljivih (slobodnih i konjugovanih) i nerastvorljivih-vezanih polifenolnih jedinjenja

Zbog strukturne raznovrsnosti, fitohemikalije kao što su polifenolna jedinjenja značajno se razlikuju u svojim fizičko-hemijskim svojstvima. Zbog hemijske složenosti i rasprostranjenosti pojave polifenola u biljkama, ekstrakcija, razdvajanje, identifikacija i analiza polifenola ostaje izazov uprkos sve većem napretku u novim instrumentima i tehnikama. Izazov se višestruko povećava kada se uzmu u obzir složeni obrasci glikozilacije i polimerizacije i različite matrice hrane. Međutim, postoje neki opšti pristupi važnim aspektima istraživanja polifenola. Na primer, da bi se izbegla degradacija prirodnih polifenola, uzorci se često suše, zamrzavaju ili liofilizuju pre ekstrakcije jer visok sadržaj vlage ili vode pomaže aktivnosti enzima. Zagrevanje i izlaganje svetlosti i kiseoniku mogu uticati na sastav polifenola, pa treba izbegavati sušenje na visokim temperaturama koliko god je to moguće. Zatim, zbog moguće oksidacije polifenola često se u uzorcima dodaju antioksidansi kao što su butilovani hidroksitoluen (BHT) i askorbinska kiselina (Dai i Mumper, 2010; Mojzer i sar., 2016).

Opšte je poznato da prinos ekstrakcije zavisi od vrste rastvarača različite polarnosti, vremena i temperature ekstrakcije, odnosa uzorak-rastvarač kao i od hemijskog sastava i fizičkih karakteristika uzoraka (Mojzer i sar., 2016). Iako je poznat širok spektar metoda ekstrakcije za različite tipove uzoraka, za većinu uzoraka hrane biljnog porekla, ekstrakcije rastvaračem kao što su tečno-tečna i čvrsto-tečna ekstrakcija se najčešće koriste u laboratoriji (Dai i Mumper, 2010). Na slici 12 prikazane su neke od metoda ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, kao i šematski prikaz eksperimentalnog protokola za kvantitativno i kvalitativno određivanje polifenolnih jedinjenja.

Polifenolna jedinjenja se zbog svoje fenolne prirode više karakterišu kao hidrofilna jedinjenja u odnosu na lipofilna. Stoga se za ekstrakciju slobodnih polifenola kao što su aglikoni, glikozidi i oligomeri uglavnom koristi voda ili polarni rastvarači kao što su metanol, etanol, aceton, i njihove kombinacije, često u različitom odnosu sa vodom. U nekim slučajevima, može se koristiti i etilacetat u zavisnosti od ciljanih polifenola (Tsao, 2010; Shi i sar., 2005; Xu i Chang, 2007). Utvrđeno je da je metanol efikasniji u ekstrakciji polifenola niže molekularne mase, dok se flavanoli veće molekulske mase bolje ekstrahuju vodenim acetonom (Guyot i sar., 2001; Metivier i sar., 1968; Prior i sar., 2001).



Slika 12. Šematski prikaz strategije za određivanje fenolnih kiselina i flavonoida u biološkim tečnostima, pićima, biljkama i hrani (Tsao, 2010)¹

Vezani polifenoli, koji obično ostaju u biljnim ostacima nakon ekstrakcije slobodnih polifenolnih jedinjenja, sve više su prepoznati kao važan dodatak ljudskom zdravlju. Oko 35–65% polifenolnih jedinjenja u vezanom obliku postoji u biljnim matriksima (Wang i sar., 2019). Stoga, da bi se pristupilo kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi nerastvorljivih-vezanih polifenola, najpre ih treba hidrolizirati/osloboditi iz matriksa ćelijskog zida. Kisela i alkalna hidroliza su najčešće korišćene hemijske metode za njihovo oslobađanje, a nedavno su korišćene mnoge druge nove metode kao što su enzimaska hidroliza i hidroliza uz pomoć mikrotalasne pećnice (Shahidi i Yeo, 2016).

Kisela hidroliza za oslobađanje nerastvorljivih-vezanih polifenola se široko primenjuje korišćenjem 1-5% hlorovodonične kiseline u vodi/metanolu. Prednosti kisele hidrolize su njena pogodnost i jednostavnost. Oslobođeni vezani polifenoli se mogu direktno koristiti za dalje eksperimentisanje nakon neutralizacije i filtracije, za razliku od alkalne hidrolize koja zahteva dodatnu ekstrakciju pomoću dietil etra. Fenolna jedinjenja su nestabilna pri vrlo niskim pH vrednostima, tako da se mogu razgraditi tokom procesa oslobađanja, što je nedostatak kisele

¹Skraćenice: SFE, supercritical fluid extraction; MSPD, matrix solid-phase dispersion; SPME, solid-phase microextraction; ASE/PLE, accelerated solvent extractin/pressurized liquid extraction; HSCCC, high-speed counter-current chromatography; TLC, thin layer chromatography; FL, fluorescence; FID, flame ionization detection; ECD, electron capture detection (GC)/electrochemical detector (LC); CE, capillary electrophoresis.

hidrolize. Stoga, najčešći hemijski metod za oslobađanje nerastvorljivih-vezanih polifenola je alkalna hidroliza koja koristi širok spektar koncentracija natrijum hidroksida. Ova metoda hidrolize se pokazala efikasnom u hidrolizi i etarskih i estarskih veza koje se retko raskidaju procesom kisele hidrolize (Acosta-Estrada i sar., 2014). Pored toga, alkalna hidroliza se sprovodi na sobnoj temperaturi, što dovodi do niže stope gubitka polifenola tokom procesa u odnosu na metod kisele hidrolize (Krygier i sar., 1982). Osim pomenutih hemijskih metoda hidrolize, enzimaska hidroliza može poslužiti kao efikasan metod za oslobađanje nerastvorljivih-vezanih polifenola. Generalno, enzimi koji hidrolizuju ugljene hidrate, uključujući celulazu, hemicelulazu, pektinazu, amilazu i glukanazu, koriste se za razgradnju matrice ćelijskog zida koji se sastoji od celuloze, hemiceluloze, pektina i glukana (Landbo i Meyer, 2001). Dezintegrisana matrica ćelijskog zida olakšava ekstrakciju nerastvorljivih-vezanih polifenola. Prednost oslobađanja i ekstrakcije enzimskom hidrolizom je minimiziranje gubitka polifenolnih jedinjenja usled ekstremnih (preniskih ili previsokih) pH uslova tokom procesa. Međutim, zbog složenosti strukture ćelijskog zida, ova metoda oslobađanja vezanih polifenola se značajno razlikuje u zavisnosti od matrice (Tang i sar., 2016), što predstavlja njen nedostatak.

2.4.6. Određivanje antioksidativnog potencijala polifenolnih ekstrakata

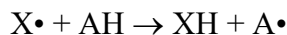
U proučavanju antioksidativnih jedinjenja i mehanizama njihovog antioksidativnog delovanja važno je razlikovati koncepte antioksidativne aktivnosti i antioksidativnog kapaciteta/potencijala. Aktivnost je kinetički pojam i odnosi se na konstantu brzine reakcije između određenog antioksidansa i određenog oksidansa, dok kapacitet predstavlja meru količine uklonjenog (neutralisanog) slobodnog radikala uzorkom, ali ne daje informaciju o brzini kojom pojedina komponenta uzorka reaguje sa reaktivnim vrstama (Roginsky i Lissi, 2005). Merenja antioksidativnog potencijala daju količinu heterogene smeše antioksidanasa koji reaguju zajedno rezultirajući ukupnu sposobnost uklanjanja radikala uzorkom.

Metode merenja i uslovi pod kojima se analiza vrši mogu dovesti do promenljivih rezultata za istu vrstu uzorka. Na primer, različite metode merenja antioksidativnog potencijala koriste različite reaktivne vrste i odvijaju se u nekom određenom vremenu, pa će isti uzorak dati različite vrednosti antioksidativnog potencijala, zavisno o korišćenoj metodi. Zato je vrlo bitno navesti sve faktore koji utiču na rezultat, od kojih su najvažniji: inicijator oksidacije, uslovi reakcije (temperatura, pH i dr.), kao i način određivanja krajnje (završne) tačke merenja (Laguerre i sar., 2007).

Antioksidansi su obično usredsređeni na sposobnost da budu donori vodonika ili donori elektrona. Stoga, mnoge metode određivanja antioksidativnog potencijala mogu se

kategorizovati kao metode koje se zasnivaju na reakcijama prenosa vodonika ili na reakcijama prenosa pojedinačnog elektrona (Santos-Sánchez i sar., 2019).

Metode koje se zasnivaju na reakcijama prenosa vodonika mere sposobnost antioksidansa u uklanjaju radikala doniranjem atoma vodonika i mogu se prikazati jednačinom:

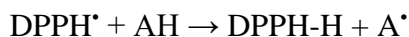


u kojoj je AH bilo koji antioksidans koji se ponaša kao donor vodonika. Prisustvo drugih redukcionih sredstava u uzorcima, pored antioksidanasa koji se proučavaju, otežava testiranje reakcija prenosa atoma vodonika i može dovesti do značajnih grešaka (Santos-Sánchez i sar., 2019). Najčešće korišćene antioksidativne metode koje se zasnivaju na ovom principu merenja su: kapacitet apsorpcije radikala kiseonika (ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) i TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) (Mandić, 2015).

Metode koje se zasnivaju na reakcijama prenosa elektrona zasnivaju se na određivanju sposobnosti antioksidansa da prenosom elektrona redukuju neku oksidativnu vrstu, uključujući katjone metala, karbonile i reaktivne slobodne radikale. U reakciji, ispitivana supstanca koja je ujedno i oksidans, prima elektron od antioksidansa rezultirajući promenom boje ispitivanog uzorka, čiji je intezitet proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Relativna reaktivnost zavisi od deprotoniranja i standardnog potencijala reaktivne funkcionalne grupe, što reakcije prenosa elektrona čini pH zavisnim jer vrednosti standardnog potencijala opadaju s porastom pH. Najčešće korišćene antioksidativne metode koje se zasnivaju na ovom principu merenja su: DPPH (određivanje kapaciteta neutralisanja DPPH radikala ili redukcija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala), FRAP (sposobnost redukcije jona gvožđa - *Ferric Reducing Antioxidant Power*), određivanje redukcionog snage (reducing power method) i TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Mandić, 2015).

2.4.6.1. Princip određivanja kapaciteta neutralisanja DPPH radikala

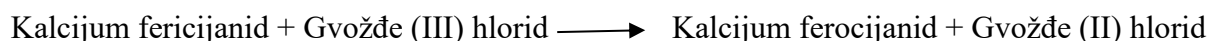
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) je jedan od retkih stabilnih i komercijalno dostupnih radikala koji su sposobni da prihvate elektron ili radikal vodonika i postanu stabilan molekul. Metoda sa DPPH radikalom zasniva se na reakcijama između ovog radikala i uzorka u kojem se meri antioksidativna aktivnost/potencijal, pri čemu se sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH[•] u prisutnosti elektron donora (antioksidans koji hvata slobodne radikale), ljubičasta boja menja u žutu. Redukcija DPPH[•] sa antioksidansom (AH) prati se smanjenjem apsorbanse u opsegu talasne dužine između 515 i 519 nm. Osnovni princip reakcije je opisan u jednačini (1) (Hartwig i sar., 2012):



Da bi se procenio antioksidativni potencijal odgovarajućeg uzorka, eksperimentalni modeli koriste antiradikalisku aktivnost koja se definiše kao količina antioksidanasa koja je neophodna da se početna koncentracija DPPH[•] radikala smanji za 50%, a označava se kao EC₅₀ vrednost. Niske EC₅₀ vrednosti pokazuju visoku antioksidativnu snagu. Ova metoda se može koristiti za procenu hidrofilnih i lipofilnih antioksidanasa i procenu antioksidativnog potencijala ekstrakata dobijenih upotrebom polarnih i nepolarnih organskih rastvarača (Aruoma, 2003; Santos-Sánchez i sar., 2019).

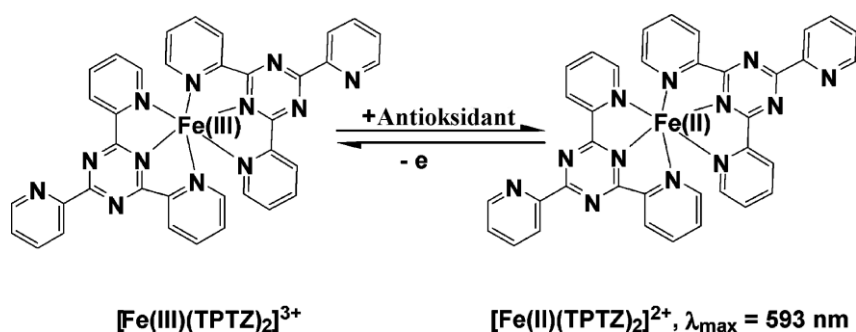
2.4.6.2. Redukciona snaga

Test redukcione snage se često koristi za procenu sposobnosti antioksidansa da donira elektron. Primenom ovog testa određuje se sposobnost ekstrakta da redukuje kompleks feri cijanida (Fe³⁺) u formu fero cijanida (Fe²⁺), menjajući tako rastvor u različite nijanse od zelene do plave, u zavisnosti od redukcione moći jedinjenja. Spektrofotometrijski se meri intenzitet nastale plave boje na 700 nm (Irshad i sar., 2012).



2.4.6.3. Sposobnost redukcije jona gvožđa - FRAP metoda

FRAP metoda se zasniva na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona (atom vodonika) u kiselom medijumu (pH 3,6) redukuje žuto obojeni Fe³⁺-TPTZ¹ kompleks u ljubičasto-plavi Fe²⁺-TPTZ² kompleks (slika 13) (Aruoma, 2003). Spektrofotometrijski se meri intenzitet nastale plave boje na 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Huang i sar., 2005).



Slika 13. Građenje kompleksa Fe²⁺-TPTZ

2.5. Pojam funkcionalne hrane

Prema definiciji koju je dao Sanders (1998), funkcionalna hrana je hrana ili sastojak hrane koji pruža zdravstvene koristi izvan zadovoljavanja tradicionalnih nutritivnih zahteva. Deo je normalne ishrane, a tokom njene proizvodnje obično se koriste četiri različita pristupa (Septoe i Town, 2011):

- 1) uklanjanje neke komponente koja može imati štetan uticaj na zdravlje potrošača;
- 2) „povećanje“ koncentracije komponente koja se prirodno nalazi u hrani, radi blagotvornih efekata;
- 3) dodavanje komponenata koje se prirodno ne nalaze u hrani, radi blagotvornih efekata;
- 4) „zamena“ neke komponente (često makronutrijent) čiji je unos često suvišan, drugom komponentom za koju se pokazalo da ima blagotvorne efekte.

Obrazloženje upotrebe funkcionalnih namirnica temelji se na prisustvu bioaktivnih jedinjenja u biljkama, uključujući antioksidativna jedinjenja. Prisustvo antioksidanasa je odlična polazna osnova za procenu da li biljka ili biljni derivat mogu imati koristi kao funkcionalna hrana. Funkcionalna hrana obogaćena biljnim sastojcima nije nova na tržištu, pošto su se biljni aditivi počeli pojavljivati u konvencionalnoj hrani, od čajeva i sokova do čipsa i energetskih pločica. Različite lekovite biljke i njihovi ekstrakti su korišćeni za jačanje i poboljšanje antioksidativnog kapaciteta sira (Abd El-Aziz i sar., 2012), želea (Skouroliaou i sar., 2009), bombona (Gramza-Michalowska i Regula, 2007), biskvita (Aksoylu i sar., 2015), hleba (Glei i sar., 2006) i proizvoda od mesa (Ryan i sar., 2009).

2.5.1. Polifenolna jedinjenja kao funkcionalni agensi u prehrambenoj industriji

Polifenolna jedinjenja su glavna klasa antioksidanasa koji se koriste u prehrambenoj industriji. Kao prirodni antioksidansi proučavani su u širokom spektru primena, među kojima je konzervisanje prehrambenih proizvoda (Caleja i sar., 2015), primena u jestivim premazima (Wang i Gao, 2013) i u filmovima koji se koriste za pakovanje hrane (López i sar., 2016). Mnoga polifenolna jedinjenja imaju sposobnost da odlože ili inhibiraju rast patogenih mikroorganizama u hrani, kao što je *Salmonella* spp. i *Escherichia Coli* (Cetin-Karaca i Newman, 2015).

Među studijama sprovedenim poslednjih godina, velika pažnja je posvećena upotrebi polifenolnih jedinjenja u mesu i mesnim proizvodima (Oswell i sar., 2018). Kao što je već pomenuto, mnogi proizvodi oksidacije su odgovorni za užeglost, smanjenu hranljivu vrednost i povećan zdravstveni rizik, zbog akumulacije toksičnih jedinjenja. Dodatak polifenolnih

jedinjenja može minimizirati stvaranje hemijskih toksina, povećavajući nutritivni status i zdravstvene prednosti ovih proizvoda, kao i njihov rok trajanja. Dokazano je da dodatak ekstrakta perikarpa ploda azijske trešnje u kuvanom ovčijem mesu efikasno usporava oksidaciju za 1,5%, bez uticaja na senzornu prihvatljivost proizvoda, kao i da primena ekstrakata iz biljaka, kao što su karanfilić i cimeta, pruža efikasnu zaštitu kvaliteta prethodno kuvane ovčetine, govedine i svinjetine. Pritom, polifenolna jedinjenja primenjenih ekstrakata nisu dovela do neželjenog ukusa i oksidativne užeglosti (Das i sar., 2016; Jayathilakan i sar., 2007).

Polifenolna jedinjenja su primenjena i za poboljšanje stabilnosti jestivih ulja koja ne sadrže prirodne antioksidanase. Polifenolna jedinjenja iz biljnih izvora (začini, začinsko bilje, čajevi, ulja, semenke, žitarice, voće i povrće) često su korišćena u brojnim jestivim uljima. Među biljkama, ruzmarin i origano su najviše proučavani izvori antioksidanasa u lipidnim sistemima (Bouloumpasi i sar., 2021; Jimenez-Alvarez, 2008; Makri, 2013). Özcan i Arslan (2011) proučavali su antioksidativne efekte eteričnih ulja iz ruzmarina, karanfilića i cimeta na ulja lešnika i maka. Među ispitivanim eteričnim uljima, ulje cimeta je bilo najefikasnije u usporavanju oksidacije sirovih ulja, a zatim ulje karanfilića i ruzmarina.

Blagotvorni efekti polifenolnih jedinjenja su proučavani i u pekarskim proizvodima. Caleja i sar. (2017) su proučavali dodatak ekstrakta komorače i kamilice u keks. Ovi ekstrakti nisu izazvali značajne promene u izgledu ili nutritivnom profilu proizvoda, ali su pokazali snažni antioksidativni potencijal, što implicira da bi upotreba ovakvih ekstrakata mogla biti važna za formiranje novih, po funkcionalnim svojstvima vrednijih peciva. Do sličnih saznanja došli su i Bhanger i sar. (2008) proučavanjem dodatka metanolnih ekstrakata pirinčanih mekinja bogatih polifenolnim jedinjenjima u kolačiće i primetili da ova jedinjenja ispoljavaju antioksidativna svojstva. Zatim, Đurović i sar. (2020) proučavali su dodatak lista i ekstrakta lista koprive u hleb i ustanovili poboljšani tehnološki kvalitet i veću funkcionalnu vrednost proizvoda zahvaljujući prisustvu biološki aktivnih supstanci, najvećim delom polifenolnih jedinjenja. Da dodatak ekstrakta lista koprive predstavlja sigurnu tehniku za razvoj moćne funkcionalne hrane (sa antidijabetičkim svojstvima) za prehrambenu, ali i farmaceutsku industriju govori i studija koju su vršili Rutakhli i sar. (2019).

Većina objavljenih studija o upotrebi prirodnih antioksidanasa ukazuje na to da ova jedinjenja pokazuju odlične rezultate u inhibiciji i kontroli oksidativnog procesa. Međutim, količina dodatih bioaktivnih jedinjenja je važan faktor u njihovoj efikasnosti, koja je ograničena, ne samo zakonodavstvom, već i senzornim prihvatanjem. Odbijanje od strane potrošača se dešava uglavnom kada su prirodni antioksidansi u obliku biljnih eteričnih ulja (npr. iz origana, ruzmarina ili lavande), koja su isparljiva i daju jak ukus. Predloženi su procesi

inkapsulacije (npr. sušenjem raspršivanjem) ili njihovo ugrađivanje u premaze i filmove da bi se prikriji jaki mirisi.

2.5.1.1. Uticaj polifenolnih jedinjenja na senzorna svojstva hrane

Polifenolna jedinjenja su usko povezana sa senzornim svojstvima (boja, ukus i oporost) sveže i prerađene biljne hrane (Tuberoso i Orrù, 2008). Flavonoli (npr., kempferol glikozidi) i katehini (npr., katehin galat) u pozitivnoj su vezi sa gorčinom, oporošću i ukusom hrane. Neki isparljivi polifenoli, kao što su vanilin i eugenol, jaki su mirisi. Zatim, gvajakol, *p*-krezol, kreozol i 2-feniletanol imaju jak miris na orhideju (*Vanilla planifolia*), dok su za „dimne“ mirise u *Tahitian vanilla* ukusu ključne komponente gvajakol, krezol, *p*-vinil gvajakol (Brunschwig i sar., 2012; Dignum i sar., 2004; Troszyńska i sar., 2011).

Senzorna aktivnost polifenolnih jedinjenja je povezana ne samo sa njihovom molekularnom strukturom, već i sa pragovima detekcije koji su specifični za svako jedinjenje. Vrednosti praga detekcije za različite polifenole zavise ne samo od medijuma u kome se polifenoli nalaze, već i od primenjene metode analize. Na primer, vrednost praga ukusa kempferola u 5% vodenom etanolu je $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, dok je u pivu skoro $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Troszyńska i sar., 2011). Ovo sugeriše da je ukupna koncentracija kempferol glikozida u uzorcima premašila granične vrednosti ukusa.

Sa senzorne tačke gledišta, polifenolna jedinjenja mogu da stupe u interakciju sa drugim komponentama i da se transformišu u brojna isparljiva jedinjenja (npr. alkoholi, aldehidi i estri) stvarajući tako poželjne ili nepoželjne senzorne karakteristike proizvoda. Enzimaska reakcija posmeđivanja katalizovana polifenoloksidazom, kao i oksidativne promene fenolnih jedinjenja su od vitalnog značaja za preradu hrane zbog stvaranja nepoželjne boje i ukusa i gubitka hranljivih materija.

2.5.1.2. Uticaj termičke obrade na polifenolna jedinjenja

Termička obrada hrane ili njenih sastojaka je važan faktor koji određuje njena funkcionalna svojstva, jer strukturni parametri koji utiču na ova svojstva mogu biti hemijski izmenjeni tokom primene toplote. Ovo može dovesti do značajnih promena u teksturi i hemijskom sastavu hrane (Mandge i sar., 2014; Medoua i Oldewage-Theron, 2014; Osman i sar., 2010).

Promene koje se javljaju u slobodnim i vezanim oblicima polifenolnih jedinjenja zavise od vrste hrane i primenjene tehnike prerade (pečenje, prženje, kuvanje, grilovanje i dr.) (Nayak i sar., 2015). Termička obrada dovodi do oslobađanja vezanih polifenolnih jedinjenja

razbijanjem ćelijskih konstituenata i ćelijskih zidova (Dewanto i sar., 2002a) i time utiče na povećanje sadržaja slobodnih polifenolnih jedinjenja (Abdel-Aal i Rabalski, 2013). Na primer, sadržaj slobodne ferulinske kiseline (najzastupljenije fenolno jedinjenje u pšenici) se u toku pečenja testa povećava za 32,4%, dok se sadržaj vezane smanjuje za 37,7% (Cheng i sar., 2006). Smatra se da ovo povećanje slobodnih fenolnih kiselina dovodi do povećanja biorasploživosti fenolnih jedinjenja, imajući u vidu da je biorasploživost vezanih fenolnih kiselina kao dominantnijih fenolnih jedinjenja u pšenici jako mala. Pored ferulinske kiseline, sadržaj siringinske, vanilinske i *p*-kumarinske kiseline ili jednostavnih fenolnih jedinjenja se takođe povećava usled razgradnje konjugovanih polifenolnih jedinjenja kao što su tanini (Cheng i sar., 2006).

Do promene u sadržaju polifenolnih jedinjenja dolazi i usled tamnjenja tokom termičke obrade. Tamnjenje izaziva povećanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja zbog disocijacije konjugovanog fenolnog dela tokom termičke obrade praćene nekom reakcijom polimerizacije i/ili oksidacije i formiranjem jedinjenja koja nisu endogena u ispitivanom materijalu. Maillardova reakcija (neenzimsko tamnjenje), karamelizacija i hemijska oksidacija polifenola takođe mogu doprineti povećanju sadržaja ukupnih polifenola (Ragaei i sar., 2014). Sa druge strane, postoje studije koje ukazuju da pečenje, kao najčešći oblik termičke obrade žitarica, smanjuje ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja u pekarskim proizvodima koji je u direktnoj vezi sa načinom obrade, dužinom trajanja i visinom temperature (Şensoy i sar., 2006), što ukazuje da radni uslovi termičke obrade u velikoj meri mogu uticati na promene polifenolnih jedinjenja.

Pored promene u sadržaju slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja, termička obrada dovodi do promene odnosa između različitih polifenolnih jedinjenja usled termičke degradacije. Vanilin i vanilinska kiselina se mogu proizvesti termičkim razlaganjem ferulinske kiseline (Peleg i sar., 1992; Van Krevelen, 1997). Kafeinska kiselina je osetljiva na toplotu i može se redukovati tokom toplotnih procesa, dok su ferulinska i *p*-kumarinska kiselina podložne termičkom raspadu (Huang i Zayas, 1991; Steinke i Paulson, 1964).

Postoje slučajevi kada termička obrada ne utiče značajno na sadržaj polifenolnih jedinjenja. Takav primer je seme boba, gde ni jedna vrsta primenjene termičke obrade (kuvanje i kuvanje na pari u trajanju od 1h) nije značajno uticala na sadržaj polifenolnih jedinjenja u ovom semenu (Duan i sar., 2021).

Na osnovu navedenih primera, zaključuje se da prerada hrane ima i pozitivne i štetne efekte na polifenolna jedinjenja u hrani u zavisnosti od biljnog matriksa i primenjene metode

obrade. Zbog toga je ključno odrediti optimalne uslove obrade koji će produžiti rok trajanja proizvoda, ali i smanjiti razgradnju bioaktivnih jedinjenja prisutnih u njima.

Pečenje je složena operacija tehnološkog procesa proizvodnje u kojoj se unutar proizvoda dešavaju brojne fizičko-hemijske i biohemijske promene. Promene se javljaju kao posledica toplote i prenosa mase (kretanje vodene pare - vazduha u pećnici, isparavanje vode unutar proizvoda i dr.). U toku pečenja, testo menja spoljni izgled i formira oblik određenih dimenzija, boju, ukus i aromatična svojstva (Marcotte, 2007).

Neposredno po ulazu testa u prostor za pečenje, toplota prodire sa svih strana i počinje isparavanje slobodne vode. Pod dejstvom toplote slobodna voda isparava skoro u celini. Isparavanje je brže ako je vazduh suv, pa se zato pre pečenja uvodi vodena para kako bi se dostigla vlažnost vrelog vazduha 60 - 70%. Kada se testo zagreje na 50 °C počinje proces dehidracije glutena i delimičnog bubrenja skroba. Struktura glutena se menja i on postaje nosilac strukture proizvoda.

Površinski slojevi delimično hidratizovanih skrobnih zrnaca se isušuju i nastaje dehidratirani skrobni gel. Istovremeno nastaju i jedinjenja termički razloženog skroba i dehidratizovani čvrsti slojevi skrobnih zrnaca.

Vitamini sadržani u sirovinama se termički razlažu, neki potpuno kao vitamin C, a neki delimično, kao vitamin A i vitamini B kompleksa. Tokom pečenja testo dobija poroznu strukturu, a kao posledica toplotnog širenja vodene pare i gasova koji nastaju, zapremina testa se povećava (Auerman, 1979; Gavrilović, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijal

3.1.1. Pšenično brašno i brašno semena koprive (*Urtica Dioica L.*)

Pšenično brašno, tipa 400, „DON DON“, Novi Beograd, Srbija, kupljeno je u lokalnoj prodavnici. Karakteriše ga sadržaj vlage od 15%, sadržaj pepela od 0,45% i stepen kiselosti 2,5.

Seme koprive (*Urtica Dioica L.*) nabavljeno je od DOO „Jeligor“, Svrlijig, Srbija. Seme koprive samleveno je električnim mlinom (Bosh, MKM 600, Nemačka) i prosejano kroz sito otvora veličine 0,4 mm. Ovako dobijeni materijal korišćen je kao brašno semena koprive u daljim analizama.

3.1.2. Hemikalije i reagensi

Azotna kiselina, trihloretilen, kalijum-hidroksid, rastvor za celulozu, hloroform i natrijum-sulfat kupljeni su od Kefo d.o.o. (Zemun, Srbija), bakar-sulfat, kalijum-sulfat, 2-propanol, *n*-heksan, kalijum jodid, jodmonobromid, aceton, sumporna kiselina, fenolftalein, natrijum-hidroksid i metanol od Baker Chemical Co. (Deventer, Holandija), hlorovodonična kiselina, etil-acetat, dietil etar, Folin-Ciocalteu reagens, antronski reagens, acetontril, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), TPTZ reagens, sirćetna kiselina, natrijum-karbonat, aluminijum hlorid, gvožđe (III) hlorid, kalijum-heksacijanoferat II, trihlorsirćetna kiselina, polivinilpolipirrolidin (PVPP), natrijum hlorid, hranljivi agar, sabouraud maltozni agar, kvercetin kupljeni su od Sigma Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Nemačka), hlorogena, galna, protokatehuinska, kafeinska, kumarinska, gentizinska, *trans*-ferulinska, taninska, elaginska, urzolinska kiselina, askorbinska kiselina, vanilinska kiselina, gentizinska kiselina, rutin, naringenin, miricetin i naringin od Sigma-Aldrich Chemical Co. (Oakville, ON, Kanada).

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje sadržaja vlage

Određena količina uzorka (3 g) stavi se na predhodno izmerenu i osušenu aluminijumsku posudu. Uzorak se zatim suši na temperaturi od 105 °C do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja i hlađenja u eksikatoru, sadržaj vlage se određuje iz razlike mase aluminijumske posude dobijene nakon sušenja i mase prazne posude, i preračuna u g/100 g suve mase uzorka.

3.2.2. Određivanje sadržaja pepela

Prazan lončić za žarenje se žari do konstantne mase, a zatim se 5 g uzorka odmeri u lončić sa tačnošću $\pm 0,0001$ g. Lončić sa uzorkom se najpre žari direktno na plameniku, a nakon toga u pećnici na 850 °C, do konstantne mase. Sadržaj pepela određuje se na osnovu razlike mase lončića dobijene nakon žarenja i mase praznog lončića, i preračuna u g/100 g suve mase uzorka.

3.2.3. Određivanje sastava pepela

3.2.3.1. Induktivno spregnuta plazma - optička emisiona spektrometrija (ICP-OES)

Da bi se odredila koncentracija makro i mikro elemenata, pripremljeni su kalibracioni standardi. Multistandard IV - multielementarni standardni rastvor („Merck“, Nemačka), koji sadrži Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl i Zn u koncentraciji od 1000 mg·kg⁻¹ korišćen je za pripremu kalibracionih rastvora. Destilovana voda, prečišćena Fisher Chemical (HPLC čistoće), korišćena je za razblaživanje standardnog rastvora, kao i za razblaživanje uzoraka. Priprema standardnih rastvora vršena je razblaživanjem multistandarda IV, tako da su koncentracije standarda za izradu kalibracionih dijagrama bile u opsegu očekivanih koncentracija ispitivanih elemenata. Nosač gasa bio je Argon 5.0 (čistoća 99,999%). U tabeli 5 prikazane su odabrane talasne dužine detekcije za svaki element u ispitivanim uzorcima, korelacioni koeficijent (R^2) i limit detekcije (LD).

Tabela 5. Parametri kalibracione prave za određivane elemente

Naziv elementa	Talasne dužine za detekciju (nm)	Korelacioni koeficijent (R^2)	Limit detekcije ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Ag	224,641	0,99993	0,39
	328,068	0,99995	
Al	167,078	0,99985	$7,6 \times 10^{-2}$
	394,401	0,99998	
B	182,641	0,99999	6,43
	249,773	0,99999	
Ba	233,527	0,99995	0,183
	190,241	0,99991	
Bi	223,061	0,99996	3,53
	183,801	0,99995	
Ca	396,847	0,99946	2,14
	214,438	0,99994	
Cd	228,616	0,99980	0,327
	283,563	0,99998	
Cr	224,700	0,99999	0,435
	324,754	0,99999	
Cu	259,941	0,99997	0,259
	325,609	1,00000	
Fe			0,118
In			4

K	404,721 766,491	0,99998 0,99999	0,378
Li	323,261 670,780	1,00000 0,99997	$5,75 \times 10^{-2}$
Mg	279,553 285,213	0,99997 0,99994	0,115
Mn	257,611	0,99992	$3,57 \times 10^{-2}$
Na	330,237 598,592	0,99994 0,99989	4,75
Ni	231,604	0,99994	0,474
Pb	220,353	0,99998	1,78
Sr	407,771	0,99998	$6,23 \times 10^{-3}$
Tl	190,864	0,99998	1,72
Zn	213,856	0,99997	$8,2 \times 10^{-2}$

3.2.3.2. Mikrotalasna digestija

Priprema uzoraka izvršena je vlažnom digestijom: 0,1 g uzorka prelije se sa 1 mL konc. azotne kiseline (Centrohem, Srbija) i ostavi 24 sata u digestoru. Pre ICP-OES analize, svi uzorci su razblaženi prečišćenom destilovanom vodom (HPLC čistoće), do zapremine 10 mL i filtrirani celuloznim filterima (0,45 μm).

3.2.3.3. Analiza uzoraka

Kvantitativna analiza uzoraka izvršena je na ICP-OES (ARCOS FHE12, SPECTRO, Nemačka), prema uputstvima proizvođača. Operativni uslovi instrumenta dati su u tabeli 6.

Tabela 6. Operativni uslovi za ICP-OES

Snaga plazme (W)	1400
Protok gasa ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	
-Coolant	13
-Auxiliary	0,80
Tip nebulajzera	Cross flow
Protok nebulajzera ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,95
Brzina pumpe	30
Stabilizaciono vreme (s)	0
Broj proba za svako merenje	3
Pravac posmatranja plazme	aksijalni

3.2.4. Određivanje sadržaja sirovih vlakana (po Scharrer-Kirshner-u)

Odmeri se 1 g uzorka, prenese u tikvicu i doda 25 mL rastvora za celulozu. Tikvica se spoji sa povratnim hladnjakom i sadržaj kuva 30 minuta. Za vreme kuvanja tikvicu promućkati kako bi se skinuli delići sa zidova. Nakon kuvanja, rastvor se filtrira dok je još vruć kroz stakleni lončić za filtriranje (1G-3) koji je predhodno osušen i izmeren. Lončić se najpre ispere vrućim reagensom, zatim vrućom vodom i na kraju etanolom, a zatim suši na 105 - 110 °C do konstantne mase. Nakon sušenja, lončić se hladi i meri masa lončića. Razlika u masi lončića nakon sušenja i praznog lončića daje sadržaj sirovih vlakana zajedno sa inkrustiranim mineralnim materijama u izmerenoj količini ispitivanog uzorka (Trajković i sar., 1983).

3.2.5. Određivanje sadržaja proteina

Sadržaj proteina određen je prema standardnom Kjeldahlovom postupku (AOAC, 1995). Odmeri se 100 mg ispitivanog uzorka, stavi u tikvicu po Kjeldahl-u i doda 10 mL koncentrovane H₂SO₄ i određena količina smeše katalizatora (10 g CuSO₄·5H₂O + 33,3 g K₂SO₄). Nakon toga, vrši se „spaljivanje“ proteina sve dok rastvor ne postane potpuno bistar. Po završetku „spaljivanja“ tikvica se montira na aparaturu za određivanje azota po Kjeldahl-u (Trajković i sar., 1983).

U erlenmajer se stavi 30 mL 0,01 mol dm⁻³ H₂SO₄ uz dodatak par kapi fenolftaleina kao indikatora. Zatim se u levak sipa 10 mL 50% NaOH. Dodavanje baze se vrši oprezno i kada se doda zadnja kap slavina se naglo zatvori. Dodavanjem baze oslobađa se amonijak. Erlenmajer se lagano zagreva na plameniku preko azbestne mrežice, tako da tečnost u tikvici lagano ključa. Destilacija traje oko 20 minuta, a gasoviti amonijak koji se stvara, apsorbuje se u erlenmajeru u kome se nalazi rastvor borne kiseline. Nakon završene destilacije erlenmajer se skinje sa aparature i sadržaj titriše sa 0,02 mol dm⁻³ NaOH do promene boje indikatora u ružičastu.

$$\%N = \frac{(aF_1 - bF_2) \times 0,28 \times 100}{P}$$

gde je:

a – mL 0,01 mol dm⁻³ H₂SO₄,

b – mL 0,02 mol dm⁻³ NaOH,

P – odvaga uzorka u mg,

F₁ – faktor molarne koncentracije H₂SO₄,

F₂ – faktor molarne koncentracije NaOH.

$$\text{Sadržaj proteina (\%)} = \%N \times 5,7 (\%)$$

3.2.6. Određivanje sadržaja skroba i rastvorljivih šećera

Ekstrakcija rastvorljivih šećera i skroba izvršena je prema postupku koji su predložili Nerling i sar. (2018). 100 mg uzorka je ekstrahovano dva puta sa 4 mL 80% metanola na 60 °C tokom 7 minuta. Supernatanti su sakupljeni nakon centrifugiranja na 7000g tokom 10 minuta i korišćeni za određivanje sadržaja rastvorljivih šećera.

Posle ekstrakcije šećera, vrši se digestija tako što se ostatak resuspenduje sa 20 mL 0,4 M H₂SO₄ i kuva 2 sata. Nakon digestije, uzorak se centrifugira na 17000g tokom 15 minuta i supernatant se koristi za određivanje skroba.

Sadržaj rastvorljivih šećera i sadržaj skroba određen je antron kolorimetrijskim testom koristeći glukozu kao standard, prema postupku Yemm i Willis (1954). U 1 mL razblaženog uzorka dodato je 5 mL antronskog reagensa. Smeša je ostavljena da stoji 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu. ApSORBANCA je očitana na 620 nm, a sadržaj izražen u gramima na 100 g uzorka.

3.2.7. Ekstrakcija lipida i određivanje sadržaja lipida

Soxhlet ekstrakcija: Odmeri se 20 g uzorka i stavi u balon u kome se doda 200 mL odgovarajućeg rastvarača (trihloretilen). Balon se stavi na *Soxhlet* aparaturu za ekstrakciju i počne sa zagrevanjem koje traje 4 časa. Sadržaj iz balona se nakon hlađenja filtrira, izmeri zapremina filtrata, a filtrat upari na vakuum uparivaču (IKA-WERKE, Staufen, Nemačka) do uljanog ostatka. Iz ekstrahovane količine lipida odmerava se određena količina za određivanje sadržaja lipida semena koprive i finalnih proizvoda.

Refluks ekstrakcija: Odmeri se 20 g uzorka (seme koprive, finalni proizvodi) i stavi u balon u kome se doda 200 mL trihloretilena. Balon se stavi na aparaturu za ekstrakciju uz refluks i počne sa zagrevanjem. Od momenta ključanja ekstrakcija se nastavlja još 30 minuta. Sadržaj iz balona se nakon hlađenja filtrira, izmeri zapremina filtrata, a filtrat upari na vakuum uparivaču (IKA-WERKE, Staufen, Nemačka) do uljanog ostatka i čuva na +4 °C za dalju analizu.

Za određivanje sadržaja lipida, uzima se 2 g ekstrahovanog lipida *Soxhlet* ekstrakcijom, i stavi u predhodno osušenu i izmerenu aluminijumsku posudu. Uzorak se zatim suši na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Sadržaj lipida određuje se na osnovu razlike mase aluminijumske posude dobijene nakon sušenja i mase prazne posude, i preračuna u gramima na 100 g uzorka.

3.2.8. Određivanje sastava masnih kiselina lipida

3.2.8.1. Dobijanje metil-estara masnih kiselina

Metil-estri masnih kiselina dobijeni su korišćenjem modifikovanog konvencionalnog postupka metilovanja koji je prethodno opisan od strane Liu (1994): 2 g ekstrahovanog lipida odmeri se u balon od 100 mL, doda 50 mL bezvodnog metanola i 1 mL 1 M KOH u metanolu. Uz povratni hladnjak i mešanje na magnetnoj mešalici, sadržaj ključa u trajanju od 10 minuta. Nakon toga, mešanje se prekida, sadržaju se doda 30 mL vode (preko hladnjaka) i podese pH na 5-6 dodavanjem hlorovodonične kiseline (HCl, 1:3). Sadržaj se prenese u levak za odvajanje, balon ispere smešom koja sadrži 20 mL vode i 20 mL hloroforma i sipa u levak za odvajanje. Sadržaj se promeša pri čemu se metil-estri izdvajaju u donjoj hloroformskoj fazi.

Nakon izdvajanja, hloroformska faza se ispira dva puta sa po 10 mL vode, a hloroformski rastvor metil-estra masnih kiselina osuši preko bezvodnog Na₂SO₄. U slučaju pojave emulzije, emulzija se propusti kroz bezvodni Na₂SO₄ (10 g) i hloroformski ekstrakt ispira sa još 10 mL vode i ponovo propušta kroz bezvodni Na₂SO₄. Nakon toga, rastvarač otpari na vakuum uparivaču (IKA-WERKE, Staufen, Nemačka) na temperaturi od 30 do 40 °C i uzorak suši u sušnici (ELVAK, sušilnik, Slovenija) na 40 °C u toku 15 minuta. Ovako pripremljeni metil-estri se dalje analiziraju gasnom hromatografijom u cilju određivanja njihovog sastava.

3.2.8.2. Gasnohromatografska analiza

Gasnohromatografska analiza sastava metil-estara uljanog ostatka realizovana je korišćenjem Hewlett-Packard 6890 N gasnog hromatografa opremljenog kapilarnom kolonom HP-5MS (5% fenilmetilsiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm, Agilent Technologies, USA) i detektorom 5975B iste kompanije.

Kao noseći gas korišćen je helijum, pri konstantnom protoku od 1 mL·min⁻¹. Temperaturni uslovi bili su sledeći: radna temperatura injektora je 250 °C, dok je temperatura kolone programirana tako da je početna temperatura bila 150 °C, nakon čega je brzinom zagrevanja od 5 °C·min⁻¹ povećana do 340 °C i održavana na toj temperaturi narednih 10 minuta.

Uljani ostatak je rastvoren u dietil-etru. Zapremina injektiranja uzorka bila je 1 μL, dok je „split“ režim bio sledeći: u prvih 0,5 min, protok je bio 1,5 mL·min⁻¹, a zatim 1,0 mL·min⁻¹, „split“ odnos 40:1. Masne kiseline se identifikovane poređenjem retencionih vremena komponenata sa standardima, a procentualni sastav uljanog ostatka dobijen je na osnovu površine GC pika bez korekcije (Stojanović i sar., 2011).

3.2.9. Određivanje sastava acilglicerola HPLC metodom

Za HPLC analizu acilglicerola ulja semena koprive korišćena je modifikovana HPLC metoda autora Holčapek i sar. (1999). Aparatura se sastoji od hromatografa, opremljenog degaserom, binarnom pumpom, kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,4 m x 150 mm x 5 µm) i UV/VIS detektorom. Brzina proticanja binarne smeše rastvarača (metanol, rastvarač A i 2-propanol/n-heksan u zapreminskom odnosu 5:4, rastvarač B) je 1 mL·min⁻¹ sa linearnim gradijentom (od 100% A do 40% A + 60% B za 15 minuta). Temperatura kolone se održava konstantnom na 40 °C. Komponente se detektuju na 205 nm. Uzorci reakcione smeše se rastvaraju u smeši 2-propanol/n-heksan, 5:4 v/v i filtriraju kroz Millipore filtere prečnika 0,45µm.

Monoacilgliceroli (MAG), diacilgliceroli (DAG) i triacilgliceroli (TAG) su identifikovani poređenjem vremena zadržavanja lipidnih komponenti sa onim kod standarda. Njihov sadržaj je određen merenjem površine pika od 3,445 do 4,580 min za MAG, površine pika od 5,276 do 8,677 min za DAG i površine pika od 10,907 do 15,815 min za TAG. Određivanja su ponovljena tri puta, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija, i izraženi kao g komponente u 100 g lipida.

3.2.10. Hemijska karakterizacija lipida

3.2.10.1. Kiselinski broj

U erlenmajer od 150-200 mL izmeri se 1 g lipida i doda 30 mL smeše etiletra i etanola u odnosu 1:1, koja je predhodno neutralisana 0,1 M rastvorom NaOH uz fenolftalein (smeša alkohol-etar mora se predhodno neutralisati, jer etar može da reaguje kiselo, te bi se jedan deo baze utrošio na neutralizaciju kiselina iz etra). Sadržaj se mućka do potpunog rastvaranja lipida. Ako se pri tome lipidi ne rastvore, dodaje se u erlenmajer još smeše alkohol-etar. Zatim se doda 5 kapi fenolftaleina i titriše 0,1 M rastvorom NaOH do slabo ružičaste boje, koja ne isčezava ni posle 1 minut. Ako pri titraciji sadržaj erlenmajera postane mutan, doda se 5 do 10 mL smeše alkohol-etar, dok se sadržaj ne izbistri i slabo zagreva uz povratni hladnjak. Posle hlađenja nastavlja se titracija (Trajković i dr., 1983).

Izračunavanje:

$$Kb = \frac{A \cdot 5,61}{Ok}$$

gde je:

A - zapremina 0,1 M rastvora NaOH,

Ok - odmerena količina uzorka (g).

1 mL 0,1 M NaOH ekvivalentan je 5,61 mg KOH.

Količina slobodnih masnih kiselina može se izraziti i kao *kiselinski stepen* ili „*stepen kiselosti*“ koji označava broj cm³ 1 M rastvora jednokisele baze potrebne za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina u 100 g lipida.

Izračunavanje:

$$Kb = \frac{A \cdot 100}{Ok \cdot 10}$$

Sadržaj slobodnih masnih kiselina se izražava u procentima oleinske kiseline gde je 1 cm³ M rastvora jednokisele baze ekvivalentan 0,2823 g oleinske kiseline.

3.2.10.2. Saponifikacioni broj

U erlenmajer od 150 - 200 mL izmeri se 2 g lipida i doda 25 mL 0,5 M alkoholnog rasvora KOH. Saponifikacija se vrši zagrevanjem uz povratni hladnjak na vodenom kupatilu u trajanju 30 - 60 minuta od momenta ključanja, uz često mućkanje, dok reakciona smeša ne postane sasvim bistra. Posle završene saponifikacije, u još vruć rastvor doda se nekoliko kapi 1%-nog rastvora fenolftaleina i višak kalijum-hidroksida odmah titriše 0,5 M rastvorom HCl do nestanka crvene boje. Istovremeno se uradi i slepa proba pod istim uslovima. Razlika između mL 0,5 M rastvora HCl utrošenih za titraciju slepe probe i glavne probe, pokazuje koliko je 0,5 M rasvora KOH utrošeno za saponifikaciju ulja (Trajković i dr., 1983). Izražava se u mg KOH/g uzorka ulja ili masti.

Izračunavanje:

$$\text{Saponifikacioni broj} = \frac{(A - B) \cdot 28,1}{Ok}$$

gde je:

A - zapremina 0,5 M rastvora HCl utrošenih za slepu probu, B - zapremina 0,5 M rastvora HCl utrošenih za glavnu probu, Ok - odmerena količina uzorka (g).

1 mL 0,1 M rastvora HCl ekvivalentan je 28,1 mg KOH.

3.2.10.3. Jodni broj

Odmerena količina ulja od 0,5 g stavi se u erlenmajer sa brušenim čepom od 300 - 500 mL. Ulje se zatim rastvori u 15 mL hloroforma, doda pipetom sa najvećom pažnjom 25 mL rastvora jodomonobromida, promeša i ostavi 30 minuta na tamnom mestu.

Zatim se doda 15 mL 10 %-tnog rastvora KJ i 150 mL sveže prokuvane i ohlađene vode, kojom se ispere eventualno izdvojeni jod na zapušaču, promeša se i titriše uz neprestano mešanje sa 0,1 M rastvorom Na₂S₂O₃. Zatim se doda nekoliko kapi rastvora skroba i titriše oprezno do nestanka plave boje rastvora. Pri kraju titracije treba posle svakog dodatka rastvora natrijum-tiosulfata dobro promućkati, da jod koji zaostaje rastvoren u hloroformu pređe u rastvor kalijum jodida. Istovremeno se uradi slepa proba sa istom količinom reagensa, samo bez ulja. Naročito treba obratiti pažnju da količina rastvora jodomonobromida bude potpuno ista u glavnoj i slepoj probi, te se meri istom pipetom i prazni u oba slučaja na isti način (Trajković i sar., 1983). Izražava se u gramima joda koji može da se veže za dvostruke veze prisutne u 100 grama ulja ili masti.

Izračunavanje:

$$\text{Jodni broj} = \frac{(A - B) \times 0,0127 \times 100}{Ok}$$

gde je:

A - zapremina 0,1 M rastvora Na₂S₂O₃ utrošenih za slepu probu,

B - zapremina 0,1 M rastvora Na₂S₂O₃ utrošenih za glavnu probu,

Ok - odmerena količina uzorka (g).

1 mL 0,1 M rastvora joda ekvivalentan je 0.00127 g joda.

3.2.10.4. Estarski broj

Estarski broj se određuje računskim putem iz poznatih vrednosti saponifikacionog i kiselinskog broja (Trajković i sar., 1983):

$$\text{Estarski broj} = \text{saponifikacioni broj} - \text{kiselinski broj}$$

Izražava se u mg KOH/g uzorka ulja ili masti.

3.2.11. Određivanje termooksidativne stabilnosti ulja

3.2.11.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termički efekti uzoraka ulja praćeni su na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru TA Instruments, Q20, USA (software TA Universal Analysis, Srbija), u atmosferi vazduha. Pre rada i merenja, uređaj je kalibrisan indijumom. Uzorci ulja od 3,0 mg izmereni su u zatvorenim aluminijumskim posudama. Kao referentni materijal korišćena je prazna aluminijumska posuda (Micić i sar., 2015).

U ne-izotermnom DSC režimu, uzorci ulja su zagrevani na tri različite brzine zagrevanja, β_i (5, 10, 20 °C·min⁻¹), počevši od 40 °C do početka procesa oksidacije.

Metoda izokonverzije Kissinger–Akahira–Sunose (KAS) korišćena je za izračunavanje kinetičkih parametara: energije aktivacije (E_a) i pred-eksponencijalnog faktora (A) za početnu temperaturu, T_{on} . Korišćena je sledeća jednačina:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{on,i}^2}\right) = a \times \left(\frac{1}{T_{on,i}}\right) + b \quad (1)$$

gde je β_i brzina zagrevanja (K·min⁻¹) i $T_{on,i}$ početna temperatura (K). Indeks i označava pojedinačnu brzinu zagrevanja. Iz zavisnosti $\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{on,i}^2}\right)$ vs. $\left(\frac{1}{T_{on,i}}\right)$ dobija se nagib a i presek, na osnovu kojih se određuje energija aktivacije i pred-eksponencijalni faktor prema:

$$a = \frac{-E_{a,on}}{R} \quad (2)$$

$$b = \ln\left(\frac{RA'_{on}}{E_{a,on}}\right) \quad (3)$$

gde su a i b nagib i presek iz jednačine (1), redom, R je univerzalna gasna konstanta (8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹), a $A'_{on} = A_{on}/g(\alpha) \times g(\alpha)$, $g(\alpha)$ je integralni oblik reakcionog modela, a α je stepen konverzije. Pošto je $\alpha = \text{const}$ za početak, $g(\alpha)$ je takođe konstantno. Dakle, energija aktivacije se izračunava iz:

$$E_{a,on} = -R \frac{d\ln(\beta_i/T_{on,i}^2)}{d(1/T_{on,i})} \quad (4)$$

Vrednosti E_a i A mogu se koristiti za izračunavanje konstante brzine reakcije Arrheniusovom jednačinom:

$$k = A \times \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (5)$$

U izotermnom DSC režimu, ulje je analizirano na tri različite temperature, T_i (90, 100 i 120 °C). Za proračun energije aktivacije korišćena je integralna izokonverzivna metoda za izotermne uslove:

$$\ln t_{\alpha,i} = \ln\left(\frac{g(\alpha)}{A_\alpha}\right) + \frac{E_{a,\alpha}}{RT_i} \quad (6)$$

gde je $t_{\alpha,i}$ vreme za dostizanje datog stepena konverzije (α) na različitim temperaturama T_i (K), $g(\alpha)$ je integralni oblik reakcionog modela ($g(\alpha) = \text{const}$, $\alpha = \text{const}$), $E_{a,\alpha}$ i A_α su energija aktivacije i pred-eksponencijalni faktor pri datom stepenu konverzije.

Za OIT, jednačina (6) može se napisati kao:

$$\ln k_{OIT,i} = \ln A'_{OIT} - \frac{E_{a,OIT}}{RT_i} \quad (7)$$

gde je $k_{OIT} = 1/OIT$, a A'_{OIT} je proporcionalno A_{OIT} . Energija aktivacije i pred-eksponencijalni faktor određeni su iz nagiba i preseka, redom, krivih generisanih regresijom $\ln k_{OIT,i}$ vs. $1/T_i$ korišćenjem linearne regresije najmanjih kvadrata.

3.2.12. Dobijanje hidrofilne i lipofilne frakcije ulja

Razdvajanje ulja na hidrofilnu (HF) i lipofilnu frakciju (LF) vršeno je prema proceduri koju su opisali Seiquer i sar. (2015). U 0,5 g dobijenog ulja doda se 5 mL kisele smeše metanol/voda (50:50 v/v, pH 2) i mućka na vorteksu oko 60 minuta. Nakon toga, vrši se centrifugiranje smeše na 5000 obrtaja/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant (metanolna faza sa polarnim jedinjenjima) se nakon centrifugiranja izdvaja, a uljanom ostatku dodaje 5 mL smeše aceton/voda (70:30, v/v). Postupak se ponovi dva puta, supernatanti spoje i koriste za dalju analizu kao hidrofilna frakcija (HF), dok uljani ostatak predstavlja lipofilnu frakciju (LF) ulja.

3.2.13. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja

3.2.13.1. Ekstrakcija slobodnih polifenolnih jedinjenja

Ekstrakcija slobodnih polifenolnih jedinjenja postignuta je primenom odgovarajućih monokomponentnih sistema rastvarača (voda, etanol i metanol) i njihovih smeša (70% v/v smeša voda:etanol i 70% v/v smeša voda:metanol), u odnosu 1:10 w/v. Ekstrakcija je vršena na sobnoj temperaturi tokom 24 sata, uz povremeno mešanje. Filtracijom su odvojeni filtrati od ostataka koji se ponovo tretirani rastvaračem (50 mL), na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta. Nakon ponovne filtracije, filtrati su kombinovani i napravljena je konačna zapremina ekstrakta upotrebom odgovarajućeg rastvarača. Za određivanje kapaciteta neutralisanja DPPH radikala i redukcionog snage, ekstrakti su uparavani na vakuum uparivaču do suvog ostatka na 40 °C, a zatim suvi ostaci rastvarani u metanol i napravljena razblaženja u opsegu od 1:1 do 1:10 (v/v). Za određivanje sastava polifenolnih jedinjenja uzoraka primenom HPLC metode, korišćeni su ekstrakti dobijeni 70% smešom voda:metanol. Ekstrakti su filtrirani kroz Millipore filter od 0,45 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

3.2.13.2. Ekstrakcija vezanih polifenolnih jedinjenja

Ostatak dobijen nakon ekstrakcije slobodnih polifenola i sušenja na sobnoj temperaturi tokom 24 sata, korišćen je kao uzorak za ekstrakciju vezanih polifenola primenom metode

opisane od strane Verma i sar. (2009). Uzorku (10 g) se doda destilovana voda (150 mL) i 6M NaOH (50 mL) i ostavi 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon stajanja, pH smeše podesi se na 2 pomoću 5M HCl, doda smeša dietil etra i etil acetata u odnosu 1:1 (v/v) (250 mL) i ostavi da stoji 3 sata uz povremeno mešanje. Zatim se ekstrakt dekantuje, upari do suva na vakuum uparivaču, a suvi ostatak rastvori u rastvor metanola. U cilju dobijanja različite koncentracije ekstrakta, napravljena su razblaženja u istom opsegu kao u slučaju ekstrakta slobodnih polifenola.

3.2.13.3. Određivanje sadržaja suvog ostatka ekstrakta

Ekstrakt slobodnih i vezanih polifenola (2 mL) ulije se u aluminijsku posudu i suši na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Sadržaj suvog ostatka se određuje na osnovu razlike mase aluminijske posude dobijene nakon sušenja i mase prazne aluminijske posude i izražava u mg suvog ostatka po mL ekstrakta.

3.2.13.4. Određivanje ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja

Ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja hidrofилne frakcije ulja i ekstrakata određen je spektrofotometrijskom metodom primenom Folin-Ciocalteu reagensa (Singleton i Rossi, 1965). Reakciona smeša priprema se tako što se u uzorak ekstrakta (0,5 mL) dodaje destilovana voda (4,5 mL) i Folin-Ciocalteu reagens (0,5 mL). Ovako pripremljena reakciona smeša stoji 5 minuta na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Nakon toga, dodaje se 7,5% Na₂CO₃ (5 mL) i inkubira 90 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se meri apsorbancija na 765 nm. Kao slepa proba koristi se smeša u kojoj se umesto ekstrakta dodaje 0,5 mL metanola.

Radi izrade kalibracione prave (slika P₁ u prilogu), ceo postupak se ponavlja sa različitim koncentracijama rastvora galne kiseline u opsegu 30-300 µg·mL⁻¹, a rezultat izrazi u µg ekvivalenta galne kiseline po g ulja ± standardna devijacija (mg EGK/g ± SD), odnosno µg ekvivalenta galne kiseline po g suvog biljnog materijala/proizvoda.

3.2.14. Određivanje antioksidativnog potencijala

3.2.14.1. Određivanje kapaciteta neutralisanja DPPH radikala

DPPH hidrofилne frakcije ulja i ekstrakata određen je postupkom koji su opisali Mensor i sar. (2001): 2,5 mL rastvora ekstrakta u različitim koncentracijama pomeša se sa 1 mL rastvora DPPH radikala u metanolu ($C = 3 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³), ostavi da se inkubira 20 min na sobnoj temperaturi, a zatim meri apsorbancija na 517 nm. Kao slepa proba koristi se metanol.

Antioksidativni potencijal određen primenom ove metode izražava se preko RSC vrednosti (kapacitet “hvatanja/neutralisanja” radikala ili *Radical Scavenging Capacity*), koja se izračunava primenom jednačine:

$$\text{RSC (\%)} = 100 - \left[(A_U - A_B) \times \frac{100}{A_K} \right]$$

gde je:

A_U - apsorbanca „uzorka“ na 517 nm („uzorak“- inkubirana smeša DPPH radikala i ekstrakta/hidrofilne frakcije),

A_B - apsorbanca „blank-a“ na 517 nm („blank“- ekstrakt u metanolu, razblažen na sledeći način: 2,5 mL ekstrakta/hidrofilne frakcije date koncentracije + 1 mL metanola),

A_K - apsorbanca „kontrole“ na 517 nm („kontrola“- metanolni rastvor DPPH radikala (razblažen u odnosu 1 mL DPPH radikala koncentracije + 2,5 mL metanola).

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala ispitivanih uzoraka poređen je sa kapacitetom neutralisanja butil-hidroksi anizola (BHA) kao standarda (slika P₂ u prilogu), a rezultati izraženi kao EC₅₀ vrednost u mg suvog ostatka po mL ekstrakta/hidrofilne frakcije ulja.

DPPH ekstrakata *lipofilne frakcije i nefrakcionisanog* ulja određen je istom metodom, s tim što je umesto metanola korišćen etil-acetat za rastvaranje ulja i DPPH radikala. Ulje je rastvoreno u etil-acetatu u odnosu 1:4 v/v, a merenje apsorbance je vršeno na 517 nm. U ovom slučaju, **A_U** predstavlja apsorbanca „uzorka“ na 517 nm („uzorak“ – 2,5 mL etil-acetatnog rastvora ulja/LF tretiranog rastvorom DPPH radikala rastvorenog u etil-acetatu), **A_B** apsorbanca „blank-a“ na 517 nm („blank“- ulje/LF u etil-acetatu date koncentracije, razblaženo na sledeći način: 2,5 mL ulja/LF + 1 mL etil-acetata) i **A_K** apsorbanca „kontrole“ na 517 nm („kontrola“- etil-acetatni rastvor DPPH radikala, razblažen u odnosu 1 mL DPPH radikala koncentracije 0,3 mM + 2,5 mL etil-acetata).

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala ispitivanih uzoraka nefrakcionisanog ulja i njegove lipofilne frakcije poređen je sa kapacitetom neutralisanja tokoferola kao standarda, a rezultati izraženi kao EC₅₀ vrednost u mg uljanog ostatka po mL ulja/LF (slika P₄ u prilogu).

3.2.14.2. *Određivanje redukcione snage*

Redukciona snaga određena je prema proceduri koju je opisao Oyaizu (1986). Određena količina uzorka (2,5 mL) različite koncentracije (0,5 - 5 mg·mL⁻¹) pomeša se sa 0,2 M fosfatnim puferom (2,5 mL) i 1% kalijum-fericijanidom (2,5 mL). Smeša se inkubira na 50 °C tokom 20 minuta. Nakon završene inkubacije dodaje se 10% trihlorsirćetna kiselina (2,5 mL) i smeša centrifugira 10 minuta pri 3000 obrt min⁻¹. Nakon centrifugiranja, supernatant (2,5 mL) se

pomeša sa redestilovanom vodom (2,5 mL) i 0,1% FeCl₃ (0,5 mL) i apsorbancu meri na 700 nm. Analogna ispitivanja izvršena su rastvorom butil hidroski-anizola kao standarda (slika P₃ u prilogu), koncentracije 4 do 40 µg·mL⁻¹, a rezultati izraženi kao EC₅₀ vrednost u mg·mL⁻¹.

3.2.14.3. *Određivanje sposobnosti redukcije jona gvožđa (FRAP metoda)*

Sposobnost redukcije jona gvožđa određena je metodom po Benzie i Strain (1996) sa određenim modifikacijama: 0,2 mL ekstrakta je pomešano sa 6 mL FRAP reagensa i podvrgnuto vibracijama izazvanim vorteksom. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C na vodenom kupatilu, apsorbancu je izmerena na 593 nm. Slepa proba se priprema sa odgovarajućim rastvaračem (0,2 mL) i FRAP reagensom (6 mL). FRAP reagens se priprema mešanjem acetatnog pufera (300 mmol·L⁻¹, pH=3,6) sa TPTZ reagensom (10 mmol·L⁻¹ u 40 mmol·L⁻¹ HCl) i 20 mmol·L⁻¹ FeCl₃·6H₂O, u odnosu 10:1:1.

U cilju određivanja FRAP vrednosti, 0,2 mL standardnog rastvora FeSO₄·7H₂O koncentracije 0 - 350 µg·mL⁻¹ pomešano je sa 6 mL FRAP reagensa, i postupak je ponovljen kao u slučaju ekstrakta. Kalibraciona prava konstruisana je na osnovu vrednosti apsorbanci i ispitivanih koncentracija rastvora FeSO₄·7H₂O i određena njena jednačina ($C_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 1,6\text{Ab} + 14,6 \times 10^{-3}$, mmol Fe²⁺ L⁻¹). FRAP vrednost ispitivanih ekstrakata dobijena je na osnovu vrednosti apsorbanci ispitivanih ekstrakata i jednačine kalibracione prave (slika P₅ i P₆ u prilogu), izražena kao µg FeSO₄·7H₂O po mL ekstrakta, a zatim preračunata u mmol FeSO₄·7H₂O po L ekstrakta. Analogna ispitivanja izvršena su i sa rastvorom BHA kao standarda, koncentracije 0 - 40 µg·mL⁻¹.

3.2.15. *Određivanje antimikrobne aktivnosti polifenolnih jedinjenja*

3.2.15.1. *Disk-difuzionna metoda*

Antimikrobna aktivnost je analizirana korišćenjem devet bakterijskih sojeva: *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 i jednog gljivičnog soja *Candida albicans* ATCC 10259. Hranljivi agar (Torlak, Beograd, Srbija) korišćen je kao medijum za rast bakterija, a Sabouraud maltozni agar (Torlak, Beograd, Srbija) za rast gljivica. Medijumi su sterilisani 15 minuta u autoklavu na 121 °C i pod pritiskom od 101 kPa, a antimikrobna aktivnost je određena disk-difuzionom metodom (Veličković i sar., 2014). Da bi se postigao broj ćelija od 1×10⁸ CFU·mL⁻¹, inokulumi sojeva su pripremljeni suspendovanjem kulture u sterilnom 0,8% rastvoru NaCl i podešavanjem vrednosti

zamućenosti od 0,5 McFarland standarda. Zasejavanje inokuluma vršeno je nanošenjem suspenzija na površinu očvrslih agar ploča. Papirni diskovi (prečnika 6 mm) impregnirani su sa 30 µL uzorka i stavljeni na inokuliranu površinu agara. Inkubacija je vršena na 37 °C tokom 24 sata za sojeve bakterija i na 28 °C tokom 48 sati za sojeve gljivica. Antimikrobna aktivnost je određena merenjem prečnika zone inhibicije.

3.2.16. Određivanje sastava polifenolnih jedinjenja

Kvantitativni i kvalitativni sastav pojedinih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima određen je na HPLC uređaju (Agilent 1100 Series HPLC), primenom metode Amakura i sar. (2000). Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,4 m × 150 mm × 5 µm). Temperatura kolone bila je 40 °C. Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvora kalijum-dihidrogenfosfata (5 mM, pH 2,5) i acetonitrila, 41:9 v/v. Protok faza bio je 1 mL·min⁻¹, zapremina injektiranja 30 µL, a talasna dužina detekcije 280 nm. Na UV/VIS detektoru zabeleženi su hromatogrami, a polifenolne komponente prisutne u uzorcima identifikovane su poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svako fenolno jedinjenje.

Za svako jedinjenje (hlorogena, galna, protokatehuinska, kafeinska, kumarinska, gentizinska, *trans*-ferulinska, taninska, elaginska, urzolinska kiselina, rutin, naringenin, mirecitin, kvercetin i naringin), pojedinačno pripremljena je serija rastvora koncentracije 50-300 µg·mL⁻¹ i konstruisana kalibraciona prava kao zavisnost površine pika od koncentracije standarda (slike P₇-P₁₆ u prilogu). Sadržaj pojedinih fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima dobijen je proračunom na osnovu površine pika uzorka i jednačine linearne zavisnosti standardnih rastvora.

3.2.17. Određivanje morfoloških karakteristika semena koprive i proizvoda

3.2.17.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM analiza)

Morfološke karakteristike uzoraka dobijene su na skenirajućem elektronskom mikroskopu tipa JEOL JSM-6610LV (JEOL, Japan), u uslovima visokog vakuuma. Uzorci su osušeni na vazduhu i postavljeni na aluminijumske nosače pomoću duplo lepljive ugljenične trake. Radi neophodne provodljivosti, uzorci su napareni zlatom na naparivaču tipa BALTEC-SCD-005 (BAL-TEK, SCD 005 Sputter Coater). Debljina naparenog sloja je 15 nm.

Snimci uzoraka dobijeni su pomoću detektora za povratno-rasute (*backscattered*) elektrone (BSE) i detektora za sekundarne elektrone (SE) pri naponskom ubrzanju elektrona od 20 kV. Kao izvor elektrona korišćeno je volframsko vlakno.

3.2.18. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom (FTIR)

Snimanja su vršena na Nicolet™ iS™ 10 FTIR spektrometru (Thermo Fisher SCIENTIFIC) sa Smart iTR™ prigušenom ukupnom refleksijom (Attenuated Total Reflectance - ATR), u oblasti talasnih brojeva 500 - 4000 cm^{-1} sa 32 skeniranja po spektru.

3.2.19. Priprema proizvoda od pšeničnog brašna, mešavine pšeničnog brašna i brašna semena koprive i mešavine pšeničnog brašna i ekstrakta semena koprive

Da bi se dobio *proizvod sa dodatkom semena koprive* (PSK), pomešano je 350 g pšeničnog brašna, 150 g brašna od semena koprive, 5 g praška za pecivo, 50 g margarina, 150 g šećera i 200 mL vode. Zames je rađen ručno. Dobijeno testo se razvlači i oblikuje u forme diskova (4,5 cm u prečniku i 1 cm visine), pri čemu je polovina testanih diskova sušena na 30 °C tokom 4 sata, mlevena i prosejana kroz sito od 0,40 mm da bi se dobio uzorak pre termičke obrade. Druga polovina testanih diskova je pečena u rerni (Candy FPP403 Plan Light Fan Oven, Brugherio, Italija) na 180 °C tokom 0, 10, 20 i 25 minuta, ohlađena na sobnoj temperaturi, mlevena i prosejana kroz sito od 0,40 mm, za ispitivanje uticaja termičke obrade. Uzorci testanih diskova pre pečenja (0 min) su najpre osušeni na sobnoj temperaturi do sadržaja vlage od $15 \pm 0,8\%$, a zatim samleveni. Proizvod dobijen nakon 25 minuta pečenja korišćen je kao finalni proizvod.

Proizvod sa ekstraktom semena koprive (PEK) pripremljen je po istom receptu, s tom razlikom što je umesto brašna koprive korišćeno pšenično brašno, a umesto vode ekstrakt semena koprive. Uzorak pre i posle termičke obrade dobijen je na isti način kao i proizvod sa dodatkom semena koprive.

Kontrolni proizvod (PPB) dobijen je po istom receptu kao i proizvod sa ekstraktom semena koprive, s tom razlikom što je umesto ekstrakta semena koprive korišćena voda, a uzorak pre i posle termičke obrade dobijen je kao u prethodnom slučaju.

3.2.20. Određivanje tehnološkog kvaliteta proizvoda i gubitka mase tokom termičke obrade

3.2.20.1. Gubitak mase tokom termičke obrade

Gubitak mase određen je iz razlike mase uzorka proizvoda pre pečenja i mase uzorka nakon određenog vremenskog intervala pečenja (nakon 5, 10, 20 i 25 minuta). Razlika u masi uzoraka pre i posle određenog vremena pečenja predstavlja gubitak mase.

3.2.20.2. Određivanje odnosa d/h

Odnos prosečne vrednosti prečnika i prosečne vrednosti visine proizvoda (d/h) predstavlja „širenje“ proizvoda (keksa) koji karakteriše njegov oblik, a i senzorsku prihvatljivost (Mudgil i sar., 2017).

3.2.20.3. Određivanje zapremine

Za određivanje zapremine uzima se po jedan keks od svakog uzorka. Seme prosa sipa se u odgovarajuću posudu do vrha, a ispod posude stavi podmetač. Nakon pečenja ohlađeni proizvod stavi se na vrh posude i utisne u posudu sa semenom. Zapremina istisnutog semena prosa koja je proporcionalna zapremini proizvoda, meri se menzurom (Sivam i sar., 2011).

3.2.20.4. Senzorna analiza proizvoda

3.2.20.4.1. Određivanje boje proizvoda

Boja proizvoda je određena upotrebom hromometra MINOLTA, Chroma Meter CR-00 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) sa D-65 osvetljenjem, 2° standardnim uglom posmatranja i 8-mm otvorom u glavi merenja. Rezultati su izraženi kao svetloća (L^*), udeo crvene boje (a^*) i žute boje (b^*), prema CIE $L^*a^*b^*$ sistemu (CIE, 1976). Boja proizvoda je izmerena na površini svakog uzorka proizvoda. Merenje boje je izvršeno u 5 ponavljanja.

3.2.20.4.2. Određivanje senzorskih karakteristika proizvoda metodom bodovanja

Senzorska ocena proizvoda metodom bodovanja sprovedena je 24 sata nakon pečenja od strane sedmočlanog panela iskusnih ocenjivača za ovu grupu proizvoda. Pre sprovođenja senzorske ocene određena su reprezentativna senzorska svojstva proizvoda koja se uzimaju kao faktor kvaliteta. Za svaki od faktora kvaliteta pripisan je odgovarajući broj bodova i na taj način bio je precizno definisan (Tabela 7) (Pajin, 2009; Sikora i sar., 2007). Od strane panelista definisani su i faktori značajnosti (FZ) za svaki faktor kvaliteta, čiji zbir je iznosio 5. Dodeljeni bodovi faktoru kvaliteta množili su se sa faktorima značajnosti po sledećem ključu: FZ = 1,0 za izgled (oblik, homogenost i površina); FZ = 1,2 za strukturu, čvrstoću, prhkost; FZ = 1,0 za žvakljivost; FZ = 0,6 za miris i FZ = 1,2 za ukus. Srednje vrednosti ocene svakog svojstva, pomnožena sa faktorom značajnosti, služile su za dobijanje krajnje ocene proizvoda, koja je izražena kao kvalitetni broj (KB), koji se izračunava po sledećoj formuli:

$$KB = X_i \times FZ/10$$

gde je:

X_i - srednja srednja vrednost ocene senzorskog svojstva od strane panela

FZ-faktor značajnosti za svako ispitivano svojstvo

Tabela 7. Senzorske karakteristike i faktori značajnosti proizvoda sa dodatkom semena koprive i ekstrakta od semena koprive

Senzorske karakteristike	Ocena	Faktor značajnosti	Opis ocenjivanih karakteristika
IZGLED Oblik, homogenost, površina	5	1,0	Odgovarajući oblik, bez oštećenja; gornja površina blago ispucala, sa blagim neravninama; na gornjoj i donjoj površini vidljivi sastojci testa (čestice od mlevenog semena koprive); donja površina ujednačene boje.
	4		Neznatna deformacija oblika sa blago neujednačenom visinom; gornja površina blago gruba i ispucala; na gornjoj i donjoj površini vidljivi sastojci testa (čestice od mlevenog semena koprive); donja površina ujednačene boje.
	3		Slabo deformisan oblik; gornja površina vrlo gruba i ispucala; na gornjoj i donjoj površini vidljivi sastojci testa (čestice od mlevenog semena koprive); donja površina slabije ili jače pečena.
	2		Deformisan oblik, neujednačena visina proizvoda; gornja i donja površina izrazito ispucale, nedovoljno ili previše pečene.
	1		Potpuno deformisan oblik, izrazito oštećene ivice; neujednačena boja gornje i donje površine.
TEKSTURA Struktura, čvrstoća, prhkost	5	1,2	Blago slojevita i ujednačena struktura sa gustim neujednačenim ovalnim šupljinicama; suve teksture i svojstvene čvrstoće; slabo neravan, krt prelom; na prelomu vidljivi sastojci (čestice od mlevenog semena koprive).
	4		Blago neujednačena slojevita struktura sa gustim i neujednačenim šupljinicama; suve teksture i svojstvene čvrstoće; neravan, krt prelom sa vidljivim sastojcima (čestice od mlevenog semena koprive).
	3		Struktura zbijena, previše gusta i čvsta, grublje teksture; grub i mrvljiv prelom.
	2		Veoma zbijena struktura ili razdvojeni slojevi; gruba tekstura; tvrd prelom.
	1		Veoma zbijena i gusta struktura ili razdvojeni slojevi, izrazito grube teksture; tvrd prelom.
TEKSTURA Žvkljivost	5	1,0	Čvrst, suv, odgovarajuće žvkljivosti, neznatno grebe nepce i sporo omekšava u ustima.
	4		Čvrst, suv, odgovarajuće žvkljivosti, grebe nepce i sporo omekšava u ustima.
	3		Previše čvrst, osrednje žvkljivosti, grebe nepce, veoma sporo omekšava u ustima.

	2		Previše čvrst, teže se žvaće, grebe nepce, veoma sporo omekšava u ustima.
	1		Tvrd, žilav, veoma grebe nepce, ne omekšava u dužem periodu u ustima.
MIRIS	5	0,6	Svojstven miris na masnu komponentu, zaokružen, aromatičanna sastojke (seme koprive), stalan tokom dužeg vremena.
	4		Blago izražen miris, svojstven na masnu komponentu, zaokružen, aromatičan na sastojke (seme koprive), stalan tokom dužeg vremena.
	3		Izražen miris na masnu komponentu, slabo aromatičan na sastojke (seme korive), stalan tokom dužeg vremena.
	2		Veoma izražen miris na masnu komponentu, veoma slabo aromatičan na sastojke (seme koprive), primese stranog mirisa.
	1		Prisustvo stranog mirisa, neprijatan miris.
UKUS	5	1,2	Svojstven ukus na masnu komponentu, zaokružen, aromatičan na sastojke (seme koprive), stalan tokom dužegvremena.
	4		Blago izražen ukus, svojstven na masnu komponentu, zaokružen, aromatičan na sastojke (seme koprive), stalan tokom dužeg vremena.
	3		Veoma izražen ukus na masnu komponentu, veoma slabo aromatičan na sastojke (seme koprive).
	2		Veoma izražen ukus na masnu komponentu, veoma slabo aromatičan na sastojke (seme koprive), primese stranog mirisa.
	1		Prisustvo stranog ukusa, neprijatan ukus.

Kvalitetne kategorije proizvoda sa aspekta sensorike utvrđene su na osnovu raspona bodova (Tabela 8). Svi uzorci bili su označeni slučajno odabranim trocifrenim brojevima, što je obezbedilo identifikaciju i sledljivost rezultata ocenjivanja i istovremeno izbegavanje eventualne pristrasnosti i spoznaje identiteta uzoraka od strane ocenjivača. Uzorci su dostavljani u isto vreme, istim redosledom i dinamikom, kako bi se izbegli neželjeni psihološki efekti. Uzorci proizvoda su ocenjeni u sedam ponavljanja.

Tabela 8. Kvalitativne kategorije proizvoda sa dodatkom semena i ekstrakta semena koprive

Raspon bodova	Kategorija kvaliteta
< 2,5 boda	Nezadovoljavajući senzorski kvalitet
2,5 do 3,5	Dobar senzorski kvalitet
3,5 do 4,5	Vrlo dobar senzorski kvalitet
4,5 do 5,0	Odličan senzorski kvalitet

3.2.20.4.3. Određivanje teksturnih karakteristika proizvoda

Teksturane karakteristike proizvoda određene su primenom analizatora teksture TA-XT2 Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, Great Britain), korišćenjem nastavka sa tri

tačke savijanja (3-Point Bending Rig, HDP/3PB). Navedeni nastavak koristi se za merenje čvrstoće i lomljivosti proizvoda.

Čvrstoća je određena kao maksimalna postignuta sila prilikom loma uzorka i izražena je u g. Lomljivost je određena kao rastojanje u trenutku loma uzorka, odnosno otpor koji uzorak pruža sili savijanja i izražena je u mm. Lomljivost izražena na ovaj način pokazuje da ukoliko se uzorak lomi na maloj razdaljini kategorizuje se kao lomljiviji. Parametri podešavanja instrumenta tokom testa su bili sledeći: modul – merenje sile tokom kompresije; brzina pre testa – $1,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$; brzina tokom testa – $3,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$; brzina nakon testa – $10,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$; rastojanje – 5,0 mm; sila okidanja – 50 g. Merenje teksture je izvršeno u 15 ponavljanja.

3.2.20.5. Energetska vrednost

Energetska (hranljiva) vrednost hrane je količina energije koju hrana oslobodi u metaboličkom procesu. Prema svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), jedinica za energetska vrednost je kilodžul (kJ), ali se može izraziti i u kalorijama (cal) ili kilokalorijama (kcal).

$$1000 \text{ cal} = 1 \text{ kcal} = 4,18 \text{ kJ}$$

Energetska (hranljiva) vrednost semena koprive dobijena je na osnovu hemijskog sastava semena i energetske vrednosti pojedinačnih nutrijenata. Energetska vrednost nutrijenata važnih za seme koprive je prikazana u tabeli 9.

Tabela 9. Energetska vrednost nutrijenata

Nutrijent	Energetska vrednost (kJ·g ⁻¹)
Ugljeni hidrati	17,17
Proteini	17,17
Masti	38,94
Alkohol	29
Organske kiseline	13

Proračun energetske vrednosti semena koprive vrši se na bazi 100g semena i prema formuli:

$$EV \text{ (kJ/100 g)} = (\%SUH + \%SP) \times 17,17 + (\%SM) \times 38,94 + (\%ALK) \times 29 + (\%OK) \times 13$$

gde je:

EV – energetska vrednost, **SUH** – sadržaj ugljenih hidrata, **SP** – sadržaj proteina, **SM** – sadržaj masti, **ALK** – sadržaj alkohola, **OK** – sadržaj organske kiseline.

3.2.21. Statistička obrada podataka

Eksperimenti su realizovani u tri ponavljanja, a rezultati prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Analitički podaci podvrgnuti su analizi varijanse (ANOVA) za poređenje srednjih vrednosti, a značajne razlike izračunate su prema post-hoc Tukey-evom HSD (“honestly significant differences”) testu na $p < 0,05$, nivo pouzdanosti 95%. Studentov t-test (Student's t-test) primenjen je za poređenje srednjih vrednosti između dve grupe podataka. Statistička analiza izvršena je korišćenjem OriginPro Version 6 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA) softvera, Excel i softvera JMP Statistical Discovery v10.0. Linearna regresija najmanjih kvadrata izvršena je u Excel-u, a analiza podataka DSC termograma u TA Universal Analysis softveru.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Karakterizacija semena koprive

4.1.1. Hemijski sastav semena koprive

Da bi neka biljka mogla da se koristi kao prehrambena sirovina, neophodno je poznavati njen sastav koji je povezan sa njenom prehrambenom vrednošću. Prehrambeni proizvodi moraju imati određenu prehrambenu vrednost da bi mogli da zadovolje određene fiziološke potrebe ljudi. Poznavanje hemijskog sastava semena koprive je važno kako bi se potencijalno moglo koristiti kao komponenta funkcionalne hrane. S tim u vezi, ispitan je sastav semena koprive, a rezultati prikazani u tabeli 10.

Sadržaj vlage u semenu koprive iznosio je 8,15% i u okviru je preporučenog sadržaja vlage (<14%) za bezbedno skladištenje, minimalan rast mikroba i hemijsko propadanje, što je indikacija dužeg roka trajanja (Zarroug i sar., 2021).

Tabela 10. Hemijski sastav i energetska vrednost semena koprive

Komponente semena	Sadržaj (g/100g semena)*
Proteini	22,45±0,4
Lipidi	20,1±1,02
Ugljeni hidrati	36,19±0,23
Skrob	10,3±0,33
Rastvorljivi šećeri	3,12±0,11
Vlakna	7,92±0,18
Pepeo	13,06±0,42
Vlaga	8,15±0,09
Energetska vrednost:	
(kJ/100 g)	1740,58
(kcal/100 g)**	416,01

Ukupni ugljeni hidrati = 100 - (%proteina + %lipida + %pepela + %vlage)

**srednja vrednost ± standardna devijacija za broj replikacije n=3*

***Faktor konverzije J u cal, 4,184*

Evidentno je da najveći udeo hemijskog sastava semena koprive čine ugljeni hidrati, pri čemu skrob zauzima veći procenat u odnosu na ostale ispitane komponente ugljenih hidrata kao što su rastvorljivi šećeri i celulozna vlakna. Manji sadržaj ugljenih hidrata pronađen je u semenu koprive poreklom iz Turske (Sari, 2016). Prema ovom istraživanju, sadržaj ugljenih hidrata iznosio je 22,07%, što je 1,6 puta manje u odnosu na rezultat našeg istraživanja. U poređenju sa sadržajem drugih delova koprive uočeno je da je sadržaj ugljenih hidrata dobijen u našem istraživanju približno jednak vrednosti sadržaja u listu koprive poreklom iz Nepala koji je iznosio 37,4% (Adhikari i sar., 2016). Veći sadržaj ugljenih hidrata za 30,9% pronađen je u listu koprive poreklom iz Irana (Pradhan i sar., 2015). Suprotno ovim rezultatima, autori Rutto

i sar. (2013) izveštavaju da je sadržaj ugljenih hidrata u listu koprive znatno niži (7,1%), što je 5,14 puta manje u odnosu na sadržaj koji je dobijen u ovom radu.

U poređenju sa običnim žitaricama, sadržaj ugljenih hidrata dobijen u ovom radu je bio manji, oko dva puta u slučaju pšeničnog i ječmenog brašna (Adhikari i sar., 2016). To pokazuje da je seme koprive mnogo manje glikemično u poređenju sa konvencionalnim izvorima biljne hrane kao što su žitarice.

Proteini takođe čine značajan udeo u ukupnom hemijskom sastavu semena koprive sa sadržajem od 22,45%. Jafari i sar. (2020) su u svojoj studiji vršili poređenje sadržaja proteina u semenu koprive roda *U. dioica* i *U. pilulifera*, poreklom iz Irana. Rezultati ove studije pokazuju da je sadržaj proteina iznosio 21,8% i 22% u semenu *U. dioica* i *U. pilulifera*, redom. Ovo ukazuje da su naši rezultati u saglasnosti sa njihovim istraživanjima, dok je nešto veći sadržaj (24%) detektovan u semenu koprive poreklom iz Turske (Sari, 2016). Studije o drugim delovima koprive pokazuju da je veći procenat proteina pronađen u listu koprive i iznosio je 33,8% (Adhikari i sar., 2016) i 33,6% (Rutto i sar., 2013). Evidentne razlike u hemijskom sastavu se u ovom slučaju mogu pripisati različitim delovima iste biljne vrste. Ovu činjenicu potvrđuju istraživanja sprovedena od strane Rafajlovska i sar. (2013), koja pokazuju veće količine proteina u listovima nego u stabljikama i korenu. Sadržaj proteina u listovima se kretao od 16,08 do 26,89%, u zavisnosti od izvora uzorka, dok je najveći sadržaj proteina u stabljici i korenu bio 14,54% i 10,89%, redom. U poređenju sa običnim žitaricama kao izvorom proteina, seme koprive sadrži 2,2 i 1,9 puta veću količinu proteina od pšeničnog i ječmenog brašna, redom (Adhikari i sar., 2016). Uzimajući u obzir viši nivo proteina u koprivi, očekuje se da će ova vrsta obezbediti veće koncentracije esencijalnih aminokiselina. Dokazano je da kopriva ima bolji aminokiselinski profil u odnosu na mnoge druge vrste lisnatih biljaka (Rutto i sar., 2013), sadrži visoke količine svih esencijalnih aminokiselina, a posebno leucina i lizina.

Pored ugljenih hidrata i proteina, rezultati ukazuju na to da je seme koprive bogat izvor lipida. U ovom radu, sadržaj lipida određen je primenom *Soxhlet* ekstrakcije sa trihloretilenom kao rastvaračem, a dobijeni rezultat je bio 20,1%. Prema istraživanjima sprovedenim od strane Sari (2016), seme koprive poreklom iz Turske sadrži 31% lipida koji su u ovom istraživanju ekstrahovani *Soxhlet* ekstrakcijom i primenom etra kao rastvarača. Isti rezultati su postignuti i u istraživanju koje su vršili Uluata i Özdemir (2012), gde je sadržaj lipida nakon *Soxhlet* ekstrakcije *n*-heksanom iz semena koprive (poreklom iz Turske) bio 30,68%, što je za oko 50% više u odnosu na rezultat našeg istraživanja. Sa druge strane, istraživanja o sadržaju lipida u listu koprive ukazuju na manji sadržaj lipida i to: Adhikari i sar. (2016) i Pradhan i sar. (2015) navode da je u listu koprive sadržaj lipida ekstrahovanog *Soxhlet* ekstrakcijom sa heksanom i

etrom, redom, iznosio 3,55% i 5,2%. Ovo pokazuje da je seme koprive u odnosu na list bogatije lipidima od 3,8 do 5,6 puta. U poređenju sa pšeničnim (1,68%) i ječmenim (1,73%) brašnom, seme koprive sadrži značajno veću količinu lipida (Adhikari i sar., 2016).

Sadržaj vlakana dobijen u našem radu u saglasnosti je sa istraživanjima sprovedenim od strane Sari (2016), prema kojima seme koprive sadrži 8,01% vlakana. Mnogo veći sadržaj dobijen je u semenu koprive roda *U. dioica* i *U. pilulifera* poreklom iz Irana (Jafari i sar., 2020). Prema ovom istraživanju, sadržaj vlakana bio je 30,24% za seme roda *U. dioica* i 29,37% za rod *U. pilulifera*. Istraživanja drugih delova biljke pokazuju da je sadržaj vlakana u listu koprive iznosio 9,01% (Adhikari i sar., 2016). Suprotno ovim istraživanjima, autori Rutto i sar. (2013) navode da je sadržaj vlakana u listu koprive 6,4%, što je u odnosu na seme niže za 19,19%. Sa druge strane, pšenično i ječmeno brašno sadrže znatno niži sadržaj vlakana, 0,65 i 1,03%, redom (Adhikari i sar., 2016).

Sadržaj pepela takođe zauzima značajan udeo u ukupnom hemijskom sastavu semena koprive. U poređenju sa rezultatima Sari (2016), seme koprive analizirano u ovom radu imalo je skoro dva puta manji sadržaj pepela. Studije o sadržaju pepela pšeničnog (0,6%) i ječmenog (3,6%) brašna ukazuju na znatno niži sadržaj u poređenju sa našim rezultatima (Adhikari i sar., 2016).

Na osnovu priloženih podataka se može zaključiti da u semenu koprive dominiraju ugljeni hidrati, proteini i lipidi, čiji se sadržaj kreće iznad 20%. Literaturni podaci drugih vrsta semena, kao što je seme kima (Srinivasan, 2018) i seme čie (Marineli i sar., 2014), takođe ukazuju na to da su proteini, lipidi i ugljeni hidrati u semenu prisutni u količini većoj od 20%. Prema ovim istraživanjima, seme kima sadrži 26,7% proteina, 28,5% lipida i 24,9% ugljenih hidrata, dok se u semenu čie proteini, lipidi i ugljeni hidrati nalaze u količini od 25,32, 30,22 i 34,57%, redom.

Zbog genetskih faktora, hemijski sastav semena uveliko varira među vrstama i među sortama (Copeland i McDonald, 1999). Varijacije u hemijskom sastavu među semenima iste vrste mogu se pripisati različitom geografskom poreklu semena, uticaju različitih ekoloških i kulturnih praksi, a i različitoj tehnici izolovanja pojedinih komponenti hemijskog sastava semena. Takođe, razlike mogu biti vezane za momenat ubiranja biljnog materijala.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da bi upotreba semena koprive u dobijanju prehrambenih proizvoda (npr. pekarskih) na bazi pšenice i ječma potencijalno mogla povećati sadržaj proteina, pepela, vlakana i lipida.

4.1.2. Mineralni sastav semena koprive

Mineralne materije su takođe važno obeležje prehrambene vrednosti semena koprive. U ovom radu, analizirani minerali su podeljeni u tri grupe: esencijalni (glavni) minerali (Ca, Mg, Na, K, P), esencijalni u tragovima (Fe, Cu, Zn, Mn, Cr) i neesencijalni minerali (B, Li, Sr, Si, In). Sadržaj minerala određen je ICP-OES metodom, a rezultati prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Sadržaj mineralnih materija (esencijalnih minerala, esencijalnih u tragovima i neesencijalnih minerala) u semenu koprive

Sadržaj (mg/100g)	
Esencijalni (glavni) minerali	
Ca	2706,03±3,96
Mg	181,66±3,01
Na	20,63±5,76
K	358,77±3,17
P	403,99±3,72
Esencijalni u tragovima	
Fe	13,9±0,84
Cu	0,63±0,06
Zn	1,77±0,05
Mn	0,57±0,04
Cr	0,01±0,001
Neesencijalni minerali	
B	0,57±0,01
Li	1,23±0,12
Sr	15,25±0,77
Si	12,79±1,19
In	0,24±0,04

Dobijeni rezultati pokazuju da najveći udeo minerala u semenu koprive čine esencijalni (glavni) minerali čiji sastav opada u nizu Ca>P>K>Mg>Na. Veći sadržaj kalcijuma u odnosu na druge esencijalne minerale u koprivi je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima (Rutto i sar., 2013; Shonte i sar., 2020). Literaturni podaci pokazuju da se sadržaj kalcijuma izražen u odnosu na suhu masu kretao 0,13 – 5,09% u listovima, 0,76 – 1,42% u stabljikama i 0,61 – 0,92% u korenu koprive (Kregiel i sar., 2018; Pradhan i sar., 2015; Rutto i sar., 2013; Rafajlovska i sar., 2013; Sultan i sar., 2009; Sekeroglu i sar., 2006). Ovi podaci ukazuju da je sadržaj kalcijuma u semenu koprive u proseku veći za oko tri puta od njegovog sadržaja u stabljici i korenu koprive. U odnosu na list, dobijeni sadržaj kalcijuma u našoj studiji je bio približno jednak sadržaju u listu koprive poreklom iz Srbije, koji je iznosio 2,8% (Đurović i sar., 2017).

Fosfor, kalijum i magnezijum takođe čine značajan procenat u ukupnom sadržaju minerala semena koprive. Fosfor sa sadržajem od 0,4% ukazuje da je seme koprive 1,3 puta bogatije ovim mineralom u odnosu na koren čiji je sadržaj 389 mg/100g suve mase, a 1,5 puta siromašnije u odnosu na list koprive čiji je sadržaj 626,4 mg/100g suve mase (Mihaljev i sar., 2014). Isti autori navode da je sadržaj kalijuma u korenu i listu koprive znatno veći u odnosu na seme. Kao i kod fosfora, seme koprive je bolji izvor magnezijuma u odnosu na koren.

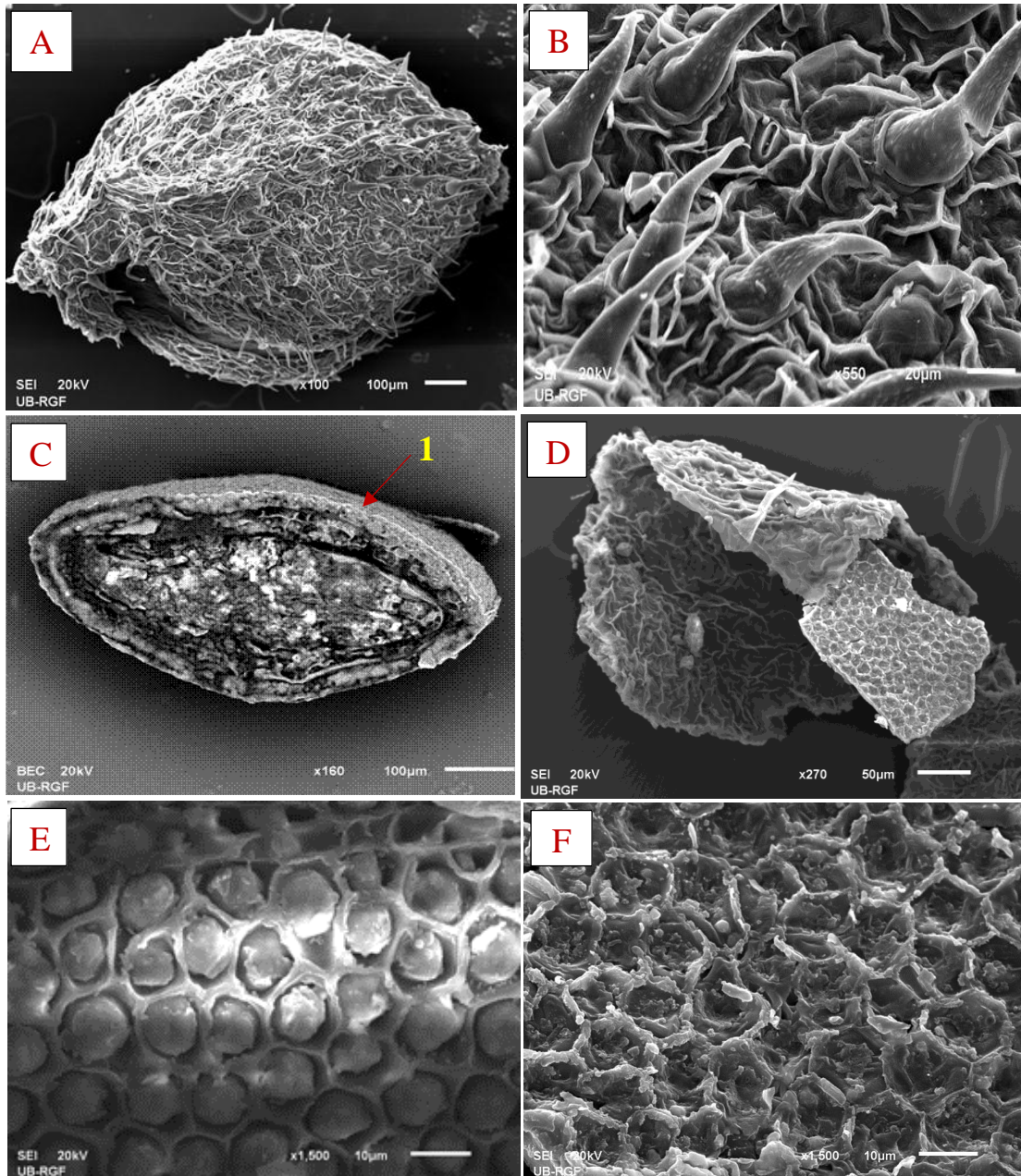
Od esencijalnih minerala u tragovima, u semenu koprive je identifikovano pet (Fe, Cu, Zn, Mn, Cr). Iz tabele 11, vidi se da je sadržaj gvožđa značajno veći u odnosu na druge prisutne elemente u tragovima. Dominacija gvožđa među elementima u tragovima u koprivi je takođe ranije potvrđena za druge delove koprive (Dayu, 2012; Kara, 2009; Tack i Verloo, 1996). Studije pokazuju da je sadržaj gvožđa u listu koprive određen od strane Đurovića i sar. (2017) 15 mg/100 g suve mase, što je približno vrednostima našeg istraživanja. Nešto manji sadržaj (8,1 mg i 10,9 mg u 100 g suve mase) pronađen je u listu koprive poreklom iz Indije i USA, redom (Pradhan i sar., 2015; Rutto i sar., 2013). Sadržaj od 32,40 mg/100g suve mase pronađen je u studiji Chakravartula i sar. (2021), ukazujući na 12 puta veći sadržaj gvožđa u listu nego u semenu koprive.

Varijacija sadržaja elemenata je u korelaciji sa karakteristikama zemljišta (pH vrednost, kapacitet izmene katjona, tekstura zemljišta, sadržaj organskog ugljenika, itd.) (Tack i Verloo, 1996), ali se ne isključuje mogućnost i drugih faktora koji mogu uticati na nivo minerala u različitim delovima koprive (seme, list, stabljika, koren), kao što su poreklo i starost zasada, pedološke karakteristike zemljišta i primena agrotehničkih mera.

Zahvaljujući prisustvu kalcijuma, kalijuma, silicijuma i gvožđa, seme koprive može imati remineralizujuće dejstvo. Bilo bi korisno kod osteoartritisa i osteoporoze. Visok sadržaj kalijuma pokazatelj je zaštitne moći semena koprive protiv kardiovaskularnih bolesti. Sadržaj gvožđa koje je neophodno za hemoglobin, mioglobin, citohrome i neke enzime, čini da je kopriva preporučljiva za lečenje anemije (Radojković i sar., 2014). Unos magnezijuma smanjuje učestalost svih oblika stresa i ima bitnu ulogu u velikom broju biohemijskih i fizioloških procesa u organizmu (omogućava normalno funkcionisanje mišića i nervnog sistema i normalan rad srca) (Shils, 1999), dok cink ima protivupalno dejstvo i učestvuje u ekspresiji gena. Osim toga, cink i mangan čine suštinski deo nekoliko tipova enzima, kao što su hidrolaze, peptidaze i oksidaze. Sa druge strane, bakar ima značajnu ulogu u procesu prenosa elektrona u oksidazama u obliku hem-bakar oksidaza tipa III i proteina plavog bakra tipa I (Roat-Malone, 2007).

4.1.3. Morfološke karakteristike semena koprive

Za proučavanje morfoloških karakteristika semena koprive korišćena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM), a rezultati mikrografije celog semena koprive i njegovih delova prikazani su na slici 14.

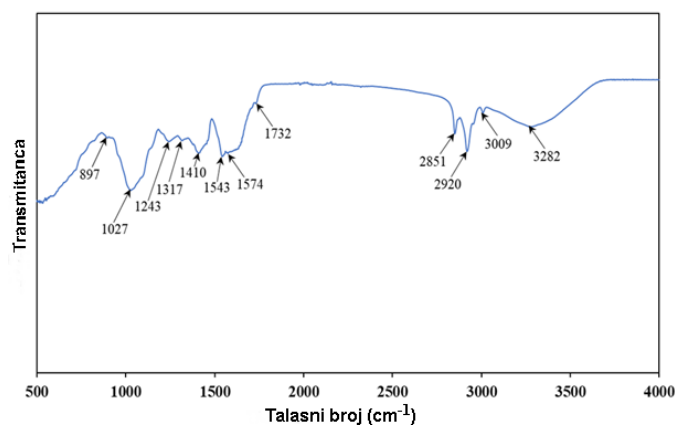


Slika 14. SEM analiza semena koprive. A: Celo seme (100µm, X100), B: Voštane materije po površini trihoma (20µm, X550), C: Poprečni presek semena (100µm, X160), D: komadić semenjače (50µm, X270), E: poligonalne ćelije semenjače (10µm, X1500), F: endosperm (10µm, X1600)

Seme koprive je dužine 1,083 mm i širine 0,791 mm, ovalnog je oblika sa šiljastim vrhom. Seme je obavijeno omotačem (semenjača) na čijoj površini se uočavaju trihome (bodljice na fotografiji A) dužine od 68,96 do 89,65 μm i širine od 20,69 do 24,83 μm . Na površini trihoma uočavaju se voštane materije (kapljice) veličine 5,52-8,27 μm (fotografija B). Semenjača ili semenski omotač (oznaka 1 na fotografiji C) debljine je oko 8,33 μm . Semenjača je izgrađena od poligonalnih ćelija sa nestrukturiranim centralnim poljima (fotografija E) koje su veličine u prečniku 12,73-15,15 μm , a debljine zida oko 1,21 μm . Na fotografiji D prikazan je komadić semenjače (nakon mlevenja semena koprive) na kome se vidi lice i naličje semenjače. Ispod semenjače nalazi se endosperm koji predstavlja parenhimsko tkivo ispunjeno hranljivim materijama (fotografija F).

4.1.4. Infracrvena spektroskopija Fourier-ove transformacije (FTIR)

FTIR spektar semena koprive je prikazan na slici 15, a opseg apsorpcije koji odgovara karakterističnim vezama predstavljen je u tabeli 12. Na slici se vidi da se na širokoj traci spektra uočavaju vibracije različitog intenziteta koje su rezultat karakterističnih veza. Široka traka na 3620–3000 cm^{-1} , sa maksimumom na oko 3280 cm^{-1} , tipična je za vibracije –OH grupa fenola i alkohola. Ove grupe se javljaju u strukturi celuloze, hemiceluloze i lignina (Maslowski i sar., 2021). Pikovi koji se javljaju u opsegu apsorpcije 3100–2800 cm^{-1} odnose se na asimetrične i simetrične vibracije istezanja metilnih i metilenskih grupa. Iz karakteristične C=O vibracije u opsegu apsorpcije 1730–1690 cm^{-1} , zabeležene su grupe estera i aldehida. Pikovi koji se javljaju pri apsorpciji 1750–1500 cm^{-1} odnose se na amine, alkene i aril grupe. Karakteristični pikovi u opsegu 1200–1060 cm^{-1} bili su tipični za vibracije C–O, C–C, C–O–C grupa koje se odnose na aksijalnu deformaciju, asimetrične i simetrične vibracije istezanja estera i etra. Najveća apsorpcija primećena je na 1027 cm^{-1} i u vezi je sa asimetričnim rastezanjem fosfata (Maslowski i sar., 2021).



Slika 15. ATR-FTIR spektar semena koprive

Na osnovu rezultata analize infracrvene spektroskopije semena koprive, donosi se zaključak da je biljka sastavljena uglavnom od lignoceluloznog materijala (materijal koji se sastoji od lignina, hemiceluloze i celuloze). O tome svedoče registrovane karakteristične trake apsorpcije za grupe koje se javljaju u ovoj vrsti materijala.

Tabela 12. Karakteristične veze FTIR spektra analiziranog semena koprive

Grupe	Tip vibracije	Opseg apsorpcije (cm ⁻¹)
O-H	istezanje	3760
O-H fenola i alkohola	istezanje	3650–3200
C-H vinil i akril	istezanje	3100–3010
C-H alifatične	istezanje	2970–2800
C=O	istezanje	1730–1690
C=N	istezanje	1750–1500
C=C alkeni	istezanje	1680–1610
C=C aril	istezanje	1600–1500
C-C alifatične	istezanje	1500–600
C=C aromatične	skeletne vibracije	1441
C-H alifatične	deformacija	1370–1340
C-N	istezanje	1360–1180
C-O, C-C, -C-O-C-	asimetrično i simetrično istezanje	1280–1150
C-O-C	aksijalna deformacija	1060
C-H vinil	deformacija	995–675
C-H aril	istezanje prstena glukoze/deformacija van ravni	900–690

4.2. Hemijska karakterizacija ulja semena koprive

4.2.1. Sastav masnih kiselina ulja semena koprive

Poznavanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava masnih kiselina je od izuzetnog značaja kako bi se na pravi način procenila nutritivna vrednost i stabilnost ulja. U ovom radu, primenom GC metode određen je kvantitativni sastav masnih kiselina ulja semena koprive, dobijeni rezultati predstavljeni u tabeli 13, a GC hromatogram ulja prikazan na slici P₁₇ u prilogu.

Tabela 13. Sastav masnih kiselina ulja semena koprive

Masne kiseline	RT*	Ulje (g/100g ulja)
Palmitinska kiselina (C16:0)	39,45	1,14±0,11
Linolna kiselina (C18:2)	43,36	86,05±0,96
Oleinska kiselina (c9-C18:1)	43,48	12,03±0,19
Miristinska kiselina (C14:0)	43,61	0,69±0,03
Stearinska kiselina (C18:0)	44,06	0,09±0,02

*RT – retenciono vreme

Među zasićenim masnim kiselinama identifikovanim u ulju semena koprive, nalaze se palmitinska (16:0), miristinska (C14:0) i stearinska kiselina (18:0). Prisustvo palmitinske i stearinske kiseline je takođe identifikovano u ulju semena koprive poreklom iz Španije, ali u znatno većoj količini: sadržaj palmitinske kiseline iznosio je 25,4%, što je čak 22,2 puta više u odnosu na rezultat našeg istraživanja; sadržaj stearinske kiseline je takođe bio veći za 25,5 puta u poređenju sa našim rezultatima (Guil-Guerrero i sar., 2003). Miristinska kiselina je identifikovana u ulju semena koprive poreklom iz Bugarske, ali u znatno manjoj količini, 0,1% (Petkova et al. 2020).

Od mononezasićenih masnih kiselina identifikovana je oleinska kiselina (c9-C18:1) u znatno većem sadržaju od zasićenih, 12,03%. Dva i po puta niži sadržaj oleinske kiseline (4,8%) kvantifikovan je u ulju semena koprive od strane Guil-Guerrero i sar. (2003), dok su istraživanja autora Kan i sar. (2009) pokazala veći sadržaj oleinske kiseline za 2,9 puta. Prisustvo oleinske kiseline kao najzastupljenije mononezasićene masne kiseline u ulju semena koprive je u skladu sa istraživanjima koju su vršili autori Kan i sar. (2009) i Celenk i sar. (2018).

Od polinezasićenih masnih kiselina kvantifikovana je samo linolna kiselina koje je bila i nazastupljenija od identifikovanih masnih kiselina, sa sadržajem od 86,05%. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Sharma (1995), prema kojima je sadržaj linolne kiseline iznosio 86,49%. Drugi literaturni podaci takođe potvrđuju naše nalaze da je linolna kiselina najzastupljenija polinezasićena masna kiselina u ulju semena koprive. Prema ovim podacima, sadržaj linolne kiseline u ulju semena koprive bio je niži i iznosio 66,62% (Celenk i sar., 2018) i 44,29% (Kan i sar., 2009). Značajno manji sadržaj linolne kiseline pronađen je u ulju semena koprive poreklom iz Turske, a iznosio je 22,7% (Guil-Guerrero i sar., 2003).

Kao što je i očekivano, sastav masnih kiselina je značajno varirao između uzoraka, što se uglavnom pripisuje sortnim i genetskim razlikama među biljnim vrstama, različitim fazama zrelosti semena, geografskim i klimatskim uslovima (kao što su temperatura i padavine), kao i metodama izolovanja. Činjenica da uslovi sredine i metode dobijanja značajno utiču na udeo palmitinske, oleinske i linolne kiseline u uljima uočena je i u slučaju nekih drugih biljnih vrsta (Aslam i sar., 2009; Lajnef i sar., 2015; Schulte i sar., 2013).

GC-MS analiza ulja koprive koju su vršili Guil-Guerrero i sar. (2003) pokazala je da je α -linolenska kiselina glavna masna kiselina u listovima, posebno u zrelim listovima, linolna kiselina je bila dominantna u korenu i stabljikama, a da palmitinska kiselina dominira u semenu koprive.

Sa nutritivnog aspekta, na bazi dobijenih rezultata može se reći da ulje iz semena koprive pripada grupi jestivih ulja linolnog tipa, da je nutritivno visoko vredno, budući da je sadržaj linolne ω -6 masne kiseline izuzetno visok i iznosi 86,05%.

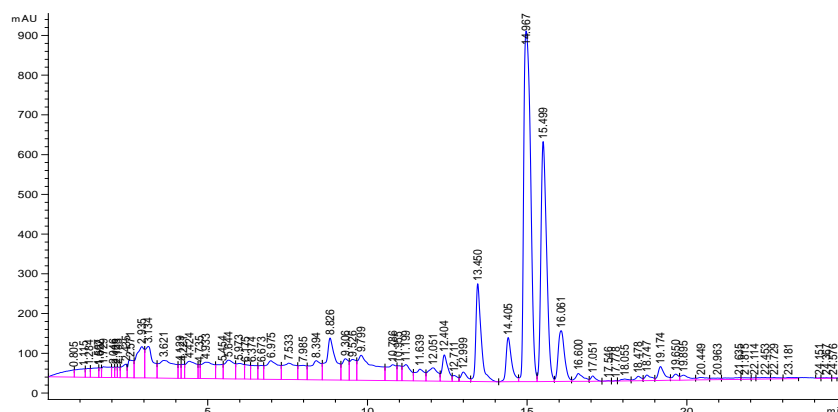
4.2.2. Sastav acilglicerola ulja semena koprive

Kvalitativno i kvantitativno određivanje acilglicerola je važna analiza u karakterizaciji prirodnih proizvoda, prehrambenih proizvoda, studijama metabolizma lipida i dr. (Sandra i David, 2000). Mono- i di- acilgliceroli i njihovi derivati nalaze široku primenu u prehrambenoj industriji. Široko se primenjuju za regulisanje tehno-funkcionalnih svojstava (penušavost, emulgujuća svojstva, rastvorljivost proteina i ugljenih hidrata, kapacitet vezivanja vode i ulja i sl.) u različitim vrstama hrane. Tri- acilgliceroli imaju visoku hranljivu vrednost i obično daju dvostruko više energije od ugljenih hidrata (Oellig i sar., 2020). Iz tog razloga, određen je sastav acilglicerola (mono-, di- i tri- acilgliceroli) ulja semena koprive i prikazan u tabeli 15, a HPLC hromatogram acilglicerola prikazan na slici 16.

Tabela 15. Sadržaj acilglicerola u ulju semena koprive

Acilgliceroli	Sadržaj (g/100 g lipida)
Monoacilgliceroli	1,38±0,09
Diacilgliceroli	2,92±0,51
Triacilgliceroli	95,70±7,22

Iz tabele 15 se vidi da najveći udeo u ulju semena koprive zauzimaju triacilgliceroli. U poređenju sa rezultatima u ovom radu, niži sadržaj mono-, di- i tri- acilglicerola detektovan je u ulju semena uljane repice i ulju semena soje (D'Alonzo i sar., 1982; Nikolić i sar., 2009). Razlog za manji sadržaj acilglicerola može biti u poreklu semena iz različitih biljnih vrsta i različitim metodama kvantifikacije acilglicerola.



Slika 16. HPLC hromatogram acilglicerola ulja semena koprive

4.2.3. Hemijski brojevi

Primenom standardnih volumetrijskih metoda određeni su saponifikacioni, jodni i kiselinski broj ulja semena koprive, a rezultati prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Hemijski brojevi ulja semena koprive

Hemijski broj	Vrednost
Kiselinski broj	
(% oleinske kiseline)	4,6±0,66
(mg KOH/g ulja)	9,1±1,87
Saponifikacioni broj (mg KOH/g ulja)	238,73±18,64
Jodni broj (g joda/100 g ulja)	117,54±7,52
Estarski broj (mg KOH/g ulja)	228,9±14,05

Kiselinski broj predstavlja broj mg KOH koji je potreban za neutralizaciju masnih kiselina u 1 g masti ili ulja. Najčešći je parametar koji se koristi pri karakterizaciji ulja jer predstavlja meru slobodnih masnih kiselina prisutnih u ispitivanom ulju. Poznavanje sadržaja slobodnih masnih kiselina u ulju je često pokazatelj kvaliteta ulja, iz razloga što su slobodne masne kiseline podložnije procesu oksidacije, pa će ulje sa većim sadržajem slobodnih masnih kiselina brže oksidovati, a samim tim i izgubiti na kvalitetu. Kiselinski broj takođe može ukazati na to kako je seme tretirano pre i za vreme ekstrakcije ulja. Prema pravilniku koji reguliše kvalitet i druge zahteve za jestiva biljna ulja i masti, prihvatljiva vrednost kiselinskog broja za jestiva nerafinisana ulja je do 4,0 mg KOH/g. To znači da, ukoliko je kiselinski broj veći od ove vrednosti, uslovi skladištenja semena su bili neadekvatni (npr., visoka temperatura i relativna vlažnost) ili je bilo nekih neodgovarajućih procesa tokom njegove prerade, što je izazvalo hidrolizu molekula triacilglicerola usled aktivacije enzima lipaze (Dimić i sar., 2012). Stoga, kiselinski broj se može koristiti za proveru nivoa oksidativnog propadanja ulja enzimskom ili hemijskom oksidacijom (Sabinus, 2012). Vrednosti kiselinskog broja ulja semena koprive koje su dostupne u literaturi, razlikuju se u poređenju sa našim. Vrednost kiselinskog broja ulja dobijenog ekstrakcijom petroleum etrom iznosila je 6,1 mg KOH/g ulja (Sharma, 1995), što je 1,5 puta manje u odnosu na ulje dobijeno trihloretilenom u našem radu. Jafari i sar. (2020) vršili su fizičko-hemijsku karakterizaciju ulja semena koprive roda *U. dioica* i *U. pilulifera*, poreklom iz severnog Irana. Prema njihovim istraživanjima ulje dobijeno ekstrakcijom *n*-heksanom imalo je kiselinski broj u vrednosti od 0,73% i 0,42% oleinske kiseline za rod *U. dioica* i *U. pilulifera*, redom. Ove vrednosti su značajno manje u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom radu. U poređenju sa rezultatima kiselinskog broja ulja drugih semena, takođe se primećuju razlike: kiselinski broj ulja semena uljane repice, suncokreta i semena čie iznosio je 1,90, 2,42 i 1,64 mg KOH/g ulja (Ixtaina i sar., 2011; Turyan i sar., 1998).

Evidentno je da literaturni podaci o kiselinskom broju ukazuju na nešto manji sadržaj slobodnih masnih kiselina u poređenju sa našim rezultatima, što može biti pokazatelj da je u ulju primenjenom u našim istraživanjima možda došlo do delimične hidrolize acilglicerola. Drugi razlog može biti razlika u sorti i vrsti semena, jer sadržaj slobodnih masnih kiselina može da se menja u zavisnosti od sorte i vrste semena iz kojih je ulje dobijeno.

Saponifikacioni broj predstavlja broj mg KOH koji je potreban za saponifikaciju svih masnih kiselina (slobodnih i estarski vezanih) u 1 g masti ili ulja. Vrednost saponifikacionog broja zavisi od relativnih molekulskih masa masnih kiselina esterifikovanih u strukturi triacilglicerola. Ukoliko je molekulska masa veća, saponifikacioni broj je manji i obrnuto (Jafari i sar., 2020). Saponifikacioni broj ulja ekstrahovanog *n*-heksanom iz semena koprive roda *U. dioica* i *U. pilulifera* (183,3 i 176,2 mg KOH/g, redom) bio je oko 1,3 puta manji u poređenju sa našim rezultatima, što može biti posledica različitog porekla semena koprive (severni Iran i Srbija) i upotrebljenog rastvarača za ekstrakciju. Pored toga, poređenje ukazuje na to da ulje dobijeno ekstrakcijom sa trihloretilenom kao rastvaračem, sadrži veću količinu niskomolekularnih masnih kiselina. Istraživanja autora Sharma (1995) pokazuju da je saponifikacioni broj ulja dobijenog ekstrakcijom petroleum etrom iz semena koprive 186,8 mg KOH/g ulja, što ukazuje na veći sadržaj masnih kiselina veće molekulske mase u sastavu acilglicerola.

Dobijena vrednost saponifikacionog broja (238,73 mg KOH/g ulja) u našem istraživanju ukazuje na mogućnost korišćenja ispitivanog ulja u proizvodnji različitih kozmetičkih proizvoda: tečnih sapuna, šampona, krema za brijanje i dr. (Oomah i sar., 2000).

Jodni broj predstavlja količinu joda koja se veže na 100 g masti ili ulja, zahvaljujući sposobnosti nezasićenim masnim kiselinama da na dvostruku vezu vežu molekul halogena. Vrednost jodnog broja je mera nezasićenosti masnih kiselina koje ulaze u sastav molekula triacilglicerola, pa će vrednost jodnog broja zavisiti od sadržaja nezasićenih masnih kiselina i broja dvogubih veza u njima. Jodni broj se može koristiti za određivanje tipa i porekla ulja. Prema istraživanjima autora Gupta i Kanwar (1994), suncokretovo ulje sa jodnim brojem od 125 do 136 mg I₂/g sadržalo je oko 70% polinezasićenih masnih kiselina. Vrednost jodnog broja u ovom istraživanju (117,54 mg J₂/g ulja) ukazuje da je ovo ulje visoko nezasićeno, odnosno bogato nezasićenim masnim kiselinama. Veći jodni broj pronađen je u ulju ekstrahovanom *n*-heksanom iz semena koprive poreklom iz Irana (Jafari i sar., 2020). Prema ovom istraživanju, jodni broj je bio veći za 25,6% u poređenju sa uljem ekstrahovanim trihloretilenom u našem istraživanju. Zatim, istraživanja koja su vršena na ulju ekstrahovanom etrom iz semena koprive pokazala su da je jodni broj ovog ulja 151,2 g joda/100 g ulja (Sharma, 1995), što je za 28,63%

više u odnosu na ulje dobijeno u našem radu. Ove razlike ukazuju na veći stepen nezasićenosti ulja u poređenju sa uljem dobijenim u našem istraživanju, a razlike se mogu pripisati različitom poreklu semena i različitom rastvaraču primenjenom za ekstrakciju ulja.

Rezultati našeg istraživanja su uporedivi sa prijavljenim rasponom za druga uobičajena biljna ulja kao što je sojino ulje (123,42 g joda/100 g ulja), ulje semena dinje (126,90 g joda/100 g ulja) i ulje semena kokosa (129,48 g joda/100 g ulja) (Sabinus, 2012).

Vrednost estarskog broja je još jedan važan parametar kada se razmatraju ulja. Definiše se kao broj miligrama kalijum hidroksida koji je potreban da se osapune estri u 1 g masti ili ulja. Zapravo, estarski broj predstavlja meru količine glicerida koja je prisutna u uzorku ulja, a koja se može saponifikovati. Definiše se i kao vrednost koja odgovara estarski vezanim masnim kiselinama. Određuje se računskim putem iz poznatih vrednosti saponifikacionog i kiselinskog broja (oduzimanjem kiselinskog od saponifikacionog broja), a za ulje semena koprive ekstrahovano uz refluks trihloretilenom iznosio je 228,9 mg KOH/g ulja. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa rezultatima estarskog broja drugih uobičajenih ulja kao što je ulje masline (190,86 mg KOH/g ulja) i ulje kokosa (250,33 mg KOH/g ulja) (Dileesh, 2013).

4.2.4. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativni potencijal hidrofilne, lipofilne frakcije i nefrakcionisanog ulja semena koprive

Poznavanje sadržaja polifenolnih jedinjenja ulja je važan faktor u proceni kvaliteta ulja zbog njihovog učešća u otpornosti na oksidaciju i oštrog gorkog ukusa ulja. Mnoge studije ističu pozitivnu linearnu vezu između ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja i stabilnosti ulja (Blekas i sar., 2002; Franco i sar., 2014; Mansouri i sar., 2016), odnosno sadržaja polifenolnih jedinjenja i vremena indukcije ulja (Roszkowska i sar., 2015). Šta više, utvrđeno je da su ova jedinjenja glavni faktori koji su u pozitivnoj korelaciji sa oksidativnom stabilnošću ulja (Redondo-Cuevas i sar., 2018).

Rezultati pokazuju da je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u hidrofilnoj frakciji ulja 584,48 µg ekvivalenta galne kiseline/g ulja. Ovakav rezultat ukazuje na značajno niži sadržaj polifenolnih jedinjenja u ulju u odnosu na sadržaj polifenolnih jedinjenja u hidroalkoholnim ekstraktima semena koprive (tabela 19), što navodi na zaključak da je ulje semena koprive verovatno podložno brzom oksidativnom propadanju. Generalno, zbog niskog sadržaja prirodnih polifenolnih jedinjenja u uljima, preduzeti su mnogi pokušaji da se spreči njihovo oksidativno propadanje korišćenjem prirodnih biljnih ekstrakata, posebno onih dobijenih ekstrakcijom alkoholom ili vodom (Blasi i Cossignani, 2020). Ipak, treba napomenuti

da su takvi ekstrakti mešavine različitih jedinjenja sa anti- i prooksidativnim delovanjem i da je oksidativna stabilnost ulja rezultat njihovih interakcija.

Za odvojeno proučavanje doprinosa polifenolnih jedinjenja antioksidativnom potencijalu (DPPH) u ulju semena koprive i radi dobijanja boljeg uvida u njegovu stabilnost, izvršena je podela ulja na dve frakcije: hidrofилnu (frakcija rastvorljiva u metanolu) i lipofilnu (frakcija nerastvorljiva u metanolu), a rezultati prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. *Antioksidativni potencijal nefrakcionisanog ulja semena koprive i frakcija (lipofilne i hidrofилne) ulja*

Uzorak	Nefrakcionisano ulje	Lipofilna frakcija	Hidrofилna frakcija	hidrofилna + lipofilna frakcija
EC₅₀ (mg·mL⁻¹)*	4,61±0,28 ^a	6,03±0,26 ^b	2,47±0,04 ^c	8,50
1/ EC₅₀ (mg·mL⁻¹)*	0,22	0,16	0,40	0,12
Tokoferol ekvivalent**	31,72	138,67	/	/

Unutar redova, vrednosti koje nisu označene istim slovima značajno se razlikuju, $p < 0,05$

*mg uljanog/suvog ostatka po mL

**mg tokoferola u 100g ulja

Za procenu antioksidativnog potencijala ulja semena koprive, DPPH test je odabran zato što je jedan od najrasprostranjenijih i najkorišćenijih, što olakšava poređenje rezultata sa podacima iz literature. Zatim, da je poređenje antioksidativnog potencijala jedinjenja lipidne frakcije moguće sa antioksidativnim potencijalom jedinjenja hidrofилne frakcije ispitane DPPH testom, opravdano je činjenicom da je molarna apsorptivnost DPPH u etilacetatu ista kao u metanolnom rastvoru (Espín i sar., 2000).

Rezultati DPPH testa pokazuju da se antioksidativni potencijal statistički značajno razlikovao ($p < 0,05$) među svim ispitivanim uzorcima ulja i da opada u nizu hidrofилna frakcija>nefrakcionisano ulje>lipofilna frakcija. Kao što se iz tabele 16 vidi, hidrofилna frakcija pokazuje 2,44 puta veći antioksidativni potencijal od lipofilne frakcije, što se može pripisati prisustvu polifenolnih jedinjenja sa većim antioksidativnim potencijalom u hidrofилnoj frakciji. Sa druge strane, antioksidativni potencijal lipofilne frakcije može biti posledica prisustva fosfolipida i tokoferola, ali i nekih liposolubilnih polifenola (kao što su katehini) (Espín i sar., 2000; Shi i sar., 2005). Espín i sar. (2000) u svojoj studiji demonstriraju ove navode i sugerišu da tokoferoli imaju različitu efikasnost kao antioksidansi, a da kapacitet uklanjanja DPPH radikala lipofilne frakcije ulja uglavnom zavisi od koncentracije i tipa tokoferola (δ , γ ili α). Koncentracija, tip tokoferola i njegov antioksidativni potencijal u ulju semena koprive nije analiziran, ali se iz priloženih rezultata može doneti zaključak da tokoferol zajedno sa nekim liposolubilnim polifenolima prisutnim u ulju semena koprive imaju slabiji antioksidativni

potencijal u poređenju sa polifenolnim jedinjenjima prisutnim u hidrofилnoj frakciji. Veći antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja od tokoferola je očekivan, naročito ako se uzmu u obzir strukturne osobine polifenolnih jedinjenja (Malićanin, 2014).

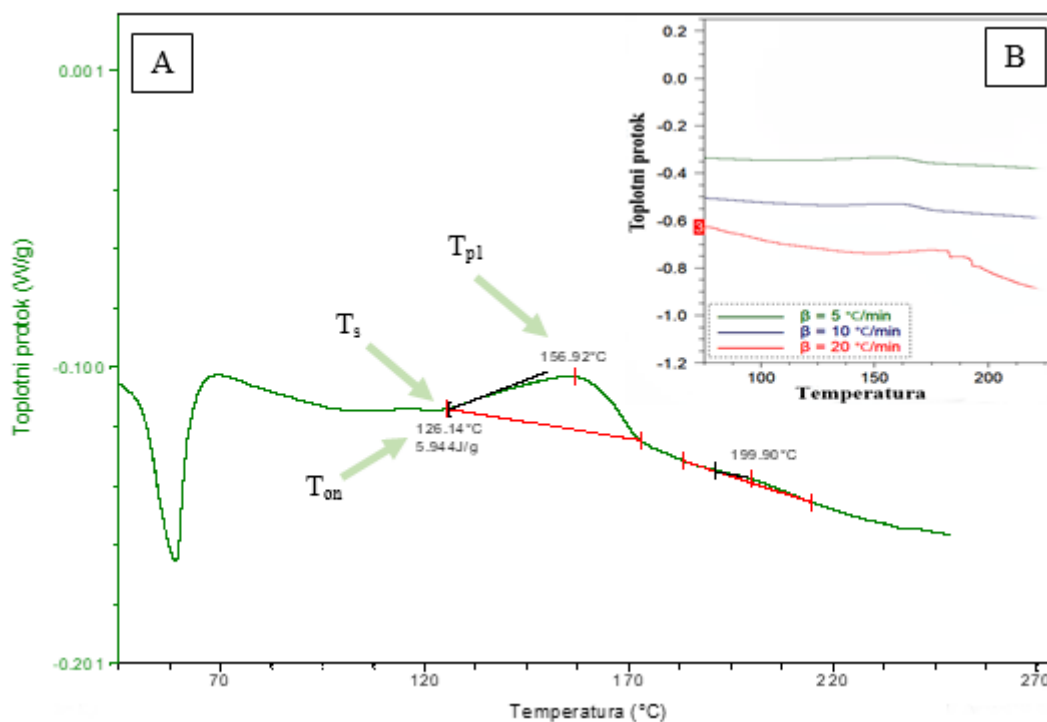
Antioksidativni potencijal nefrakcionisanog ulja bio je 1,84 puta veći od aritmetičkog zbira rezultata hidrofилne i lipofилne frakcije. Ovo bi moglo biti zbog sinergističkog efekta različitih antioksidanasa prisutnih u hidrofилnoj i lipofилnoj frakciji (Koga i Terao, 1995). Iste rezultate postigli su autori Espín i sar. (2000) u svojoj studiji koja govori o kapacitetu neutralisanja DPPH radikala različitih ulja i njihovih frakcija (hidrofилnih i lipofилnih). Naime, prema ovoj studiji antioksidativni potencijal hidrofилne (metanolne) frakcije bio je veći od lipofилne frakcije, a zbir ovih frakcija je takođe pokazao niži antioksidativni potencijal od nefrakcionisanih ulja. Generalno, EC_{50} vrednost ulja semena koprive u našem radu iznosila je $4,61 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Prema istraživanjima Uluata i Özdemir (2012), kapacitet neutralisanja DPPH radikala ulja iz semena koprive bio je $46,01 \text{ mg Troloksa}/100 \text{ g ulja}$. Međutim, pošto su rezultati predstavljeni u mg Troloksa na 100 g ulja, teško je napraviti odgovarajuće poređenje ovih rezultata sa rezultatima dobijenim u našoj studiji gde su izraženi kao EC_{50} vrednost u mg ulja po mL.

Koncentracija tokoferola koja je ekvivalentna antioksidativnoj vrednosti ispitivanog nefrakcionisanog ulja i njegove lipofилne frakcije iznosi $31,72$ i $138,67 \text{ mg tokoferola}/100 \text{ g ulja}$, redom.

4.2.5. Oksidativna stabilnost ulja semena koprive

4.2.5.1. Ne-izotermni režim DSC analize ulja semena koprive

Oksidativna stabilnost ulja semena koprive ispitana je korišćenjem DSC metode u ne-izotermnim uslovima (u temperaturnom opsegu od $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$), u režimu linearnog zagrevanja na 5 , 10 i $20 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ne-izotermni DSC termogram koji nastaje zagrevanjem ulja semena koprive pri brzini od $5 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (A) i uticaj različitih brzina zagrevanja na T_{on} (B) prikazan je na slici 17. S porastom temperature, na DSC termogramu uočava se pik koji ukazuje na to da dolazi do termo-oksidativnog razlaganja ispitivanog ulja, tokom kojeg dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Početak egzotermnog procesa se primećuje na temperaturi (start temperature, T_s) od oko 120 , 130 i $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ za brzine zagrevanja od 5 , 10 i $20 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, redom. U ovoj tački DSC termograma, primarni oksidacioni proizvodi počinju da se formiraju u ulju (Shankwalkar and Placek, 1993). Prema Adhvaryu i sar. (2000), T_s takođe predstavlja tačku gde se javlja gubitak malih molekularnih fragmenata usled isparavanja.



Slika 17. (A) *Ne-izotermni DSC termogram prilikom zagrevanja ulja semena koprive na brzini od 5 °C·min⁻¹ (T_{on} – onset temperature, T_{p1} – maximum peak temperature); (B) uticaj različitih brzina zagrevanja na T_{on} i T_{p1}*

Ekstrapolacijom osnovne linije termograma i tangente povučene na najstrmijem delu nagiba egzotermnog pika dobija se T_{on} koja se definiše kao temperatura kada se u sistemu primećuje naglo povećanje brzine oksidacije (Adhvaryu i sar., 2000). T_{on} odgovara temperaturi početka oksidacije koja za ulje semena koprive iznosi 126,14, 133,04 i 154,51 °C pri brzini zagrevanja od 5, 10 i 20 °C·min⁻¹, redom. Niže T_s i T_{on} vrednosti ukazuju na termički nestabilnije ulje. U poređenju sa literaturnim podacima, ulje semena koprive termički je nestabilnije u poređenju sa uljem soje, kukuruza, semena pamuka, suncokreta i uljem semena čie (Adhvaryu i sar., 2000; Ixtaina i sar., 2012). Razlike u stabilnosti se mogu pripisati strukturi i stepenu nezasićenosti masnih kiselina (polinezasićene masne kiseline oksiduju brže od mononezasićenih ili zasićenih), prisustvu prirodnih antioksidanasa i prooksidanasa (O'Connor i O'Brien, 2006). Prema istraživanju sprovedenom od strane Ixtaina i sar. (2010), sadržaj linolne kiseline u semenu čie iznosi 19,6–35,0%, što je 2,5-4,5 puta manje od njenog sadržaja u ulju semena koprive, dok je prema istraživanju sprovedenom od strane Akkaya (2018), sadržaj linolne kiseline u ulju semena suncokreta do dva puta manji i iznosi 44–75%, što potkrepljuje naše nalaze.

Pored T_s i T_{on} , na termogramu se uočava i temperatura maksimuma prvog pika (T_{p1}) koja predstavlja temperaturu na kojoj se propagacija završava i slobodni radikali počinju da

formiraju stabilna jedinjenja. Sa slike 17 vidi se da pri brzini zagrevanja od $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, T_{p1} iznosi $156,92\text{ }^{\circ}\text{C}$. T_{on} i T_{p1} vrednosti određene iz DSC krivih koje su dobijene na različitim brzinama zagrevanja, prikazane su u tabeli 17. Primećuje se da sa povećanjem brzine zagrevanja raste vrednost temperature T_s , T_{on} i T_{p1} . Ovo je posledica toga što pri nižim brzinama zagrevanja proizvodi primarne oksidacije koji nastaju tokom početne faze oksidacije reaguju sa viškom kiseonika i formiraju jedinjenja male molekulske mase (srednji oksidacioni proizvodi) kao što su aldehidi i kiseline koji ostaju u rastvoru, ubrzavajući proces oksidacije. Međutim, tokom većih brzina zagrevanja, proizvodi primarne oksidacije se gube isparavanjem pre nego što budu izloženi daljoj reakciji u uljanom rastvoru, pomerajući DSC signal ka višim vrednostima (u ovom slučaju, T_{on} je na mnogo višoj temperaturi) (Martínez-Monteagudo i sar., 2012; Ixtaina i sar., 2012; Micić i sar., 2015; Litwinienko, 2001).

Tabela 17. Početne temperature oksidacionih reakcija (T_{on}) ulja semena koprive i temperature maksimuma prvog pika (T_{p1})

Brzina zagrevanja ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
	T_{on1}	T_{p1}
5	126,14	156,92
10	133,04	161,12
20	154,51	178,68

Poznavanje parametara T_{on} i T_{p1} je veoma važno pri izračunavanju kinetičkih parametara (E_a , A i k) procesa oksidacije ulja i određivanju uslova u kojima će se skladištiti ulje semena koprive do prerade u odgovarajuće prehrambene proizvode, kao i proizvoda koji bi sadržao ovo ulje kao sirovinu.

Slika 17 pokazuje da se na DSC krivoj javljaju dva egzotermna pika sa maksimumima: T_{p1} i T_{p2} na $156,92$ i $199,90\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri brzini zagrevanja od $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Istraživanja autora Litwinienko i Kasprzycka-Guttman (1998) ukazuju da model sekvencijalnih reakcija sa autokatalitičkim početkom najbolje objašnjava oblik DSC krivi koje nastaju usled oksidacije ulja u ne-izotermnom režimu. Ovaj model ukazuje da prvi pik na DSC krivoj nastaje usled stvaranja hidroperoksida, dok drugi pik nastaje kao rezultat razlaganja nastalih hidroperoksida do daljih proizvoda. Isti autori predlažu da pri određivanju kinetičkih parametara procesa oksidacije ulja, radi procene njihove oksidativne stabilnosti, treba razmatrati temperaturu početka oksidacije, T_{on} , i temperaturu maksimuma prvog pika, T_{p1} .

U tabeli 18 su predstavljeni statistički i kinetički parametri dobijeni primenom KAS (Kissinger–Akahira–Sunose) metode, gde su primenom linearne regresije dobijeni visoki koeficijenti determinacije (R^2) za T_{on} i T_{p1} .

Tabela 18. Statistički i kinetički parametri termooksidativne stabilnosti ulja semena koprive izračunatih iz T_{on} i T_{p1}

Parametri	Temperatura (°C)	
	T_{on}	T_{p1}
R^2	0,99	0,92
Ea (kJ·mol ⁻¹)	63,48	61,53
A (×10 ⁵ min ⁻¹)	0,47	0,08

Iz tabele 18 je očigledno da se primenom T_{on} i T_{p1} dobijaju različite energije aktivacije, pri čemu je energija dobijena primenom T_{on} veća u odnosu na energiju dobijenu primenom T_{p1} , ukazujući na to da se dve različite faze procesa odvijaju na početku i maksimumu pika DSC krive. Ovo se može objasniti time što je u inicijalnoj fazi oksidacije ulja potrebna veća energija za pokretanje lančanih reakcija. Kako proces oksidacije odmiče stvaraju se slobodni radikali i postiže niža energija aktivacije koja je povezana sa koncentracijom slobodnih radikala i reaktanata. Iz tih razloga, oksidativna stabilnost ulja semena koprive uglavnom zavisi od reakcija na početku oksidativnog procesa (formiranje slobodnih radikala), što ilustruje početak DSC krive. Iz energije aktivacije i pred-eksponencijalnog faktora je *Arrhenius*-ovom jednačinom izračunata konstanta brzine oksidacije na 25 °C (k_{25}) i iznosila je $4,6 \times 10^{-8} \text{ min}^{-1}$.

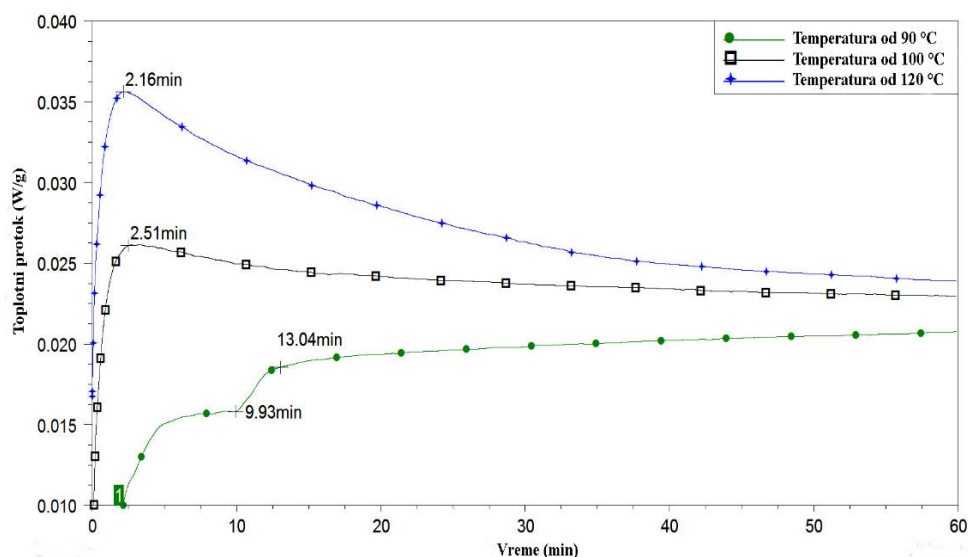
Ixtaina i sar. (2012) su primenom ne-izotermne DSC metode proučavali termooksidativnu stabilnost ulja semena čie ekstrahovanog hladnim presovanjem, pri čemu su dobili da vrednost Ea izračunate iz T_{on} pomoću Ozawa-Flynn-Wall metode iznosi 71,9 kJ·mol⁻¹. Poređenje sa našim rezultatima pokazuje da je ulje semena čie stabilnije u odnosu na ulje semena koprive, obzirom da je energija aktivacije ulja semena čie veća 1,13 puta od energije aktivacije dobijene za ulje semena koprive. Razlike mogu biti posledica strukture masnih kiselina (stepen nezasićenosti) i njihove zastupljenosti u ispitivanim uljima, kao i prisustva prirodnih antioksidanasa u uljima.

Treba naglasiti da u slučaju termooksidacije viša temperatura ubrzava proces auto-oksidacije što uzrokuje nižu stabilnost semena koprive i njegovih proizvoda. Obzirom da se prerada proizvoda koji sadrže seme koprive vrši na povišenim temperaturama, termooksidacija je realan parameter pri proceni kvaliteta ulja i proizvoda koji sadrže ulja.

4.2.5.2. Izotermni režim DSC analize ulja semena koprive

Poglavlje 2.2.4.1.1. analizira standardni protokol za određivanje indukcionog vremena oksidacije (OIT) koje predstavlja meru stabilnosti ulja ispitane izotermnim režimom DSC analize. Kao što je rečeno, OIT predstavlja period između t_1 (tačka kada se u sistem unosi

kiseonik) i t_2 (tačka koja predstavlja početak oksidacionog signala). Tačka t_2 dobija se iz preseka osnovne linije i tangente povučene na zabeleženom signalu egzotermnog toplotnog toka.



Slika 18. Izotermni DSC termogram ulja semena koprive dobijen na temperaturi od 90, 100 i 120 °C

Nedostatak izoternog režima je da se pronađe adekvatna temperatura za izotermnu fazu, jer ukoliko je temperatura previše niska može značajno povećati trajanje merenja, dok visoka temperatura može odmah oksidovati uzorak (oksidacija se odvija neposredno nakon uvođenja kiseonika) (Schmid i Affolter, 2003). U ovom slučaju, na termogramu je teže uočiti t_2 . Ovaj fenomen se upravo uočava na slici 18 u slučaju primene temperature od 100 °C i 120 °C. Naime, visoke temperature (100 °C i 120 °C) dovele su do oksidacije uzorka odmah nakon uvođenja kiseonika. Ova pojava je i u skladu sa ne-izoternim režimom koji nam pokazuje da se početak egzotermnog procesa primećuje na temperaturi (start temperature, T_s) od oko 120 °C. Sa druge strane, sa smanjenjem temperature jasno se uočava t_2 , koji za temperaturu od 90 °C iznosi 9,93 minuta, dok se sam pik uočava na 13,04 minuta.

Na osnovu svega navedenog, donosi se zaključak da se proces oksidacije (zabeležen kao egzotermni pik) javlja na svim ispitivanim temperaturama, a vreme koje je potrebno za njegovu pojavu iznosi 2,16 minuta, 2,51 i 9,93 minuta za temperature od 120, 100 i 90 °C, redom. Ovo ukazuje na to da je ulje izloženo konstantnoj temperaturi od 90 °C najstabilnije, a u odnosu na ulje izloženo temperaturama od 100 i 120 °C stabilnost je bila 4,6 i 3,9 puta veća.

Treba naglasiti da dobijeni rezultati oksidativne stabilnosti ukazuju na izrazitu stabilnost ulja semena koprive, s obzirom na to da bi oksidativna stabilnost bila značajno veća od dobijenih vrednosti ukoliko bi bila snimljena u uslovima skladištenja ulja, na temperaturi od 20

°C. Ovaj zaključak potkrepljuje činjenica da sa povećanjem temperature dolazi do smanjenja perioda indukcije, što je u skladu sa odnosom između brzine hemijske reakcije i temperature (Aktaş i sar., 2018).

Procenjeni *Arrhenius* parametri za oksidaciju ulja semena koprive u izotermnim uslovima ($\ln k_{OIT,i}$ vs. $1/T_i$) iznosili su: E_a bila je $53,96 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, k_{25} je $2,8 \times 10^{-3}$. Upoređivanjem kinetičkih parametara (E_a i k_{25}) dobijenih ne-izotermnom metodom sa onima dobijenim izotermnom metodom, procenjuje se da su vrednosti E_a približno jednake, dok su vrednosti k_{25} različite (k_{25} dobijena izotermnom metodom je veća). Ovo je posledica toga što se reakcija oksidacije može odvijati na različite načine na niskim i visokim temperaturama, u zavisnosti od reaktivnosti metalnih jona i antioksidanasa prisutnih u ulju. Pored toga, rastvorljivost kiseonika u ulju se menja sa temperaturom (Tan i sar., 2001).

4.3. Karakterizacija polifenolnih jedinjenja semena koprive

4.3.1. Sadržaj slobodnih i vezanih polifenola semena koprive

O ulozi ovih jedinjenja u zaštiti od oksidacije i mehanizmu njihovog delovanja kao primarnih aktioksidanasa je detaljno pisano u poglavljima 2.3. i 2.4.. Rezultati sadržaja slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja u semenu koprive, kao i njihov antioksidativni potencijal prikazani su u tabeli 19.

Tabela 19. Sadržaj, EC_{50} vrednosti i FRAP vrednost za različite vodeno-alkoholne ekstrakte slobodnih polifenola i nerastvorljivih-vezanih polifenola

Rastvarač	Slobodni polifenoli ekstrahovani različitim rastvaračima				Vezani polifenoli
	70% Metanol	Metanol	70% Etanol	Etanol	Dietil etar/etil acetat
Sadržaj polifenola*	6000±50,31 ^a	5890±10,81 ^b	5830±26,88 ^b	5220±61,78 ^c	2800 ^d
Sadržaj suvog ostatka ekstrakta**	13,46±1,04	11,38±0,51	15,19±0,73	11,25±1,18	8,45
EC_{50} *, DPPH test	0,73±0,026 ^a	0,76±0,025 ^a	1,24±0,05 ^b	1,69±0,09 ^c	0,38 ^d
1/ EC_{50} , DPPH test	1,37±0,05	1,31±0,04	0,8±0,03	0,59±0,03	2,63
EC_{50} **, test redukcione snage	5,68±0,61 ^a	6,1±0,22 ^a	7,69±0,4 ^b	10,75±0,82 ^c	1,43 ^d
1/ EC_{50} , test redukcione snage	0,17±0,001	0,16±0,006	0,13±0,02	0,04±0,007	0,70
FRAP vrednost***	37,85±0,81 ^a	25,05±1,27 ^b	17,05±0,34 ^c	12,65±0,18 ^d	27,16

Unutar redova, vrednosti koje nisu označene istim slovima značajno se razlikuju na $p < 0,05$

* μg ekvivalenta galne kiseline po g suvog biljnog materijala

** mg suvog ostatka po mL ekstrakta

*** $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ po g semena koprive

U zavisnosti od vrste rastvarača (70% metanol i 70% etanol, metanol i etanol), sadržaj slobodnih polifenola kretao se u opsegu od 5,22 mg galne kiseline po g suvog biljnog materijala do 6,00 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Sadržaj vezanih polifenola ekstrahovanih iz semena nakon izvršene alkalne hidrolize i uklanjanja slobodnih polifenola iznosio je 2,80 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Sproveden post-hoc Tukey-ev HSD test nad vrednostima dobijenim za sadržaj polifenola je pokazao da se ove vrednosti statistički značajno razlikuju u zavisnosti od vrste ekstrakta ($p < 0,05$), pri čemu je sadržaj slobodnih polifenola značajno veći u odnosu na sadržaj vezanih.

Većina ranije objavljenih rezultata razmatra sadržaj polifenola iz drugih delova biljaka koprive (posebno listova) i ukazuje na zavisnost sadržaja od stanja sirovine i njene sorte, stepena njene zrelosti, uzgoja (npr. vremenski uslovi, agrotehničke radnje) i postupka ekstrakcije, kao što su vrsta i zapremina rastvarača, odnos čvrsta materija - rastvarač, temperatura, pritisak i vreme ekstrakcije (Garofulić i sar., 2021; Hudec i sar., 2007; Kukrić i sar., 2012; Mandal i sar., 2009; Mzid i sar., 2017; Otles i Yalcin, 2012; Özkan i sar., 2011; Zeković i sar., 2017).

4.3.2. Antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenola semena koprive

U cilju određivanja antioksidativnog potencijala polifenolnih ekstrakata semena koprive, primenjene su tri metode: DPPH, FRAP i metoda redukcione snage. Sve tri metode zasnivaju se na različitim principima, pa se shodno tome očekuju različite vrednosti antioksidativnog potencijala, u zavisnosti od metode koja je korišćena.

Rezultati antioksidativnog potencijala određenog metodom neutralisanja DPPH radikala, pokazuju da se EC_{50} vrednost ekstrakata slobodnih polifenola kreće u opsegu od 0,73 do 1,69 $mg \cdot mL^{-1}$ u zavisnosti od rastvarača. Sa druge strane, ekstrakt vezanih polifenola je pokazao statistički značajno ($p < 0,05$) nižu EC_{50} vrednost od 0,38 $mg \cdot mL^{-1}$, ukazujući na to da vezani polifenoli imaju veću sposobnost neutralisanja DPPH radikala, odnosno veći antioksidativni potencijal. U odnosu na druga semena, antioksidativni potencijal ekstrakata slobodnih polifenola semena koprive bio je nešto niži u poređenju sa antioksidativnim potencijalom semena čie koji je objavljen u našoj prethodnoj studiji (Mitrović i sar., 2020). Prema ovom istraživanju, EC_{50} vrednost ekstrakata semena čie bila je između 0,43 i 1,27 $mg \cdot mL^{-1}$, u zavisnosti od rastvarača. Antioksidativni potencijal ekstrakata vezanih polifenola semena čie bio je takođe bolji (za oko 15%) u odnosu na antioksidativni potencijal vezanih polifenola semena koprive.

Prikazani rezultati u tabeli 19 pokazuju da pored DPPH, ekstrakt vezanih polifenola ima statistički veću ($p < 0,05$) redukcionu snagu (EC_{50} je bila 1,43 $mg \cdot mL^{-1}$) u poređenju sa ekstraktima slobodnih polifenola (5,68 – 10,35 $mg \cdot mL^{-1}$, redom). U literaturi postoje podaci o redukcionoj snazi metanolnih ekstrakata slobodnih polifenola dobijenih *Soxhlet*-ovom ekstrakcijom iz listova koprive, kada je EC_{50} iznosila 125 $mg \cdot mL^{-1}$ (Sarma Kataki, 2012), i vodenog ekstrakta iz nadzemnih delova koprive, kada je EC_{50} vrednost bila 110 $mg \cdot mL^{-1}$ (Gülçin i sar., 2004). U poređenju sa rezultatima našeg istraživanja, može se zaključiti da polifenoli iz semena imaju jaču redukcionu snagu od polifenola iz nadzemnih delova koprive. Nove tehnike ekstrakcije slobodnih polifenola iz lista koprive, kao što su ultrazvuk, mikrotalasna i subkrična vodena ekstrakcija omogućavaju dobijanje ekstrakata sa jačom redukcionom snagom: vrednosti EC_{50} bile su 43,93, 35,60 i 30,07 $\mu g \cdot mL^{-1}$, redom (Zeković i sar., 2017).

Rezultati FRAP metode pokazuju da je ekstrakt slobodnih polifenola imao veću FRAP vrednost (37,85 $\mu mol Fe^{2+}$ po g suvog biljnog materijala, odnosno 7,57 $mM Fe^{2+}/L$) od ekstrakta vezanih polifenola (27,16 $\mu mol Fe^{2+} g^{-1}$, odnosno 3,87 $mM Fe^{2+}/L$), ukazujući na to da ekstrakti slobodnih polifenola imaju veći antioksidativni potencijal. Iako obe metode, FRAP i metoda

redukcione snage, mere redukcionu sposobnost polifenolnih jedinjenja, dobijeni rezultati ovih dveju metoda se razlikuju. Pored toga što postoje razlike u samom mehanizmu ovih metoda, ovakav rezultat može biti posledica toga što u slačaju FRAP metode, svaka komponenta koja poseduje niži redoks potencijal od $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ parcijalne razlike ($\sim 0,7$ V) će dovesti do redukcije gvožđa iz feri u fero oblik i tako povećati FRAP vrednost uzorka (dati lažno veće rezultate) (Huang i sar., 2005). Na primer, mnogi helatori metala mogu da vežu Fe(III) i formiraju komplekse koji su takođe sposobni da reaguju sa antioksidansima. Shodno tome, FRAP test meri ukupni antioksidativni potencijal („Total antioxidant assay“). BHA ekvivalent za slobodne i vezane polifenole iznosio je $157,35$ i $563,14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, redom, a razlika je statistički značajna ($p < 0,05$). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za ekstrakte dobijene infuzijom, maceracijom i dekokcijom iz listova koprive, u kojima je FRAP vrednost bila u opsegu od $2,38$ do $13,47 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{L}$ (Cvitanović i sar., 2015). Prema istraživanjima sprovedenim od strane Mzid i sar. (2017), FRAP vrednost etanolnog ekstrakta polifenola lista koprive bila je $106,23 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suvog materijala, dok je istraživanje sprovedeno od strane Kumar i sar. (2013) pokazalo da je FRAP vrednost etanolne frakcije lista koprive nešto niža i iznosi $80 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suvog materijala.

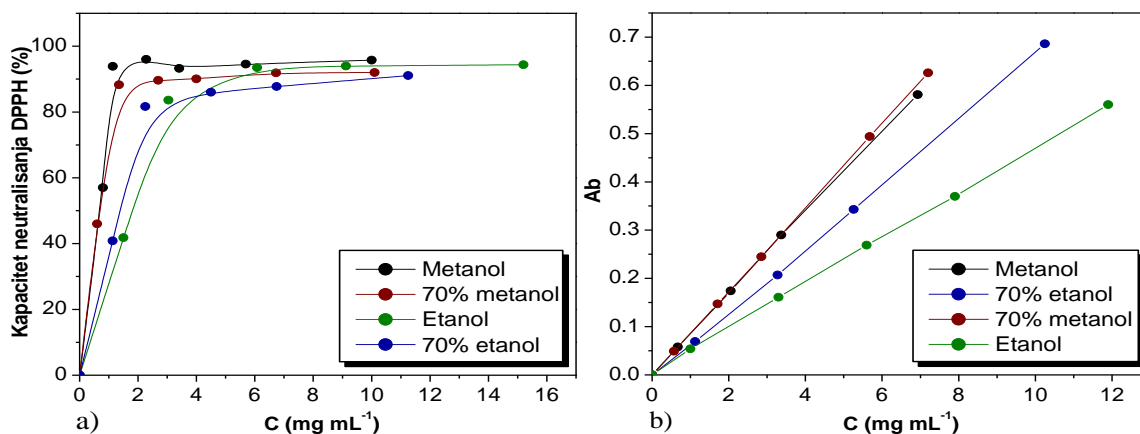
Generalno, razlike u antioksidativnom potencijalu između ekstrakata slobodnih i vezanih polifenola mogu se objasniti sadržajem i sastavom polifenola (različitih po hemijskoj strukturi i sadržaju pojedinih jedinjenja) koji pokazuju različiti antioksidativni potencijal u zavisnosti od primenjene metode istraživanja (Zahoranová i sar., 1999). Upoređujući ekstrakt slobodnih polifenola sa ekstraktom vezanih, vezani polifenoli su imali bolji DPPH i redukcionu snagu. Razlog tome može biti veći sadržaj kafeinske kiseline u ekstraktu vezanih nego u ekstraktu slobodnih polifenola, kao i taninska kiselina, monokafeoil-*mezo*-vinska kiselina i neidentifikovana jedinjenja (NID1 i NID2) koji su prisutni samo u ekstraktu vezanih polifenola (tabela 22 i tabela 23). Istraživanje Chen i Ho (1997) potkrepljuje ovu činjenicu pokazujući da je kafeinska kiselina imala bolji DPPH od hlorogene i ferulinske kiseline. Istraživanje autora Masek i sar. (2016) takođe pokazuje da je u poređenju sa *p*-kumarinskom kiselinom, kafeinska kiselina pokazala bolja antioksidativna svojstva ispitana DPPH, FRAP i CUPRAC metodama.

4.3.3. Uticaj rastvarača na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenola

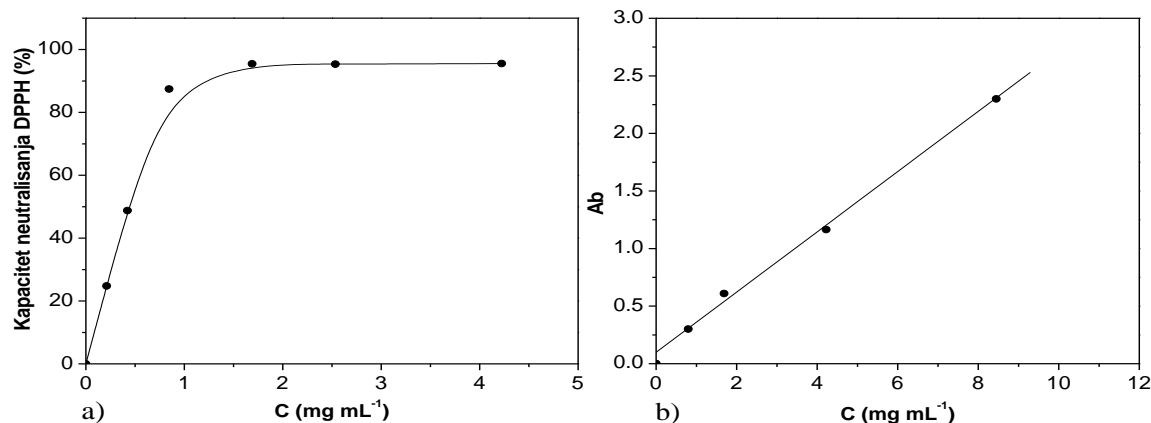
4.3.3.1. Uticaj rastvarača na sadržaj polifenola

Na prinos polifenolnih jedinjenja koja se izoluju iz biljnog materijala, između ostalog, mogu uticati i faktori kao što su vrsta rastvarača i veličina čestica uzorka, dok rastvorljivost polifenola zavisi od hemijske prirode biljnog uzorka, ali i polarnosti korišćenih rastvarača. U

ovom radu, rastvarači kao što su metanol sa indeksom polarnosti od 5,10 i etanol sa indeksom polarnosti od 4,30, kao i njihove 70% alkoholno-vodene smeše sa indeksom polarnosti od 6,63 (metanol-voda) i 6,07 (etanol-voda), upotrebljeni su u cilju ispitivanja uticaja ovih rastvarača na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja, a rezultati prikazani u tabeli 19. Na slici 19 i 20 prikazana je zavisnost kapaciteta neutralisanja DPPH radikala (a) i redukcionog snage (b) od koncentracije suvog ostatka alkoholnih ekstrakata slobodnih i vezanih polifenola semena koprive.



Slika 19. Zavisnost kapaciteta neutralisanja DPPH radikala (a) i redukcionog snage (b) od koncentracije suvog ostatka ekstrakata slobodnih polifenola semena koprive



Slika 20. Zavisnost kapaciteta neutralisanja DPPH radikala (a) i redukcionog snage (b) od koncentracije suvog ostatka ekstrakata vezanih polifenola semena koprive

Evidentno je da je sadržaj polifenola zavisio od vrste rastvarača i njegove polarnosti: najveći sadržaj polifenola dobijen je upotrebom 70% metanola ($6,00 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), rastvarača sa najvećim indeksom polarnosti, a najmanji sadržaj dobijen je korišćenjem čistog etanola ($5,22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), rastvarača sa najnižim indeksom polarnosti. Vidi se da je istraživani odnos metanol/voda pokazao značajno veću sposobnost ekstrahovanja polifenolnih jedinjenja u

poređenju sa smešom etanol/voda (70% metanol vs. 70% etanol). Slično, kada se uporedi sposobnost ekstrahovanja metanola i vodenog metanola, kao i etanola i vodenog etanola, vodeno-alkoholni ekstrakti su imali statistički značajno veći sadržaj polifenola ($p < 0,05$). Na osnovu ovih rezultata zaključuje se da su vodene smeše metanola i etanola pokazale veću ekstraktabilnost polifenolnih jedinjenja, a vodeni metanol se smatra najefikasnijim rastvaračem. Ovo je u saglasnosti sa literaturnim podacima o uticaju različitog odnosa vode i metanola, vode i etanola, i vode kao rastvarača na sadržaj polifenola ekstrahovanih iz lista koprive (Vajić i sar., 2015). Prema ovom istraživanju, istraživani odnosi metanolnih ekstrakata imali su značajno veći sadržaj polifenola od odgovarajućih etanolnih ekstrakata (50% metanol vs. 50% etanol; 75% metanol vs. 75% etanol; 100% metanol vs. 96% etanol), a upoređivanjem sposobnosti ekstrahovanja vode i vodenog metanola, vodeni metanolni ekstrakti su imali statistički značajno veći sadržaj polifenola ($p < 0,05$). Ovo se može objasniti činjenicom da je vodeni metanolni sistem sposoban da „razori“ ćelijske membrane i da oslobodi i stabilizuje neke fenolne podgrupe. Štaviše, ovaj sistem rastvarača je sa najvećim indeksom polarnosti, pa je stoga sposoban da rastvori polarna jedinjenja kao što su fenolne kiseline i glikozidi mnogih flavonoida. Takođe se navodi da metanol inhibira aktivnost polifenoloksidaza koje su veoma prisutne u biljkama i na taj način smanjuje fenolnu degradaciju (Tura i Robards, 2002).

Postoje publikacije o tome da jedan rastvarač možda nije najefikasniji za ekstrakciju polifenola i drugih bioaktivnih jedinjenja, a da sa povećanjem udela organskih rastvarača dolazi do smanjenja sposobnosti ekstrakcije. Na primer, ekstrakti pripremljeni 50% organskim rastvaračem (metanol, etanol ili aceton) imaju veći sadržaj polifenola u poređenju sa onima pripremljenim sa 80 i 100% (Turkmen i sar., 2006). Ovo može biti posledica većeg sadržaja vode, jer voda, zbog svoje polarnosti, može pomoći u ekstrakciji polifenola, posebno onih u glikolizovanom obliku (Khoddami i sar., 2013). Treba naglasiti da ekstrakcijom alkoholno-vodenim rastvaračima dolazi do ekstrahovanja ne samo polifenolnih jedinjenja, već i drugih jedinjenja koji mogu uticati na antioksidativni potencijal (npr., proteini) (Byers i sar., 1983).

4.3.3.2. Uticaj rastvarača na antioksidativni potencijal polifenola

Iz priloženih rezultata u tabeli 19 može se zaključiti da najveći potencijal neutralisanja DPPH radikala ima ekstrakt dobijen upotrebom 70% metanola (EC_{50} vrednost je bila $0,73 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a najmanji ekstrakt dobijen upotrebom čistog etanola (EC_{50} vrednost je bila $1,69 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Sproveden post-hoc Tukey-ev HSD test nad EC_{50} vrednostima pokazuje da su razlike u antioksidativnom potencijalu značajne ($p < 0,05$) između 70% metanolnog i 70% etanolnog ekstrakta, kao i 70% etanolnog i etanolnog ekstrakta, ali da statistički nema značajne razlike u

antioksidativnom potencijalu između 70% metanolnog i čistog metanolnog ekstrakta. Primećuje se da su 70% vodeno-alkoholni ekstrakti ispoljili veći potencijal neutralisanja DPPH radikala od monokomponentnih sistema rastvarača i ova pojava je slična onom uočenom za sadržaj polifenola. Ovo može biti posledica veće efikasnosti vodeno-alkoholnih smeša na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, obzirom da je najbolji DPPH pokazao 70% metanolni ekstrakt, koji je takođe ekstrakt sa najvećim sadržajem polifenola. Rezultati su u skladu sa rezultatima koje su izvestili Turkmen i sar. (2006). Prema njihovom istraživanju, antioksidativni potencijal ekstrakata različitih vrsti čajeva dobijenih 50% i 80% vodeno-alkoholnim smešama bio je veći od antioksidativnog potencijala ekstrakata dobijenih monokomponentnim sistemima rastvarača (čist metanol, etanol i aceton). Scapin i sar. (2016) pokazali su da koncentracija etanola i temperatura obrnuto utiče na vrednost EC_{50} : korišćenjem veće koncentracije etanola na višoj temperaturi, vrednost EC_{50} je bila niža, odnosno antioksidativni potencijal ekstrakata semena čie je bio bolji. Prema njihovim rezultatima, najveći potencijal neutralisanja DPPH radikala (EC_{50} vrednost od $3,841 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dobijen je najvišom ispitivanom koncentracijom etanola (80%) i temperaturom od $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. U poređenju sa ovim rezultatima, rezultati dobijeni u našoj studiji (sobna temperatura i koncentracija od 70%) pokazali su veći antioksidativni potencijal. U poređenju sa BHA (EC_{50} vrednost iznosi $6,35 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) kao sintetičkim antioksidansom, ispitivani ekstrakti su imali 10-26 puta slabiji DPPH (izražavanjem EC_{50} vrednosti u μg fenola mL^{-1} , dobijene vrednosti bile su u rasponu od 65,1 do 167,06).

Zaključuje se da su ekstrakti dobijeni korišćenjem rastvarača visoke polarnosti bili znatno efikasniji hvatači radikala od onih koji se dobijaju rastvaračima manje polarnosti, što ukazuje na to da su antioksidansi ili aktivna jedinjenja različite polarnosti mogla biti prisutna u semenu koprive. Promena polarnosti rastvarača menja njegovu sposobnost da rastvori odabranu grupu antioksidativnih jedinjenja i utiče na potencijalnu antioksidativnu aktivnost (Zhou i Yu, 2004).

Slična statistička i hipotetička objašnjenja mogu se dati kada se govori o redukcionoj snazi polifenolnih jedinjenja istraživanih ekstrakata, gde su 70% vodeno-alkoholni ekstrakti pokazali bolji antioksidativni potencijal od ekstrakata sa monokomponentnim sistemom rastvarača (redukciona snaga dobijena 70% etanolom i 70% metanolom je oko 1,34 i 1,1 puta veća od redukcionne snage dobijene čistim etanolom i metanolom, redom), a 70% metanol se pokazao kao najefikasniji rastvarač. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim od strane Sultana i sar. (2009), koji su izvestili da ekstrakti polifenola dobijeni 80% metanolom i 80% etanolom iz različitih lekovitih biljnih materijala imaju bolji antioksidativni potencijal od

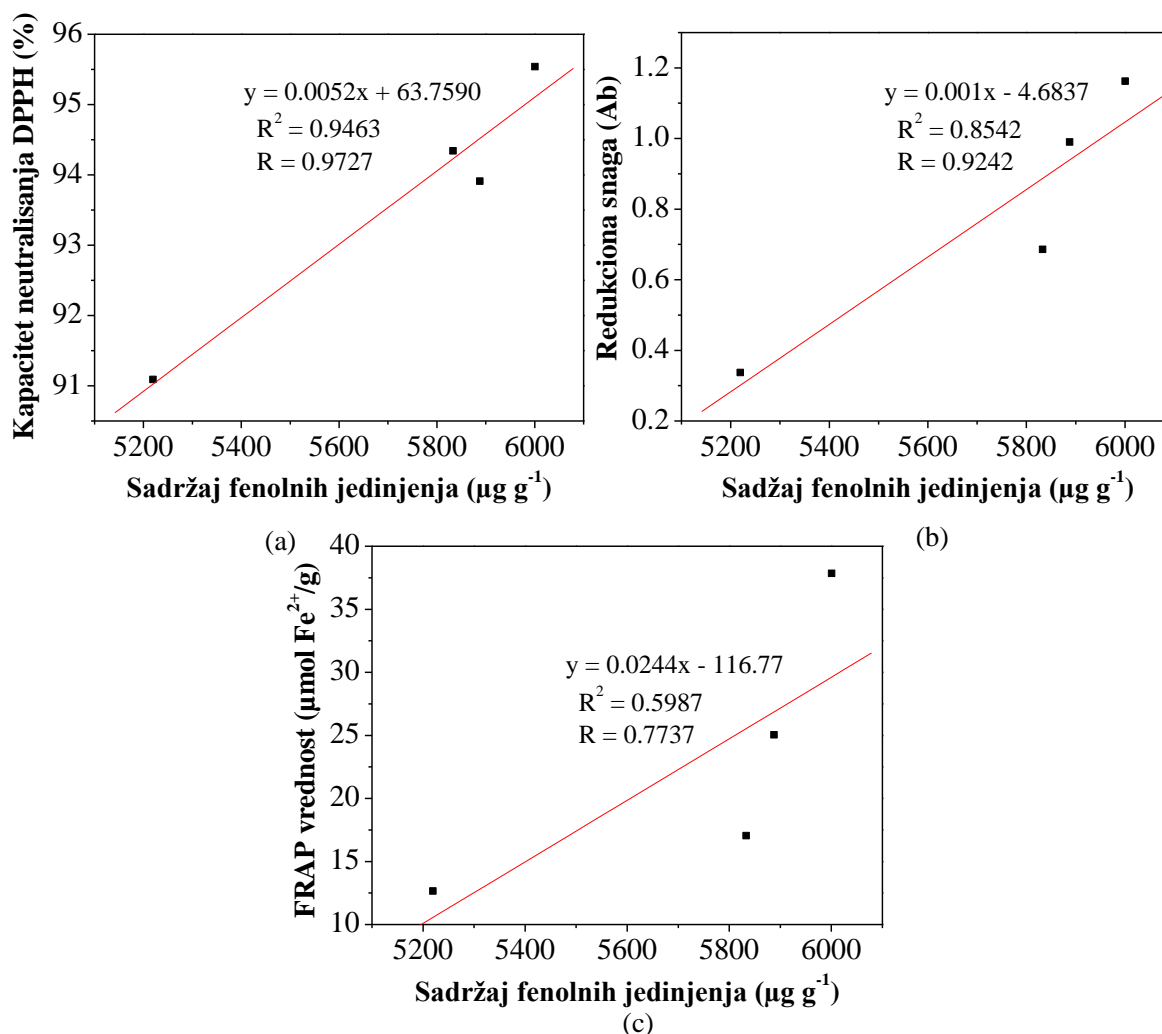
ekstrakata dobijenih čistim metanolom i etanolom. EC_{50} vrednost BHA za test redukcione snage bila je $18,42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. U poređenju sa BHA, ispitivani ekstrakti su imali 27-55 puta slabiju redukcionu snagu, jer su vrednosti EC_{50} u $\mu\text{g fenola/mL}$ bile od 506,45 do 1023,15.

Najveći antioksidativni potencijal ispitan FRAP testom postignut je kod ekstrakta dobijenog 70% metanolom (FRAP vrednost je bila $37,85 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), a najniža kod ekstrakta dobijenog čistim etanolom kada je FRAP vrednost bila $12,65 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Koncentracije BHA kojima su postignute iste FRAP vrednosti kao i FRAP vrednost ispitivanih ekstrakata dobijenih 70% metanolom i 70% etanolom i čistim metanolom i etanolom iznosile su 157,35, 70,70, 104,03 i $52,37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, redom. Ovo ukazuje na to da su istraživani ekstrakti imali manju FRAP vrednost od BHA.

4.3.4. Korelacija između antioksidativnog potencijala i ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja

U cilju uspostavljanja veze između sadržaja polifenola u ispitivanim alkoholnim ekstraktima i njihovog antioksidativnog potencijala određenog kao DPPH, redukciona snaga i FRAP vrednost, izvršena je linearna regresiona analiza koja je prikazana na slici 21.

Rezultati su pokazali pozitivnu i visoku korelaciju, što ukazuje na to da veći sadržaj polifenola dovodi do boljeg antioksidativnog potencijala. Vrednosti koeficijenata determinacije (R^2) i koeficijenata korelacije (R) koje su određene linearnom regresijom između sadržaja polifenola i DPPH bile su 0,95 i 0,97 (slika 21a), između sadržaja polifenola i redukcione snage 0,85 i 0,92 (slika 21b) i između sadržaja polifenola i FRAP vrednosti, 0,60 i 0,77 (slika 21c), redom. Pozitivnu korelaciju između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog potencijala ekstrakata iz različitih biljnih vrsta izvestili su i Cai i sar. (2004), Djeridane i sar. (2007), Piluzza i Bullitta (2011) i Spiridon i sar. (2011). Štaviše, utvrđene su značajne korelacije između polifenolnih jedinjenja koprive i njihove sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala (Biesiada i sar., 2010; Ghaima i sar., 2013; Khare i sar., 2012; Mandal i sar., 2009).



Slika 21. Korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja ekstrahovanih različitim rastvaračima i antioksidativnog potencijala određenog primenom DPPH metode (a), redukcione snage (b) i FRAP metode (c)

Razlike u R i R^2 vrednostima između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog potencijala određenog različitim metodama može biti posledica različitih odgovora polifenola u različitim sistemima analize, u zavisnosti od njihove hemijske strukture. Da je antioksidativni potencijal u korelaciji sa hemijskom strukturom polifenolnih jedinjenja (npr. flavonoidi, fenolne kiseline, tanini) dokazano je u ranijim studijama (Lien i sar., 1999; Rice-Evans i sar., 1996; Son i Lewis, 2002). Uklanjanje slobodnih radikala i antioksidativni potencijal polifenola (npr. flavonoida i fenolnih kiselina) uglavnom zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu fenolnih molekula koje doniraju vodonik, ali zavisi i od drugih faktora: glikozilacije aglikona, drugih H-donatorskih grupa ($-\text{NH}$, $-\text{SH}$) i drugo. Na primer, flavonolni aglikoni koji sadrže više hidroksilnih grupa (kao što su kvercetin, miricetin i kempferol), imali su veći antioksidativni potencijal od svojih glikozida kao što su rutin, miricitrin i astragaln,

ukazujući na to da je glikozilacija smanjila njihovu aktivnost. Zatim, utvrđeno je da supstitucija hidroksilnih grupa na pozicijama 3 i 5 sa metoksil grupama u siringinskoj kiselini smanjuje aktivnost (Rice-Evans i sar., 1996), ali je jasno da će sa povećanjem stepena hidroksilacije doći i do povećanja antioksidativne aktivnosti. Iz ovih razloga, korelacija između polifenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala ne mora uvek biti pozitivna i strogo zavisi od koncentracije i sastava antioksidativnog ekstrakta (Sokół-Łetowska i sar., 2007). Postoje studije koje demonstriraju ove navode. Tako, studije vršene od strane Babbar i sar. (2011) izveštavaju nizak stepen korelacije između ukupnih polifenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala različitih vrsta voća, ukazujući i na to da su neka nefenolna jedinjenja takođe doprinela ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti u ispitivanim ekstraktima voća.

Da bi se utvrdila pogodnost i pouzdanost metoda korišćenih u određivanju antioksidativnog potencijala (DPPH, redukcione snage i FRAP metoda), izvršena je linearna regresija i korelaciona analiza dobijenih vrednosti antioksidativnog potencijala. Koeficijenti korelacije (R) i koeficijenti determinacije (R^2) dati su u tabeli 20.

Tabela 20. Korelacije (R i R^2) između vrednosti antioksidativnog potencijala (prema DPPH, redukcione snage i FRAP metodi) alkoholnih ekstrakata semena koprive

R (R^2)	DPPH	Test redukcione snage
DPPH	-	0,8988 (0,8078)
FRAP	0,8147 (0,6638)	0,9340 (0,8724)

R, koeficijent korelacije. R^2 , koeficijent determinacije. Vrednosti u zagradama predstavljaju vrednosti R^2 .

Sve R vrednosti su bile pozitivne, što ukazuje da su vrednosti antioksidativnog potencijala analiziranog upotrebom tri različite metode bile visoko korelativne. Ovi rezultati su pokazali da su sve tri metode ispitivanja bile pogodne i pouzdane za procenu ukupnog antioksidativnog potencijala alkoholnih ekstrakata semena koprive. Tabela 20 pokazuje visoko značajnu linearnu korelaciju ($R^2 = 0,8724$, $R = 0,9340$) između antioksidativnog potencijala analiziranog testom redukcione snage i FRAP testom. Vrednosti koeficijenta korelacije i determinacije između DPPH testa i testa redukcione snage bile su nešto niže, dok između DPPH i FRAP testa pokazuju najniži stepen korelacije. Sva tri testa antioksidativnog potencijala korišćena u ovoj studiji su zasnovana na spektrofotometriji. Međutim, nije iznenađujuće pronaći razlike u merenjima antioksidativnog potencijala među testovima, pošto svaki ima drugačiji mehanizam delovanja ili različite uslove reakcije.

4.3.5. Antimikrobna aktivnost slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja

Pored utvrđenog antioksidativnog potencijala, mnoga polifenolna jedinjenja mogu pokazati značajnu antimikrobnu aktivnost. U ovom radu, ekstrakt slobodnih i vezanih polifenola proučavan je na devet bakterijskih i jedan gljivični soj da bi se utvrdila njihova antimikrobna aktivnost. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 21.

Tabela 21. Antimikrobna aktivnost ekstrakata slobodnih i vezanih polifenola iz semena koprive

Ispitivani mikroorganizam	Prečnik zone inhibicije (mm)	
	Ekstrakt slobodnih polifenola	Ekstrakt vezanih polifenola
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	12,66±1,07	17,33±1,64
<i>Bacillus luteus</i>	-	13,00±0,91
<i>Bacillus subtilis</i>	-	15,66±1,17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	10,33±1,01
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	11,66±1,05	19,66±1,57
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	-	-

Ekstrakt slobodnih polifenola je delovao na dve, dok je ekstrakt vezanih polifenola delovao na pet od deset testiranih mikrobnih vrsta. Oba ekstrakta su imala najbolji inhibitorni efekat na rast istih mikrobnih vrsta, *Bacillus cereus* ATCC 11778 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Ekstrakti nisu imali uticaja na rast drugih istraživanih bakterija (*Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) niti na gljivu *Candida albicans* ATCC 10259.

Kopriva ima zapaženu antimikrobnu aktivnost protiv gram-pozitivnih i gram negativnih bakterija u poređenju sa standardnim i jakim antimikrobnim jedinjenjima, kao što su mikonazol nitrat, amoksisilin-klavulanska kiselina, ofloksacin i netilmicin (Gülçin i sar., 2004). Zapažena je antimikrobna aktivnost polifenolnih ekstrakata iz nadzemnih delova koprive na različite bakterije i patogene gljive (Chahardehi i sar., 2010; Dukić i sar., 2008; Hadizadeh i sar., 2009). Körpe i sar. (2013) proučavali su antibakterijsku aktivnost metanolnih i vodenih ekstrakata semena *Urtica dioica* L. i *Urtica pilulifera* L. na neke patogene bakterije. Ovi ekstrakti nisu imali efekta na *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, ali su za razliku od naših rezultata pokazali visoku antibakterijsku aktivnost na *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes*.

4.3.6. Sastav slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja

Za određivanje pojedinačnih fenolnih kiselina, flavonoida i njihovih derivata koji doprinose antioksidativnom i antimikrobnom potencijalu, izvršena je analiza tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) u izokratnom i gradijentnom režimu eluiranja, a rezultati predstavljeni u tabeli 22 i 23, redom. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u ekstraktu slobodnih i vezanih polifenola semena koprive prikazani su na slici P₁₈ i P₁₉, redom.

Tabela 22. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima slobodnih i vezanih polifenola iz semena koprive identifikovanih HPLC metodom sa izokratnim eluiranjem

Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)*	Ekstrakt slobodnih polifenola	Ekstrakt vezanih polifenola	Ukupni sadržaj
Galna kiselina	149,27±13,43 ^a	8,51±1,18 ^b	157,78±13,48
Hlorogena kiselina	323,72±27,50 ^a	21,19±5,69 ^b	344,91±28,08
Kafeinska kiselina	22,51±2,03 ^a	165,49±12,4 ^b	188,00±12,57
Taninska kiselina	-	52,47±3,67	52,47±3,67
Siringinska kiselina	11,46±0,92	-	11,46±0,92
Elaginska kiselina	94,75±8,05	-	94,75±8,05
Kumarinska kiselina	1,66±0,15 ^a	11,47±0,80 ^b	13,13±0,15
<i>Trans</i> -ferulinska kiselina	49,74±3,48 ^a	10,22±0,92 ^b	59,96±3,59
Rutin	216,04±17,28 ^a	4,37±0,39 ^b	220,41±17,28
Miricetin	34,47±2,75	-	34,47±2,75
Ukupni sadržaj detektovanih jedinjenja	903,62±36,39	273,72±14,24	1177,34±39,07

Unutar redova, vrednosti označene različitim slovima (a,b) se značajno razlikuju, $p < 0,05$

* μg fenolnog jedinjenja po g suvog biljnog materijala

Među identifikovanim i kvantifikovanim jedinjenjima u ekstraktima semena koprive, bile su fenolne kiseline, flavonoidi u slobodnim oblicima (aglikoni) kao i njihovi glikozidi. U ekstraktu slobodnih polifenola detektovano je devet fenola, dok je u ekstraktu vezanih, sedam. Među ovim fenolima, hlorogena kiselina je bila najzastupljenija u ekstraktu slobodnih polifenola (323,72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), a kafeinska kiselina u ekstraktu vezanih polifenola (165,49 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). U ekstraktu slobodnih polifenola, sadržaj galne, hlorogene, *trans*-ferulinske kiseline i rutina bio je veći za 17,5, 15,3, 4,9 i 49,4 puta, redom, u odnosu na ekstrakt vezanih polifenola. Sa druge strane, u ekstraktu vezanih polifenola sadržaj kafeinske i kumarinske kiseline bio je 7,3 i 6,9 puta veći nego u ekstraktu slobodnih polifenola. Statistička analiza pokazala je da se sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja statistički značajno razlikuje ($p < 0,05$), ukazujući na to da se ispitivani ekstrakti slobodnih i vezanih polifenola razlikuju po sadržaju identifikovanih jedinjenja.

Tabela 23. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima slobodnih i vezanih polifenola iz semena koprive identifikovan HPLC metodom sa gradijentnim eluiranjem

Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)*	Ekstrakt slobodnih polifenola	Ekstrakt vezanih polifenola	Ukupni sadržaj
Hidroksicimetna kiselina	48,13±4,09	-	48,13±4,09
5- <i>O</i> - kafeoilšikiminska kiselina	8,03±0,76	-	8,03±0,76
Kempferol 3- <i>O</i> -7- <i>O</i> -diglukozid	185,07±15,73 ^a	13,36±1,23 ^b	198,43±14,57
Fenol 'P5'	12,78±1,21	-	12,78±1,21
Protogenkvanin-4- <i>O</i> -glukozid	27,03±2,29	-	27,03±2,29
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid-7- <i>O</i> -ramnozid	33,44±2,17	-	33,44±2,17
Kempferol 3- <i>O</i> -rutinozid-7- <i>O</i> -ramnozid	428,55±23,57	-	428,55±23,57
Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozid	46,34±3,47	-	46,34±3,47
Kempferol 3- <i>O</i> -rutinozid	9,58±0,58	-	9,58±0,58
Monokafeoil- <i>mezo</i> -vinska kiselina	-	406,83±36,61	406,83±36,61
Kempferol 3- <i>O</i> -rutinozid-7- <i>O</i> -glukozid	-	50,65±4,05	50,65±4,05
NID 1	-	217,75±1,82	217,75±1,82
NID 2	-	1450,66±2,63	1450,66±2,63
Ukupni sadržaj detektovanih jedinjenja	798,95±29,05	2139,26±36,99	2938,21±28,44

Unutar reda, vrednosti označene različitim slovima (a,b) se značajno razlikuju, $p < 0,05$

* μg fenolnog jedinjenja po g suvog biljnog materijala

*NID – neidentifikovano jedinjenje

Kvalitativni i kvantitativni profil polifenolnih jedinjenja koprive zavisi od mnogo faktora, kao što su klimatski uslovi gajenja, deo biljke, tehnika ekstrakcije, rastvarač koji se koristi za ekstrakciju i dr.. Otles i Yalcin (2012) demonstriraju ove navode ukazujući na to da različiti biljni delovi koprive (koren, stabljika i listovi) sakupljeni iz različitih regiona Turske imaju različiti kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola, pri čemu je sadržaj siringinske kiseline bio najveći u svežim listovima jednog uzorka koprive iz Egejskog regiona. Studije autora Pinelli i sar. (2008) pokazuju da listovi gajene i divlje koprive sadrže velike količine hlorogene i 2-*O*-kafeoil jabučne kiseline, redom, koje zauzimaju preko 70% od ukupnog sadržaja polifenola. Vajić i sar., (2015) takođe izveštavaju o visokoj zastupljenosti hlorogene i 2-*O*-kafeoil jabučne kiseline, ali i rutina u ekstraktima dobijenim maceracijom i ultrazvučnom ekstrakcijom polifenola iz listova koprive.

Gradijentnim eluiranjem identifikovano je devet polifenolnih jedinjenja u ekstraktu slobodnih, a pet u ekstraktu vezanih polifenola. Među identifikovanim jedinjenjima u ekstraktu slobodnih polifenola, najzastupljeniji je kempferol 3-*O*-rutinozid-7-*O*-ramnozid ($428,55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), a ukupan sadržaj derivata kempferola iznosio je $623,20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Među polifenolima u ekstraktu vezanih polifenola, najzastupljenije je jedinjenje sa vremenom zadržavanja od 67,73 min, NID 2 ($1450,66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Upoređujući rezultate ukupnog sadržaja polifenola dobijene spektrofotometrijskom metodom i rezultate dobijene HPLC analizom, primećuje se da je sadržaj polifenola dobijen HPLC analizom znatno manji u odnosu na spektrofotometrijsko merenje sadržaja. Činjenica je da je samo mali deo fenolnih kiselina kvantifikovan HPLC metodom, što dovodi do nižeg ukupnog sadržaja polifenola. Spektrofotometrijske metode, posebno metoda za određivanje sadržaja polifenola, slabo je selektivna metoda. Širok spektar organskih jedinjenja reaguje sa Folin reagensom kao što su vitamini, ugljeni hidrati, aminokiseline, nukleotidi, tioli, nezasićene masne kiseline, proteini, amini, aldehidi, ketoni itd. (Amorati i Valgimigli, 2015; Everette i sar., 2010). Pored navedenih klasa, sa ovim reagensom reaguju i hidrazini, hidroksilamini, gvanidini, tercijarni amini, aromatični amini, pirol i indoli (Everette i sar., 2010; Ikawa i sar., 2003). Ovakve okolnosti dovode do nepreciznih rezultata za ukupni sadržaj polifenola, pa ih stoga treba tumačiti sa oprezom.

4.3.7. Karakterizacija polifenolnih jedinjenja ekstrahovanih vodom iz samlevenog i nesamlevenog semena koprive

4.3.7.1. Sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja

Da bi se dobili adekvatni oblici koprive i njenog ekstrakta za primenu u proizvodnji prehrambenih proizvoda, neophodno je istražiti uslove većeg prinosa polifenolnih jedinjenja. U ovom delu rada, naglasak je stavljen na razvijanje i karakterizaciju ekstrakta na bazi vode kao ekonomski isplativog i netoksičnog rastvarača, što omogućava njegovu primenu u prehrambenom, ali i farmaceutskom sektoru. Rezultati sadržaja i antioksidativnog potencijala polifenolnih jedinjenja ekstrahovanih iz samlevenog i nesamlevenog semena koprive primenom vode, prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i EC_{50} vrednost za DPPH test vodenih ekstrakata semena koprive

	Ekstrakt samlevenog semena	Ekstrakt nesamlevenog semena
Sadržaj polifenola*	4317,71±305,38 ^a	4028,33±17,88 ^b
DPPH test**		
EC ₅₀ vrednost	0,152±0.01 ^a	0,317±0.06 ^b
1/ EC ₅₀ vrednost	6,58	3,15

* μg galne kiseline po g suvog biljnog materijala

** mg suvog ostatka ekstrakta po mL ekstrakta

Rezultati pokazuju da je sadržaj polifenolnih jedinjenja bio za oko 7% veći u ekstraktu dobijenom iz samlevenog semena ($4317,71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) nego u ekstraktu dobijenom iz nesamlevenog semena ($4028,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), a prema statističkoj analizi razlike su bile značajne ($p < 0,05$). Značajna razlika rezultata je sasvim očekivana, s obzirom na to da smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja površinskog kontakta između čvrste materije i ekstraktanta. Pinelo i sar. (2005) potvrđuju ovaj fenomen kroz istraživanja koja se vezuju za uticaj veličine čestica (0,5–3 mm) na prinos ekstrakcije polifenolnih jedinjenja. Prema njihovom istraživanju, najveći prinos polifenolnih jedinjenja postignut je sa najmanjom veličinom čestica ekstrakcionog materijala (0,5 mm). Mlevenje takođe može poboljšati kinetiku ekstrakcije time što skraćuje put koji rastvarač treba da pređe, poboljšavajući difuziju i smanjujući vreme ekstrakcije (Shi i sar., 2005).

U poređenju sa rezultatima sadržaja polifenola dobijenog upotrebom alkoholnih rastvarača i alkoholno-vodenih smeša rastvarača (tabela 19), sadržaj polifenolnih jedinjenja dobijen vodom kao rastvaračem, bio je manji za 22,5-33%, u zavisnosti od rastvarača. Mnoge studije pokazuju da je sadržaj polifenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima lista koprive veći (Mzid i sar., 2017; Vajić i sar., 2015). Generalno, listovi se smatraju najbogatijim delom koprive po sadržaju polifenola (Garofulić i sar., 2021; Repajić i sar., 2021).

Rezultati EC_{50} vrednosti ukazuju da vodeni ekstrakt dobijen iz samlevenog semena ima statistički značajno ($p < 0,05$) veći antioksidativni potencijal u poređenju sa ekstraktom dobijenim iz nesamlevenog semena. Ovo može biti posledica većeg sadržaja polifenola prisutnog u ekstraktima samlevenog semena. Poređenje antioksidativnog potencijala vodenih i alkoholnih ekstrakata semena koprive pokazuje da vodeni ekstrakti imaju bolji antioksidativni potencijal (razlike su 4,8-11 puta, u zavisnosti od vrste rastvarača i semena: samleveno ili nesamleveno), što može biti posledica sastava polifenolnih jedinjenja. Istraživanja o antioksidativnom potencijalu drugih delova koprive ukazuju da je EC_{50} vrednost vodenog ekstrakta lista koprive $0,14 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Mzid i sar., 2017), što je u saglasnosti sa antioksidativnim potencijalom ekstrakta dobijenog iz samlevenog semena u našem istraživanju.

4.3.7.2. Sastav slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja vodenih ekstrakata

Primenom izokratnog eluiranja, identifikovano je i kvantifikovano šest polifenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima nesamlevenog i samlevenog semena koprive, dok je gradijentnim eluiranjem kvantifikovano šest i tri polifenolna jedinjenja u ekstraktu nesamlevenog i samlevenog semena, redom. Sadržaj identifikovanih polifenolnih jedinjenja

prikazan je u tabeli 25, a HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja prikazani su na slikama P₂₀-P₂₃ u prilogu.

Tabela 25. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima semena koprive, identifikovan izokratnim i gradijentnim eluiranjem

Polifenolno jedinjenje	Sadržaj	
	Ekstrakt nesamlevenog semena	Ekstrakt samlevenog semena
Izokratno eluiranje*		
Galna kiselina	1265,50±7,45 ^a	1953,61±8,09 ^b
Hlorogena kiselina	537,07±3,01 ^a	543,87±6,24 ^a
Taninska kiselina	331,14±2,35 ^a	38,21±4,93 ^b
Kafeinska kiselina	85,32±2,86 ^a	61,06±6,54 ^b
Siringinska kiselina	76,10±6,01 ^a	34,56±5,39 ^b
<i>Trans</i> -ferulinska kiselina	12,75±1,24 ^a	54,56±2,82 ^b
NID 2.697	293,70±4,17 ^a	674,34±13,79 ^b
Ukupno	2601,58^a	3360,21^b
Gradijentno eluiranje**		
Hlorogena kiselina	164,38±8,2 ^a	437,24±3,87 ^b
Monokafeoil- <i>mezo</i> -tartarna kiselina	52,34±3,85	/
Hidroksicinaminska kiselina	64,47±4,52	/
Fenolik P3	85,32±1,16	/
Kempferol glikozid P2	149,53±4,06	/
Kempferol 3- <i>O</i> 6- <i>O</i> malonil glikozid	130,79±4,33 ^a	102,79±6,35 ^b
Kvercetin 3- <i>O</i> rutinozid 7- <i>O</i> ramnozid	/	100,62±2,28
Ukupno	646,83^a	640,65^a

Unutar redova, vrednosti označene različitim slovima (a,b) se značajno razlikuju, $p < 0,05$

* μg fenolne kiseline na 100 g suvog biljnog materijala

** μg polifenolnog jedinjenja na 100 g suvog biljnog materijala

Primećuje se da su galna i hlorogena kiselina najzastupljenije fenolne kiseline, a derivati kempferola najzastupljenija flavonoidna jedinjenja u ekstraktima dobijenim iz samlevenog i nesamlevenog semena koprive: sadržaj galne kiseline je u ekstraktu samlevenog semena bio značajno veći (54,37%) u poređenju sa njenim sadržajem u ekstraktu nesamlevenog semena, dok je sadržaj hlorogene kiseline ispitane izokratnim eluiranjem bio veći za samo 1,26%, što statistički nije bilo značajno ($p > 0,05$). Statistički značajna razlika u sadržaju hlorogene kiseline među ispitivanim ekstraktima uočena je u slučaju gradijentnog načina eluiranja, gde je sadržaj hlorogene kiseline u ekstraktu samlevenog semena bio veći 2,6 puta.

Sadržaj *trans*-ferulinske kiseline je takođe bio dominantniji (4,27 puta) u ekstraktu samlevenog semena. Takođe, ne može se zanemariti sadržaj neidentifikovanog jedinjenja sa retencionim vremenom 2,69 min, NID 2,697, čiji je sadržaj bio 2,3 puta veći u ekstraktu samlevenog u poređenju sa ekstraktom nesamlevenog semena. Sa druge strane, sadržaj taninske, kafeinske i siringinske kiseline je bio 8,6, 1,4 i 2,2 puta, redom, veći u ekstraktu nesamlevenog semena, što je statistički bilo značajno ($p < 0,05$). Kempferol glikozid P2 je

najzastupljeniji flavonoid u ekstraktu nesamlevenog, a kempferol 3-*O*-6-*O* malonil glikozid u ekstraktu samlevenog semena. Generalno, u poređenju sa nesamlevenim semenom, samleveno seme koprive doprinosi povećanju sadržaja većeg broja polifenolnih jedinjenja.

U poređenju sa sastavom slobodnih polifenolnih jedinjenja prisutnih u alkoholnom (metanolnom) ekstraktu samlevenog semena koprive koji je određen izokratnim eluiranjem, ukupni sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima bio je značajno manji. Elaginska i kumarinska kiselina, rutin i miricetin u vodenom ekstraktu nisu detektovani, a pojedinačni sadržaj svih kvantifikovanih jedinjenja bio je značajno manji u odnosu na njihov sadržaj u alkoholnom ekstraktu. Za razliku od vodenog ekstrakta, taninska kiselina nije detektovana u alkoholnom ekstraktu slobodnih polifenola. Poređenje u sastavu polifenolnih jedinjenja vodenog i metanolnog ekstrakta ispitanog gradijentnim eluiranjem pokazuje da je ukupni sadržaj detektovanih jedinjenja u metanolnom ekstraktu značajno veći i da se ova dva ekstrakta, pored razlike u kvantifikaciji, značajno razlikuju po sastavu identifikovanih polifenolnih jedinjenja.

4.4. Karakterizacija proizvoda obogaćenih semenom koprive i ekstraktom od semena koprive

4.4.1. Hemijski sastav proizvoda

Zamenom dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primenom vodenog ekstrakta za zames testa formirani su fini pekarski proizvodi (PSK i PEK) i analizirani u cilju utvrđivanja njihovog osnovnog hemijskog profila koji obuhvata sadržaj proteina, lipida, ugljenih hidrata, vlakana i pepela, a rezultati analize prikazani u tabeli 26. Dobijeni proizvodi poređeni su sa kontrolnim uzorkom, proizvodom na bazi pšeničnog brašna (kontrolni proizvod, PPB).

Tabela 26. Hemijski sastav i energetska vrednost finalnih proizvoda (g/100 g)

Komponente proizvoda	PSK	PEK	PPB
Proteini	9,53±0,60 ^a	7,02±0,46 ^b	6,93±0,07 ^b
Lipidi	8,52±0,43 ^a	6,28±0,25 ^b	6,28±0,17 ^b
Ugljeni hidrati	68,28±1,88 ^a	75,66±0,76 ^b	75,49±0,88 ^b
Vlakna	4,1±0,12 ^a	1,18±0,06 ^b	1,5±0,26 ^b
Pepeo	2,93±0,22 ^a	0,33±0,04 ^b	0,29±0,03 ^b
Vlaga	4,98±0,08 ^a	5,63±0,75 ^{ab}	6,35±0,33 ^b
Energetska vrednost			
(kJ/100 g)	1446,01	1580,59	1576,16
(kcal/100 g)	345,60	377,78	377,07

Unutar redova, vrednosti označene istim slovima u superskriptu se statistički ne razlikuju značajno, $p > 0,05$

Ukupni ugljeni hidrati = $100 - (\% \text{ proteina} + \% \text{ lipida} + \% \text{ pepela} + \% \text{ vlage})$

*srednja vrednost ± standardna devijacija za broj replikacije $n=3$

**Faktor konverzije J u cal, 4,184

Na osnovu priloženih rezultata, zaključuje se da zamena pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive doprinosi povećanju sadržaja proteina, lipida, vlakana i pepela, ali ne i ugljenih hidrata, dok primena vodenog ekstrakta za zames testa ne doprinosi statistički značajnom povećanju sadržaja ovih komponenti čime se ostvaruje pravo na zaključak da je uticaj dodatka vodenog ekstrakta zanemarljiv.

Rezultati ukazuju na to da je seme koprive adekvatnija inkorporativna komponenta za formiranje prehrambenih proizvoda sa unapređenim nutritivnim potencijalom: sadržaj proteina bio je najveći u PSK uzorku, a u odnosu na kontrolni PPB uzorak dobijena vrednost je bila veća 37,5%, što je statistički bilo značajno ($p < 0,05$). Nešto manja vrednost sadržaja proteina dobijena je za PEK uzorak koja se statistički nije značajno ($p > 0,05$) razlikovala u odnosu na kontrolni PPB uzorak (razlika je 1,29%).

Statistički značajno veći sadržaj lipida zabeležen je u PSK uzorku koji je u odnosu na PPB bio veći 1,35 puta. Nisu zabeležene značajne razlike u sadržaju lipida između PEK i PPB uzorka.

Za razliku od sadržaja proteina i lipida, sadržaj ugljenih hidrata bio je najveći u PEK uzorku, a u odnosu na PPB razlike nisu bile značajne. Značajno manji sadržaj ugljenih hidrata dobijen je u slučaju PSK uzorka, što je očekivano, s obzirom na to da je u PEK i PPB uzorku veća količina pšeničnog brašna koja u odnosu na seme koprive doprinosi većem sadržaju ugljenih hidrata.

Sadržaj vlakana i pepela je bio najveći u PSK, što je u odnosu na PPB uzorak bilo statistički značajno veće (razlike su bile 2,7 puta i 10 puta, redom), ali nisu zabeležene značajne razlike u sadržaju ovih komponenti između PEK i PPB uzorka.

U literaturi postoje podaci o uticaju dodatka lista koprive i ekstrakta lista koprive na hemijski profil hleba (Đurović i sar., 2020). Svrha ovog istraživanja bila je poboljšanje nutritivnih svojstava finalnog proizvoda i dobijanje novog funkcionalnog proizvoda sa dodatnom vrednošću. Suprotno našim rezultatima, u ovoj studiji je najveći sadržaj proteina dobijen u slučaju dodatka ekstrakta lista koprive u količini od 5% i dodatka lista i ekstrakta u odnosu 2,5:2,5%. Dodatak lista koprive i njegovog ekstrakta imao je negativan uticaj na sadržaj celuloze i šećera, dok je uticaj na sadržaj lipida bio zanemarljiv. Osim različitog dela koprive primenjenog u radu, ovo može biti posledica različitog odnosa pšeničnog brašna i primenjenih inkorporativnih komponenti u odnosu na naša istraživanja, a i druga je vrsta proizvoda.

4.4.2. Mineralni sastav finalnih proizvoda

Profil esencijalnih minerala (Ca, Mg, Na, K, P), esencijalnih minerala u tragovima (Fe, Cu, Zn, Mn, Cr) i neesencijalnih minerala (B, Li, Sr, Si, In) u analiziranim uzorcima proizvoda prikazan je u tabeli 27. Prve dve grupe minerala su neophodne za pravilno funkcionisanje ljudskog organizma, a prema količini koja je potrebna organizmu za pravilno funkcionisanje dele se na makroelemente (minerali potrebni u velikoj količini: Ca, Mg i K) i mikroelemente (minerali potrebni u malim količinama: Fe, Cu i Zn). Rezultati su pokazali da su esencijalni minerali najzastupljeniji u uzorcima PSK i PEK proizvoda, a da je najveći sadržaj makroelemenata (Ca, Mg i K) zabeležen u PSK uzorku, a zatim u PEK. Kalcijum je u svim analiziranim uzorcima bio u višoj koncentraciji od ostalih esencijalnih minerala, a sa statistički značajno ($p < 0,05$) većom koncentracijom u PSK uzorku. Sadržaj Ca je u PPB bio manji za 64,48%, što navodi na zaključak da dodatak semena koprive značajno povećava njegovu koncentraciju u proizvodu. Statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) sadržaja Ca postoji takođe

i u slučaju dodatka ekstrakta semena koprive u proizvod, gde je PEK pokazao 2,43 puta veći sadržaj u poređenju sa PPB uzorkom. Vrednosti sadržaja drugih makroelemenata (Mg i K) u PSK i PEK uzorcima su se takođe statistički značajno razlikovale ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima u PPB uzorku.

Tabela 27. Sadržaj esencijalnih minerala, esencijalnih minerala u tragovima i neesencijalnih minerala u finalnim proizvodima (mg/100g)

	PSK	PEK	PPB
Esencijalni minerali			
Ca	790,97±2,89 ^a	682,85±1,29 ^b	280,94±1,91 ^c
Mg	81,5±0,77 ^a	71,78±1,57 ^b	35,88±2,39 ^c
Na	35,87±0,39 ^a	111,7±1,51 ^b	82,55±1,46 ^c
K	81,52±0,69 ^a	64,44±0,72 ^b	51,62±1,04 ^c
P	159,7±2,03 ^a	277,91±2,38 ^b	237,35±1,57 ^c
Esencijalni minerali u tragovima			
Fe	3,62±0,87 ^a	3,65±0,22 ^a	1,54±0,07 ^b
Cu	1,52±0,04 ^a	0,45±0,06 ^b	0,28±0,06 ^c
Zn	0,83±0,05 ^a	1,3±0,04 ^b	0,88±0,04 ^a
Mn	-	-	-
Cr	-	-	-
Neesencijalni minerali			
B	-	-	-
Li	0,39±0,02 ^a	0,39±0,03 ^a	0,22±0,02 ^b
Sr	4,03±0,2 ^a	1,95±0,67 ^b	1,04±0,01 ^b
Si	-	0,23±0,04	-
In	0,21±0,03 ^a	0,2±0,05 ^a	0,21±0,13 ^a

Unutar redova, vrednosti označene istim slovima u superskriptu se statistički ne razlikuju značajno, $p > 0,05$

Što se tiče esencijalnih minerala u tragovima, uočava se da su u svim analiziranim proizvodima prisutni samo mikroelementi (bakar, cink, gvožđe). Među njima, gvožđe (Fe) je bilo najzastupljenije u svim uzorcima. Ovo je bilo očekivano s obzirom da je Fe najzastupljeniji mikroelement u semenu koprive sa sadržajem od 13,9 mg/100g. Sadržaj Fe se statistički nije značajno razlikovao ($p > 0,05$) u uzorcima proizvoda PSK i PEK, ali postoji značajna razlika u njegovom sadržaju kod PPB uzorka, gde je sadržaj Fe bio manji za oko 57% u poređenju sa PSK i PEK.

Rezultati našeg istraživanja su u saglasnosti sa istraživanjima autora Đurović i sar. (2020) koji su analizirali sastav makroelemenata (Ca i Mg) i mikroelemenata (Fe, Cu i Zn) u hlebu obogaćenom listom koprive i ekstraktom lista koprive u različitim odnosima (0, 2,5, 5% i njihove kombinacije). Prema njihovoj studiji, Ca je takođe bio najzastupljeniji mineral u svim analiziranim uzorcima hleba, sa sadržajem koji se kretao u opsegu od 22,71 mg/100g za uzorak hleba sa pšeničnim brašnom do 816 mg/100g za uzorak hleba obogaćenog listom i ekstraktom

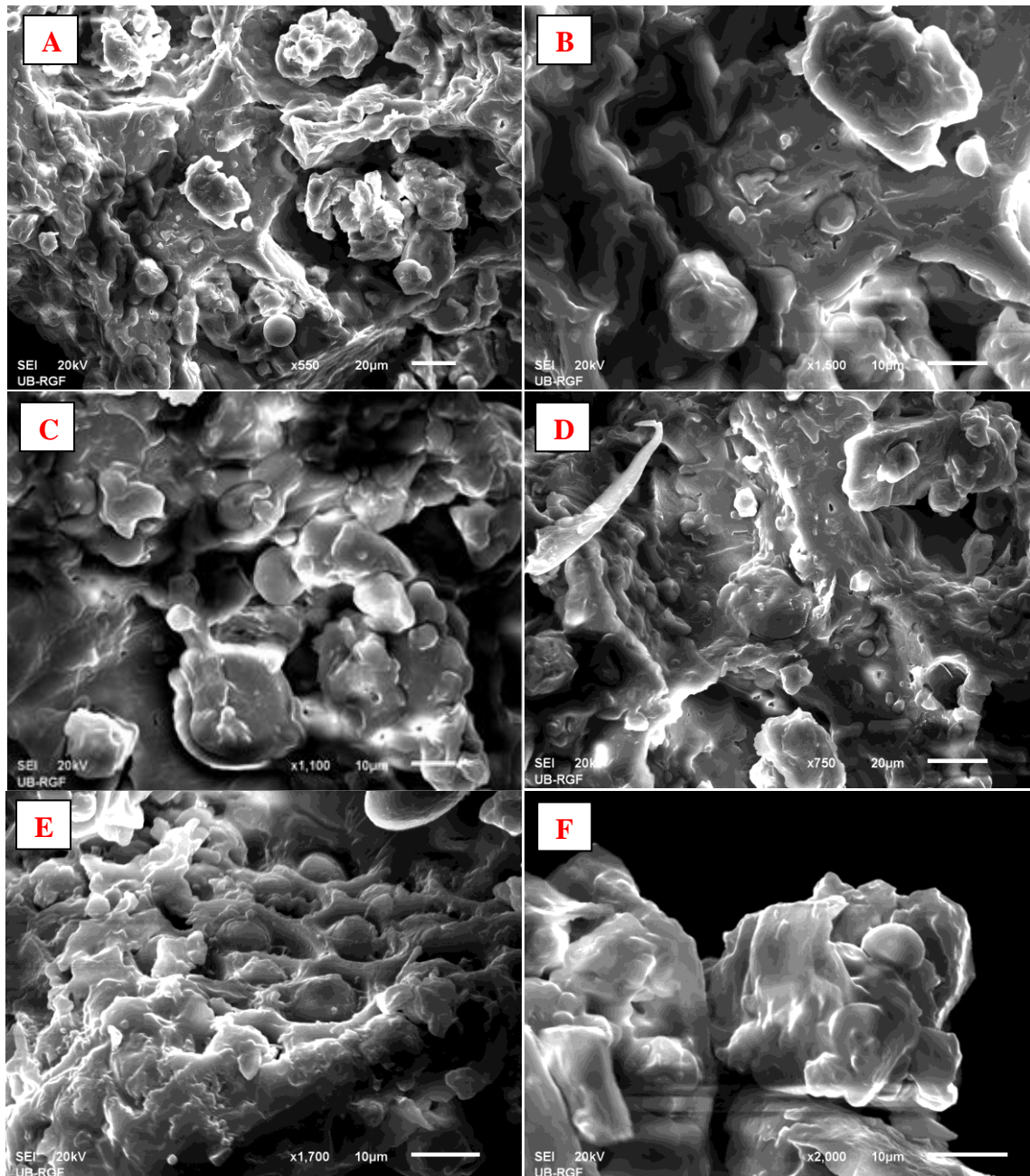
lista koprive u odnosu 5:2,5%. Njihova studija takođe demonstrira da je od analiziranih mikroelemenata, sadržaj Fe bio veći u svim analiziranim uzorcima hleba, a kretao se u opsegu od 1,18 mg/100g za uzorak hleba sa pšeničnim brašnom do 2,4 mg/100g za uzorak hleba obogaćenog listom i ekstraktom lista koprive u odnosu 5:2,5%.

4.4.3. Morfološke karakteristike finalnih proizvoda

Za proučavanje morfoloških karakteristika uzoraka pečenih proizvoda (PSK, PEK i PPB) korišćena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM). U tu svrhu, korišćeni su samleveni uzorci proizvoda, a rezultati analize prikazani na slici 22.

Posmatranjem mikrostrukture proizvoda uočava se da je matrica glutenske mreže dobro razvijena i da su granule skroba pšeničnog brašna (u obliku sočiva i kružnog oblika različitih veličina) jasno izražene u slučaju kontrolnog proizvoda (fotografija A i B). Sa dodatkom ekstrakta semena koprive ne uočavaju se velike promene (fotografija C i D), ali se primećuje promena u strukturi proizvoda u kome je izvršena zamena dela pšeničnog brašna samlevanim semenom koprive (fotografija E i F). Ova promena se najbolje uočava na fotografiji E gde se uočavaju delovi semena koprive, odnosno poligonalne ćelije sa nestruktuiranim centralnim poljima (videti sliku 14, poglavlje 4.3). Na fotografiji F komponente proizvoda nisu vidljive i čini se da su maskirane kontinuiranom fazom ili neprekidnim „gelom“. Kontinuiranu fazu između komponenata može formirati voda tokom zamesa, kao i neke rastvorljive komponente koje se nalaze na površini čestica pšeničnog brašna. Ovakva struktura može takođe biti posledica bogatstva semena koprive polisaharidima, koji imaju dobar kapacitet zadržavanja vode.

Ukoliko izvršimo poređenje mikrostrukture analiziranih proizvoda sa mikrostrukturom čistog pšeničnog brašna koja je objavljena u literaturi (Roman-Gutierrez i sar., 2002), razlike se jasno uočavaju: pšenično brašno koje nije hidratizano i podleglo termičkom tretmanu ima jasno uočljive granule skroba, koje su izgledale skoro potpuno ugrađene u glutensku mrežu koja je jako dobro razvijena. Hidratacijom pšeničnog brašna dolazi do očiglednih blagih promena na površini čestica pšeničnog brašna. Pretpostavlja se da dolazi do bubrenja čestica, jer se formira glatka površina granula skroba, usled formiranja veoma tanke vodene prevlake (Roman-Gutierrez i sar., 2002). Hidratacija pšeničnog brašna koja prethodi pečenju i formiranju proizvoda vodi do formiranja kontinuiranog sistema zasićenog vodom. Pečenjem testa, dolazi do dehidratacije i denaturacije glutena i njegove konglomeracije, što zajedno sa skrobom, stabilizuje konačan oblik proizvoda.

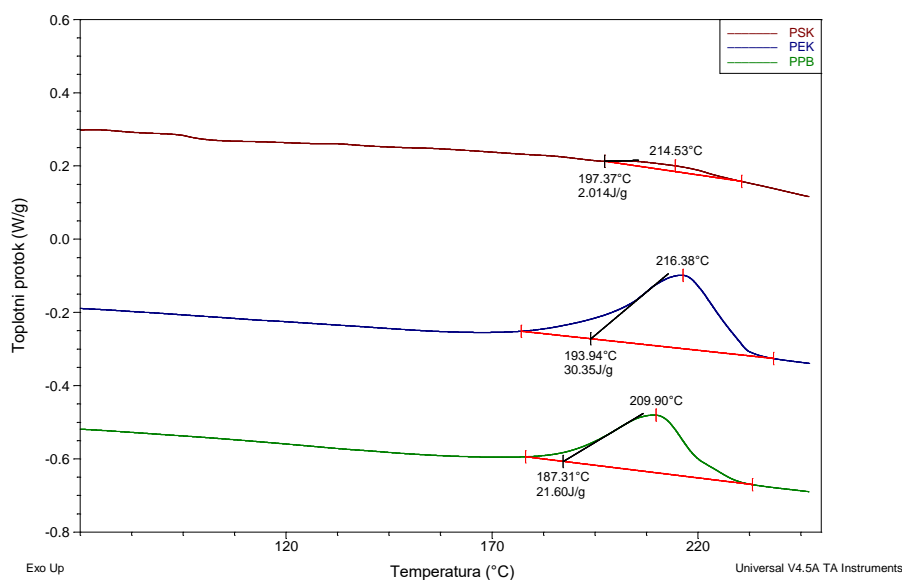


Slika 22. SEM analiza PSK, PEK i PPB. A: PPB (20µm, X550), B: PPB (10µm, X1500), C: PEK (20µm, X750), D: PEK (10µm, X1100), E: PSK (10µm, X1700), F: PSK (10µm, X2000)

4.4.4. Termooksidativna stabilnost ulja proizvoda

4.4.4.1. DSC analiza ulja proizvoda obogaćenih semenom koprive i ekstraktom od semena koprive i ulja kontrolnog proizvoda

Kao što je već pomenuto, oksidativna stabilnost u velikoj meri utiče na sveobuhvatni kvalitet i nutritivnu vrednost ulja, što istovremeno uslovljava i održivost ulja, ali i proizvoda koji ih sadrže. Da bi se procenio uticaj dodatka semena koprive i vodenog ekstrakta semena koprive na oksidativnu stabilnost proizvoda (PSK, PEK i PPB), izvršena je DSC analiza dobijenih proizvoda, a rezultati prikazani na slici 23.



Slika 23. Ne-izotermni DSC termogram ulja proizvoda (PSK, PEK i PPB) snimljen pri brzini zagrevanja od $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

Sa slike se vidi da je ulje proizvoda dobijenog nakon dodatka semena koprive najstabilnije, sa početnom temperaturom oksidacije (T_{on}) od $197,36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nešto manju stabilnost je pokazalo ulje proizvoda sa ekstraktom, čija je početna temperatura oksidacije iznosila $193,93\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iako inkorporacija vodenog ekstrakta u proizvod ne dovodi do bilo kakvih promena u sastavu i sadržaju masnih kiselina koje imaju uticaj na početak oksidacije, pretpostavlja se da je ovakav rezultat posledica termičke obrade koja može dovesti do stvaranja komponenti lipofilnog karaktera koje se primarno ne nalaze u proizvodu (Anese i sar., 1999; Nicoli i sar., 1997; Nicoli i sar., 1999), a koje imaju uticaj na oksidativnu stabilnost. Takođe, dokazano je da na sprečavanje oksidacije ulja utiču i biljni pigmenti (Đurđević, 2018), što navodi na zaključak da bi pigmenti iz ekstrakta semena koprive mogli dovesti do veće oksidativne stabilnosti ovog ulja. Osim toga, neki pigmenti su dobri sinergisti tokoferolima, što može pospešiti oksidativnu

stabilnost ulja (Đurđević, 2018). Dakle, ako se u razmatranje uključe i činjenice da oksidativni procesi ulja zavise od prisustva i sadržaja mnogobrojnih jedinjenja koja mogu delovati kao antioksidansi, a koja nisu bila predmet ovog istraživanja (tokoferoli, tokotrienoli, fitosteroli, biljni pigmenti, polifenolna jedinjenja), može se doći do zaključka da utvrđene razlike mogu biti rezultat razlika u sadržaju upravo ovih jedinjenja, kao i njihove međusobne interakcije u jednom složenom sistemu kao što su ulja prehrambenih proizvoda. U poređenju sa kontrolnim proizvodom ($T_{on} = 187,31$), početak oksidacije proizvoda sa inkorporiranim semenom koprive i proizvoda sa inkorporiranim ekstraktom bio je na većoj temperaturi, ukazujući na njihovu veću stabilnost za 5,36% i 3,53%, redom. To može biti posledica sastava masnih kiselina, ali i veće količine prisutnih antioksidanasa iz semena i njegovog ekstrakta, kao što su polifenolna jedinjenja, tokoferoli i tokotrienoli i njihovog sinergističkog dejstva.

4.4.5. Uticaj dodatka semena i ekstrakta od semena koprive na sadržaj i antioksidativni potencijal polifenolnih jedinjenja proizvoda na bazi pšeničnog brašna

Rezultati sadržaja i antioksidativnog potencijala slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja proizvoda dobijenih zamenom dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primenom vodenog ekstrakta semena koprive za zames testa, prikazani su u tabeli 28.

Rezultati koji se odnose na proizvod pre termičke obrade (nakon zamesa testa) pokazali su da zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primena vodenog ekstrakta za zames testa statistički značajno ($p < 0,05$) povećava sadržaj polifenolnih jedinjenja, kako slobodnih tako i vezanih: u poređenju sa PPB, sadržaj slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja u PSK je bio veći za 50,2 odnosno 74,3%, dok je u PEK sadržaj veći za 13,9 i 8,9%, redom. Rezultati koji se odnose na proizvode nakon termičke obrade (gotovi proizvod) pokazali su da u poređenju sa PPB, PSK ima 2,1 i 2,5 puta veći sadržaj slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja, redom, dok PEK ima 9,9 i 28,0% veći sadržaj, a razlike su bile statistički značajne ($p < 0,05$). Đurović i sar. (2020) istraživali su uticaj dodatka različitog udela lista i ekstrakta lista koprive na nutritivna i funkcionalna svojstva proizvoda (hleb) u cilju dobijanja novog funkcionalnog proizvoda. Njihova istraživanja pokazuju da sa povećanjem udela lista i ekstrakta lista koprive dolazi do povećanja sadržaja polifenolnih jedinjenja i da je proizvod sa najvećim udelom lista i njegovog ekstrakta imao najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja. Da je proizvod sa dodatkom lista koprive poželjniji po pitanju sadržaja polifenolnih jedinjenja u odnosu na proizvod sa ekstraktom lista, takođe je demonstrirano u njihovoj studiji. Ovakvi rezultati navode na zaključak da je primena čistog biljnog materijala kao funkcionalnog sastojka

u formulisanju proizvoda pogodnija za dobijanje proizvoda sa boljim funkcionalnim svojstvima u poređenju sa njihovim ekstraktima.

Tabela 28. Sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativni potencijal proizvoda sa dodatkom semena i ekstrakta semena koprive

	PSK*	PSK**	PEK*	PEK**	PPB*	PPB**
Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)***						
Slobodni	1991,75±53,59 ^a	2537,18±33,54 ^b	1509,95±10,62 ^c	1300,87±12,79 ^d	1325,62±22,12 ^d	1182,69±7,2 ^e
Vežani	351,08±3,69 ^a	327,44±1,61 ^a	219,29±2,83 ^b	166,01±8,99 ^c	201,36±2,27 ^b	129,68±4,75 ^d
IC₅₀, DPPH test ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)****						
Slobodni	1,54±0,08 ^a	1,21±0,09 ^b	31,22±0,73 ^c	5,96±0,1 ^d	33,01±2,37 ^e	11,11±1,12 ^f
Vežani	1,01±0,19 ^a	0,86±0,06 ^b	8,82±0,21 ^c	2,46±0,03 ^d	12,36±0,06 ^e	3,98±0,09 ^f
IC₅₀, test redukcione snage ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)****						
Slobodni	12,31±0,29 ^a	7,16±0,18 ^b	14,53±1,05 ^c	8,96±0,22 ^d	18,52±0,09 ^e	11,2±0,21 ^f
Vežani	3,37±0,04 ^a	2,03±0,21 ^b	4,55±0,38 ^c	5,04±0,44 ^d	4,82±0,08 ^{cd}	6,84±0,06 ^f

Unutar redova, vrednosti označene istim slovima se ne razlikuju značajno, $p > 0,05$

*proizvod pre termičke obrade (proizvod nakon zamesa)

**proizvod nakon termičke obrade (finalni proizvod)

*** μg ekvivalent galne kiseline po g proizvoda

****mg suvog ostatka po mL ekstrakta

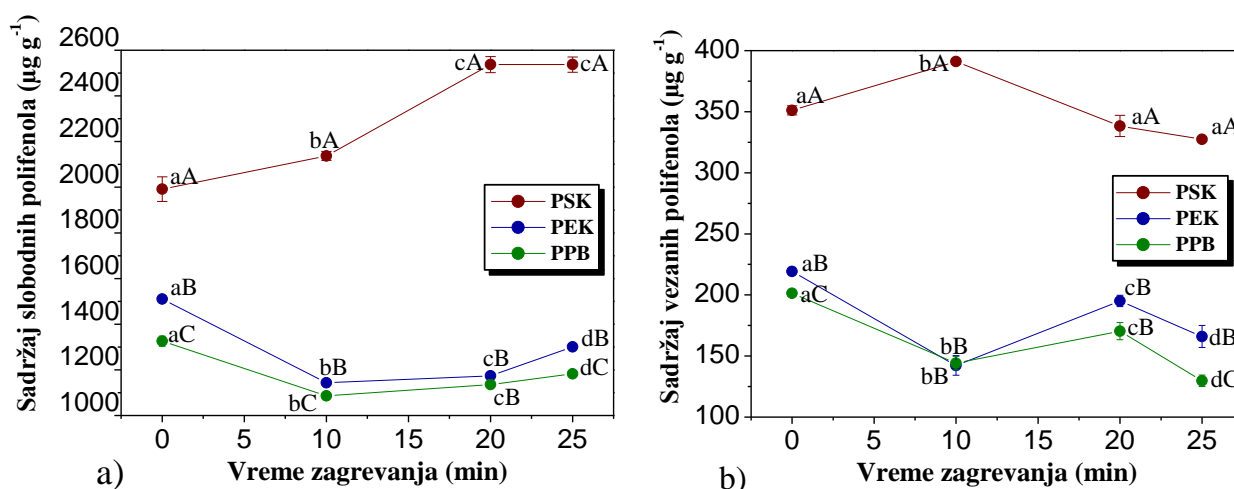
Rezultati antioksidativnog potencijala koji se odnose na proizvode pre termičke obrade pokazali su da zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive (PSK) povećava antioksidativni potencijal i slobodnih i vežanih polifenolnih jedinjenja: u poređenju sa PPB, DPPH je bio 21,4 i 12,2 puta veći, dok je redukciona snaga bila veća za 50,4 i 43,0%, redom. Primena vodenog ekstrakta semena koprive (PEK) takođe je doprinela povećanju antioksidativnog potencijala i slobodnih i vežanih polifenolnih jedinjenja u poređenju sa PPB: DPPH je bio veći 1,06 i 1,4 puta, a redukciona snaga slobodnih i vežanih polifenolnih jedinjenja bila je veća za 27,5% i 5,9%, redom.

Poređenje proizvoda je pokazalo da PSK ima najveći antioksidativni potencijal nakon termičke obrade, zatim PEK i na kraju PPB, ukazujući na to da zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive povećava DPPH slobodnih i vežanih polifenolnih jedinjenja 9,2 i 4,6 puta, a redukcionu snagu 1,6 i 3,4 puta, redom. Sa druge strane, primena vodenog ekstrakta semena koprive za zames testa povećava DPPH slobodnih i vežanih polifenolnih jedinjenja 1,9 i 1,6 puta, redom, a redukcionu snagu 1,25 i 1,36 puta. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjem Ajila i sar. (2008) koji su izvestili da je veći nivo brašna kore manga u keksu doveo do većeg DPPH. Mnoge studije koje su se bavile svojstvima funkcionalnih komponenata predlažu prirodna polifenolna jedinjenja kao idealnu zamenu za konzervanse u formulacijama hrane zbog svojih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava (Fazary i Ju, 2007; Oliveira i sar., 2012; Ou i Kwok, 2004).

4.4.6. Uticaj termičke obrade na sadržaj i antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenola proizvoda obogaćenih semenom i ekstraktom semena koprive

4.4.6.1. Sadržaj slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja proizvoda tokom termičke obrade

Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama sadržaja slobodnih i vezanih polifenola PSK, PEK i PPB, kao i njihove promene tokom termičke obrade od 25 min na konstantnoj temperaturi od 180 °C, prikazane su na slici 24.



Slika 24. Promene u sadržaju slobodnih (a) i vezanih (b) polifenola u PSK, PEK i PPB tokom termičke obrade; mala slova označavaju rezultate Tukey-evog HSD testa tokom vremena zagrevanja unutar svakog proizvoda; velika slova označavaju Tukey-ev HSD test između proizvoda za određeno vreme; ista slova pokazuju da nema značajne razlike ($p > 0,05$)

Rezultati su pokazali da sadržaj slobodnih i vezanih polifenola varira u zavisnosti od vremena termičke obrade. Na slici 24a prikazano je da se sadržaj slobodnih polifenola u PSK značajno ($p < 0,05$) povećava tokom 20 minuta termičke obrade. Povećanje je bilo sporije u prvih 10 minuta, a brže u narednih 10, pri čemu je maksimalna vrednost od 2537,18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ postignuta nakon 20 minuta, a dalje promene nisu statistički značajne. Ovo može biti posledica toga što se u prvih 10 minuta oslobađaju neka nefenolna redukujuća jedinjenja, koja reaguju sa Folin-Ciocalteu reagensom i povećavaju sadržaj polifenola (Ikawa i sar., 2003). Sa druge strane, u periodu od 10 do 20 minuta obrade dolazi do bržeg povećanja sadržaja polifenola verovatno zbog toga što se deo vezanih polifenola oslobađa i javlja kao slobodan. U prilog tome govori i činjenica da se u ovom periodu smanjuje sadržaj vezanih polifenola, što se može videti na slici

24b. Konstantan sadržaj polifenola u periodu od 20 do 25 minuta termičke obrade može se objasniti termičkom stabilnošću polifenola iz semena koprive na ispitivanoj temperaturi.

U PEK uzorku je sadržaj slobodnih polifenola značajno smanjen ($p < 0,05$) u prvih 10 minuta, a u narednih 15 minuta je uočen statistički značajan ($p < 0,05$) oporavak od približno 12%, ali početni sadržaj nije postignut. U PPB uzorku su uočene slične promene kao u PEK, što ukazuje na to da su slobodni polifenoli pšeničnog brašna i polifenoli ekstrahovani iz semena koprive verovatno pretrpeli nepovratnu termičku degradaciju.

Slika 24b pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje sadržaja vezanih polifenola u PSK uzorku u prvih 10 minuta pečenja. Međutim, u narednih 15 minuta ovaj sadržaj se značajno smanjuje, za 16,27%. Za razliku od PSK, u PEK uzorku sadržaj vezanih polifenola značajno opada u prvih 10 minuta, zatim raste u narednih 10, a nakon toga ponovo opada. Postignuti sadržaj je bio manji od početnog. Promena vezanih polifenola u PPB uzorku, kao i u slučaju slobodnih polifenola, bila je slična onoj kod PEK. Ovo ukazuje da se polifenoli ekstrahovani iz semena koprive menjaju na isti način kao i polifenoli pšeničnog brašna tokom termičke obrade, verovatno zbog sličnog polifenolnog sastava.

Evidentno je da je tokom termičke obrade dolazilo do povećanja i smanjenja sadržaja polifenola. Povećanje sadržaja slobodnih polifenola tokom termičke obrade može biti posledica disocijacije vezanog polifenolnog dela (Dewanto i sar., 2002a), praćene reakcijama polimerizacije i oksidacije, kao i formiranjem novih polifenolnih jedinjenja (Ifie i Marshall, 2018; Ragaee i sar., 2014) koji nisu bili prisutni pre termičke obrade. Formiranje proizvoda Maillardove reakcije (eng., Maillard reactions products, MPR) takođe može doprineti povećanju sadržaja polifenola. Ovo je naročito posledica određenih produkata Maillardovih reakcija koji imaju reduktonsku strukturu i reaguju sa Folin-Ciocalteu reagensom, što dovodi do povećanja sadržaja slobodnih polifenola (Žilić i sar., 2016). Sa druge strane, neke studije, poput Fernandes i sar. (2020), pokazale su da sastav polifenola u biljnim ekstraktima može inhibirati Maillardove reakcije i inhibirati formiranje naprednih krajnjih proizvoda glikacije, što može ukazivati na značaj polifenolnog sastava, sadržaja i strukture matriksa hrane od kojih može zavisiti i ponašanje prema produktima Maillardovih reakcija. Smanjenje sadržaja polifenola može biti posledica velikog gubitka polifenolnih jedinjenja usled njihove nestabilnosti na visokim temperaturama.

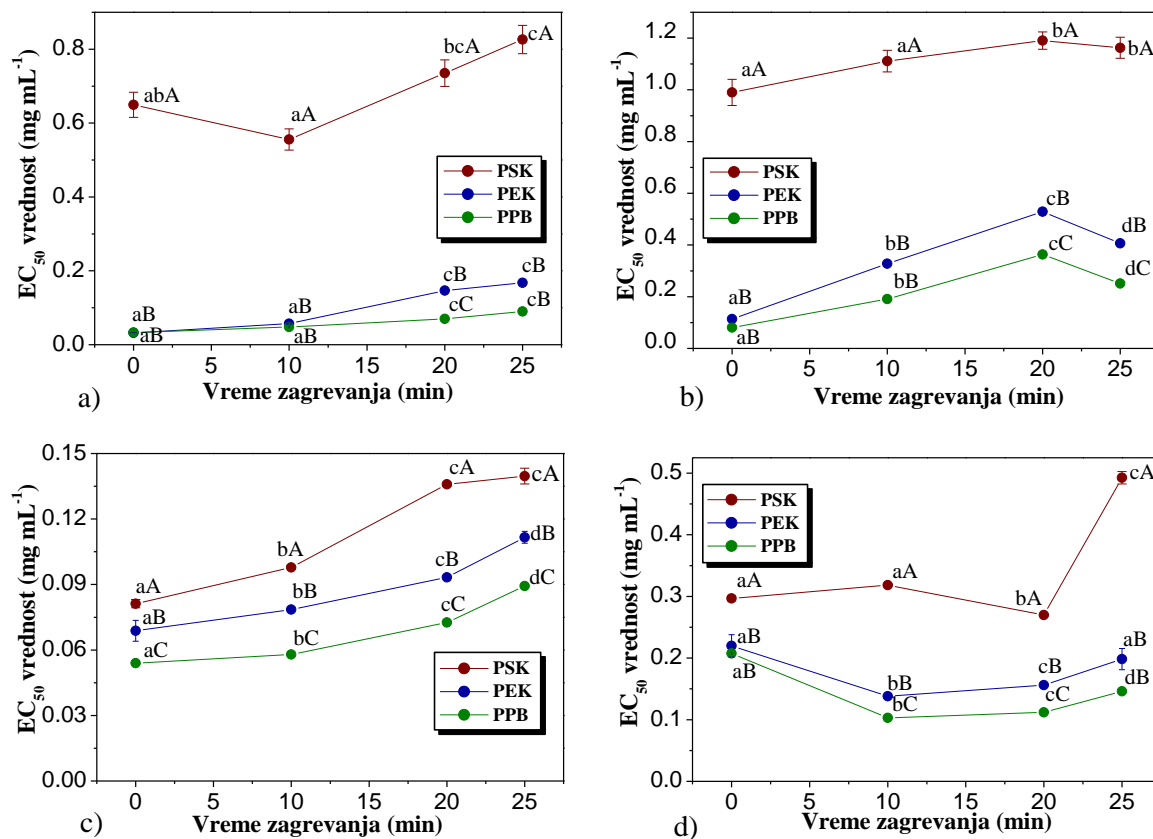
Na kraju termičke obrade, sadržaj slobodnih polifenola u PSK uzorku je bio značajno veći ($p < 0,05$) i iznosio je $2537,18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, što je 21,5% više od početnog nivoa. Sa druge strane, sadržaj slobodnih polifenola u PEK i PPB je neznatno drugačiji, značajno je niži od njihovog početnog (za 13,85% i 10,8%, redom). Termička obrada je dovela do smanjenja sadržaja

vezanih polifenola u svim proizvodima (u PSK za 6,7%, PEK za 24,3 i u PPB za 35,6%). Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Han i Baik (2008) koji su utvrdili da je kuvanjem sadržaj polifenola u leći, leblebiji i grašku smanjen za 22-42%, i sa istraživanjima autora Nikolić i sar. (2016) koji su utvrdili da je termičkom obradom sadržaj vezanih polifenola u testu od pšeničnog brašna obogaćenog vrganjem smanjen za približno 7%.

4.4.6.2. Antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja proizvoda tokom termičke obrade

Da bi se prikazale promene antioksidativnog potencijala tokom termičke obrade, izračunate su recipročne vrednosti EC_{50} , pošto recipročna vrednost EC_{50} pokazuje odgovarajuću zavisnost između EC_{50} i antioksidativnog potencijala. Na slici 25 prikazana je zavisnost recipročnih vrednosti EC_{50} od vremena zagrevanja (pečenja). Slike 25a i b opisuju promene tokom termičke obrade u DPPH slobodnih i vezanih polifenola, redom, a slike 25c, d promene redukcione snage slobodnih i vezanih polifenola, redom.

Na slici 25a se može videti da u slučaju PSK uzorka dolazi do smanjenja DPPH slobodnih polifenola za 14,4% u prvih 10 minuta, ali smanjenje nije statistički značajno ($p > 0,05$). Tokom dalje obrade do 25 minuta primećuje se značajno povećanje, za približno 32%. Statistički značajno smanjenje redukcione snage vezanih polifenola u PEK i PPB (slika 25d) za 37,1% i 50,4%, redom, primećeno je u prvih 10 minuta. Tokom dalje obrade, redukciona snaga oba proizvoda je oporavljena za približno 30%, ali nije dostigla početnu vrednost. Početno smanjenje antioksidativnog potencijala može se pripisati termičkoj degradaciji prirodnih antioksidanasa, kao i formiranju ranih MPR sa prooksidativnim svojstvima koja su uglavnom ustanovljena kod MPR sa niskom molekulskom masom, dok se antioksidativna svojstva uglavnom pripisuju MPR sa visokom molekulskom masom, koji se formiraju u podmaklim fazama reakcije (Hofmann i sar., 1999). Može se očekivati da MPR utiču na produženje roka trajanja i stabilnost dobijenih proizvoda, što iziskuje dalju eksperimentalnu analizu. Bressa i sar. (1996) su izvestili da MPR dobijeni tokom prvih 20-30 minuta kuvanja pokazuju visok antioksidativni potencijal, što ukazuje na to da bi ovi proizvodi mogli da utiču na oksidativnu stabilnost i rok trajanja prerađene hrane. Ove rezultate su takođe podržali Nooshkam i sar. (2019).



Slika 25. Promene antioksidativnog potencijala slobodnih i vezanih polifenola u proizvodima tokom termičke obrade, ispitane DPPH metodom (a, b); testom redukcione snage (c, d); mala slova označavaju rezultate Tukey-evog HSD testa tokom vremena zagrevanja unutar svakog proizvoda; velika slova označavaju Tukey-ev HSD test između proizvoda; ista slova ukazuju da nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$)

DPPH slobodnih polifenola PEK i PPB uzorka (slika 25a) pokazao je blago održanje (uravnoteženost) antioksidativnog potencijala u prvih 10 minuta i stabilan porast do kraja procesa. Održanje antioksidativnog potencijala može se pripisati balansiranju između gubitka prirodnih antioksidanasa i istovremenog stvaranja jedinjenja sa novim ili poboljšanim antioksidativnim svojstvima, dok je povećanje antioksidativnog potencijala verovatno posledica formiranja MPR-a i poboljšanja antioksidativnih svojstava prirodnih jedinjenja. Ovu pojavu takođe podržavaju i Anese i sar. (1999), Nicoli i sar. (1997) i Nicoli i sar. (1999). Uočeno je blago zadržavanje antioksidativnog potencijala u slučaju redukcione snage vezanih polifenola PSK uzorka (slika 25d) u prvih 10 minuta, da bi se u daljem toku obrade najpre smanjio (u narednih 10 minuta), a zatim značajno povećao (u poslednjih 5 minuta) i prevazišao početnu vrednost.

U slučaju DPPH vezanih polifenola, u svim proizvodima (slika 25b) je primećeno konstantno povećanje antioksidativnog potencijala u prvih 20 minuta, a blagi pad primećen je u poslednjih 5 minuta. Dobiene vrednosti nakon termičke obrade bile su veće od početnih. Primećeni pad u PSK uzorku nije statistički značajan ($p > 0,05$), dok kod PEK i PPB postoji statistička značajnost, što ukazuje na to da su vezani polifenoli iz semena koprive stabilniji tokom termičke obrade od vezanih polifenola iz pšeničnog brašna i polifenola ekstrahovanih iz semena koprive.

U slučaju redukcione snage slobodnih polifenola (slika 25c), u svim proizvodima je uočeno samo stalno povećanje antioksidativnog potencijala tokom ukupnog trajanja primenjene termičke obrade. Kod PEK i PPB uzorka ovo povećanje je statistički značajno ($p < 0,05$) u periodu 0-25 minuta, a kod PSK u periodu 0-20 minuta, dok u periodu 20-25 minuta nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$) kada je u pitanju PSK uzorak.

Rezultati su pokazali da se tokom termičke obrade dešavaju različite promene antioksidativnog potencijala, u zavisnosti od oblika polifenola (slobodni ili vezani), porekla polifenola (iz pšenice, ekstrakta ili semena koprive) i sprovedenih antioksidativnih testova (DPPH ili redukciona snaga). U studiji Nayak i sar. (2015) različiti antioksidativni testovi (DPPH, FRAP i ABTS) takođe su imali različite efekte na antioksidativni potencijal termički obrađenih proizvoda, a DPPH test je takođe doprineo povećanju antioksidativnog potencijala, za razliku od druga dva testa.

Evidentno je da je na kraju termičke obrade antioksidativni potencijal slobodnih i vezanih polifenola proučavanih DPPH metodom povećan kod svih ispitivanih proizvoda. Naime, na kraju termičke obrade antioksidativni potencijal slobodnih polifenola u PSK uzorku je povećan za 21,43%, dok je antioksidativni potencijal PEK i PPB uzorka povećan znatno više, otprilike za 80% i 66%, redom. Antioksidativni potencijal slobodnih polifenola analiziran testom redukcione snage takođe se povećao tokom termičke obrade u PSK uzorku za 41,8%, a u PEK i PPB za 38,3 i 39,5%. Ova povećanja su bila statistički značajna ($p < 0,05$).

U slučaju vezanih polifenola, DPPH u PSK nakon termičke obrade povećao se za 14,8% ($p < 0,05$), a u PEK i PPB, kao i u slučaju slobodnih polifenola, znatno više, za 72,1% i 67,8%, redom. Test redukcione snage je pokazao drugačiji odgovor na termičku obradu: redukciona snaga vezanih polifenola u PSK se povećala tokom termičke obrade za približno 39%, ali je u PEK i PPB smanjena za 9,7, odnosno 29,5%. Ovo je verovatno posledica nižeg sadržaja vezanih polifenola sa redukcionsom snagom u pšeničnom brašnu i ekstraktu semena koprive nego u samom semenu koprive. Takođe, Ragaee i sar. (2014) su objavili da se odnos između različitih polifenola može promeniti usled termičke degradacije, uzrokujući pojavu jedinjenja sa manjom

redukcijom snagom. Povećanje antioksidativnog potencijala za 44% je takođe dobijeno nakon termičke obrade kukuruza šećerca na 100-121 °C u trajanju od 10 do 50 minuta, što je dokumentovano u studiji koju su vršili Dewanto i sar. (2002b). Suprotno ovim rezultatima, Eadmusik i sar. (2019) izvestili su smanjenje DPPH slobodnih polifenola ekstrahovanih iz lista Yanang (*Tiliacora triandra*) tokom zagrevanja od 15 minuta na različitim temperaturama zagrevanja, a razlog može biti različita priroda endogenih i toplotom indukovanih antioksidanasa i kraće vreme termičke obrade.

4.4.7. Sastav polifenolnih jedinjenja u proizvodima sa semenom koprive i ekstraktom semena koprive

Radi dobijanja detaljnijih podataka o sastavu polifenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima finalnih proizvoda (PSK, PEK i PPB), izvršena je HPLC analiza, a rezultati srednjih vrednosti sadržaja sa standardnim devijacijama prikazani u tabeli 29. HPLC hromatogrami fenolnih kiselina u ekstraktima slobodnih i vezanih polifenola dobijenih iz PSK, PEK i PPB prikazani su na slici P₂₄ i P₂₅, redom. Iz tabele se vidi da se među identifikovanim i kvantifikovanim jedinjenjima u ekstraktima slobodnih i vezanih polifenola nalaze uglavnom fenolne kiseline, dok je od flavonoida prisutan samo naringin (glikozidni oblik naringenina). Takođe se primećuje da se sadržaj svih jedinjenja kvantifikovanih u ekstraktu slobodnih polifenola PSK, PEK i PPB uzoraka statistički značajno razlikuje ($p < 0,05$) u poređenju sa njihovim sadržajem u ekstraktima vezanih polifenola.

Posmatrajući rezultate ekstrakata slobodnih polifenola, uočava se da je u PSK, PEK i PPB kvantifikovano šest, tri i dve fenolne kiseline, redom, dok je naringin prisutan u svim proizvodima. Od fenolnih kiselina, najzastupljenija je hlorogena kiselina čiji sadržaj statistički značajno opada ($p < 0,05$) u nizu PSK>PEK>PPB. U poređenju sa PPB, u PSK i PEK je sadržaj hlorogene kiseline bio 10,3 i 2,02 puta veći, redom. Ovaj rezultat ukazuje na to da zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primena vodenog ekstrakta za zames testa doprinosi povećanju hlorogene kiseline u proizvodima. Treba istaći da je u PSK uzorku udeo hlorogene kiseline u ukupnom sadržaju identifikovanih polifenolnih jedinjenja bio čak 51,27%, dok je za PEK ova vrednost iznosila 37,17%. Pored hlorogene kiseline, galna kiselina je takođe prisutna u izvesnim količinama, i to: u poređenju sa PPB, sadržaj galne kiseline u PSK je bio veći približno 8 puta, dok je u PEK sadržaj bio veći 1,57 puta. Primećuje se da su kafeinska, elaginska i kumarinska kiselina detektovane samo u PSK, ukazujući na to da ove fenolne kiseline potiču iz semena koprive. Smatra se da je prisustvo siringinske kiseline u PSK i PEK

takođe posledica dodatka semena i ekstrakta semena koprive, s obzirom na to da nije detektovana samo u proizvodu od pšeničnog brašna (PPB).

Tabela 29. Sastav polifenolnih jedinjenja u ekstraktima slobodnih i vezanih polifenola finalnih proizvoda (PSK, PEK i PPB) određen HPLC metodom sa izokratnim eluiranjem

Sadržaj ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)*	Ekstrakt slobodnih polifenola			Ekstrakt vezanih polifenola		
	PSK	PEK	PPB	PSK	PEK	PPB
Galna kiselina	361,5±6,17 ^a	72,32±3,1 ^b	45,89±1,26 ^c	2,04±0,07 ^d	2,74±0,06 ^d	1,18±0,08 ^d
Hlorogena kiselina	692,12±14,29 ^a	135,99±5,34 ^b	67,18±2,69 ^c	3,55±0,05 ^d	19,99±1,42 ^c	6,61±0,65 ^{de}
Kafeinska kiselina	65,39±8,63 ^a	nd	nd	4,76±0,06 ^b	nd	nd
Siringinska kiselina	10,64±0,57 ^a	1,34±0,19 ^b	nd	5,74±0,1 ^c	nd	nd
Elaginska kiselina	90,97±2,89 ^a	nd	nd	7,34±0,09 ^b	nd	nd
Kumarinska kiselina	2,21±0,33 ^a	nd	nd	0,53±0,04 ^b	1,27±0,21 ^c	1,37±0,08 ^c
<i>Trans</i> -ferulinska kiselina	nd	nd	nd	6,56±0,18 ^a	1,14±0,07 ^b	2,89±0,2 ^c
Protokatehuinska kiselina	nd	nd	nd	10,88±0,35 ^a	9,32±0,15 ^a	10,57±1,69 ^a
Naringin	127,1±5,93 ^a	156,17±1,98 ^b	143,57±6,21 ^c	3,98±0,7 ^d	2,12±0,1 ^d	2,26±0,26 ^d
NID (rt 12,37 min)	nd	nd	nd	82,46±3,43 ^a	2,23±0,03 ^b	6,08±0,89 ^c
Ukupno	1349,93	365,82	256,64	127,84	38,81	30,96
Ukupni sadržaj detektovanih jedinjenja (slobodni + vezani)	1462,91	391,92	287,6			

Unutar redova, vrednosti označene različitim slovima (a,b) se značajno razlikuju, $p < 0,05$

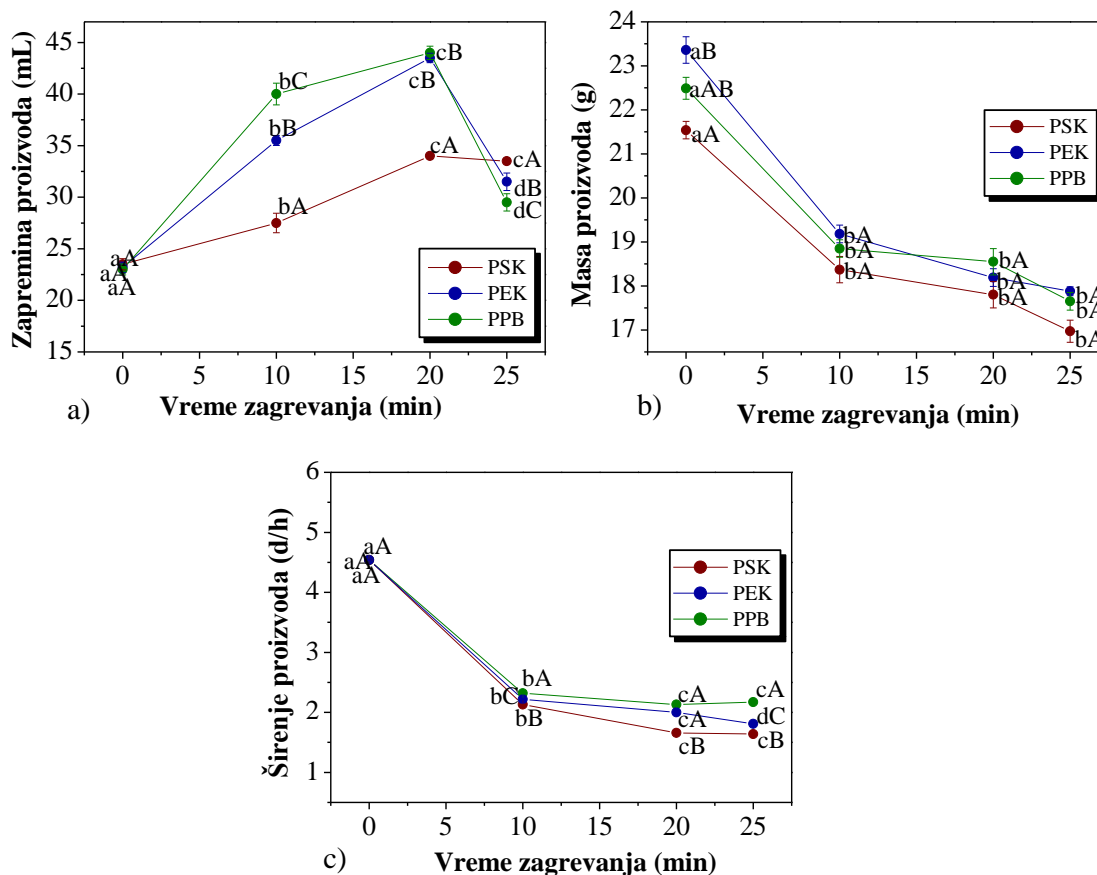
* μg fenolnog jedinjenja po g proizvoda

Rezultati ekstrakata vezanih polifenola ukazuju da ukupni sadržaj identifikovanih polifenola opada u nizu PSK>PEK>PPB, a da je u ekstraktu PSK kvantifikovano osam, dok u PEK i PPB pet fenolnih kiselina. Evidentno je da je u PSK najzastupljenija bila protokatehuinska, čiji je sadržaj u poređenju sa PPB bio neznatno veći (1,02 puta), što statistički nije bilo značajno ($p > 0,05$). U PEK je sadržaj hlorogene kiseline bio najveći, a u poređenju sa PPB razlika u sadržaju nije bila statistički značajna (2,02 puta). Rezultati takođe pokazuju da su kafeinska, siringinska i elaginska kiselina detektovane samo u PSK, što potvrđuje gore navedenu činjenicu da ove fenolne kiseline potiču iz semena koprive. Kao i u slučaju ekstrakata slobodnih polifenola, naringin je bio zastupljen u svim proizvodima, ali u značajno manjim količinama. Za razliku od ekstrakata slobodnih polifenola, u ekstraktima vezanih polifenola detektovane su i *trans*-ferulinska i protokatehuinska kiselina, kao i jedinjenje NID čija je detekcija ustanovljena u 12,37 minutu.

4.4.8. Tehnološka svojstva dobijenih prehrambenih proizvoda

Pored hemijskog sastava i antioksidativnog potencijala, analizirani su i parametri tehnološkog kvaliteta, kao što su zapremina, širenje (odnos d/h) proizvoda i senzorna analiza.

Rezultati istraživanja zapremine, mase i širenja (odnos d/h) proizvoda tokom termičke obrade prikazani su na slikama 26a-c, redom.



Slika 26. Promene tehnoloških svojstava proizvoda tokom termičke obrade, ispitane po zapremini (a); masi (b); vrednost „širenja“ (c); mala slova označavaju rezultate Tukey-evog HSD testa tokom vremena zagrevanja unutar svakog proizvoda; velika slova označavaju Tukey-ev HSD test između proizvoda; ista slova ukazuju da nema značajne razlike ($p > 0,05$)

Rezultati promene zapremine pokazuju postojanje tri perioda: prvi od 0 do 10 minuta, drugi od 10 do 20 minuta i treći od 20 do 25 minuta. Na početku, u prvom periodu, primećuje se konstantan i statistički značajan ($p < 0,05$) porast zapremine u svim uzorcima (slika 26a), usled početka prodiranja toplog vazduha unutar proizvoda. U drugom periodu, zapremina nastavlja da raste i dostiže maksimum u dvadesetom minutu termičke obrade. Tokom ova dva perioda, voda isparava iz proizvoda, što potvrđuje smanjenje mase u svim uzorcima (slika 26b). Isparavanje vode se javlja zbog toplote koja prodire u proizvode (Sani i sar., 2014). U trećem periodu, došlo je do statistički značajnog smanjenja zapremine PEK i PPB uzorka, dok se

zapremina PSK uzorka neznatno smanjila (nema statistički značajne razlike, $p > 0,05$). Smanjenje zapremine može biti povezano sa oslobađanjem stvorenog gasa ugljen-dioksida. Voda nastavlja da isparava iz svih uzoraka proizvoda i tokom trećeg perioda, ali kao i u slučaju zapremine, ove razlike nisu statistički značajne (slika 26b). Posmatrajući razliku među proizvodima, uočava se da postoje statistički značajne razlike u zapremini, a najveću je zapreminu pokazao PSK.

Promena vrednosti „širenja“ tokom termičkog procesa pokazuje statistički značajno povećanje u svim uzorcima u periodu do 20 minuta, dok u periodu od 20 do 25 minuta u PPB vrednost „širenja“ nastavlja da raste, a razlike su statistički značajne ($p < 0,05$). U slučaju PSK i PEK, promena vrednosti „širenja“ u ovom periodu nije statistički značajna, pa se može smatrati da nema promene.

Vrednost „širenja“ je vrednost koja se odnosi na pravilnost oblika proizvoda, pri čemu niža vrednost ukazuje na veću pravilnost oblika proizvoda. Prema tome, najveću pravilnost u obliku je imao uzorak PSK, a najmanju PEK. Razlog tome mogu biti strukturne komponente kao što su: proteini i vlakna koja se u većoj meri unose sa semenom koprive i doprinose boljoj strukturi proizvoda i većoj pravilnosti oblika proizvoda.

4.4.8.1. *Senzorna analiza proizvoda*

4.4.8.1.1. *Boja proizvoda sa semenom koprive i ekstraktom semena koprive*

Tvrđi se da je boja glavno fizičko svojstvo hrane, na osnovu dokaza iznetih u literaturi i da dobro korelira sa drugim fizičkim, hemijskim i senzornim svojstvima kvaliteta proizvoda. U stvari, u pogledu senzorskog kvaliteta i prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača, boja ima važnu ulogu u kreiranju novih proizvoda u prehrambenoj industriji (Mendoza i sar., 2006).

Učešće pojedinih tonova boje i svetloća površine proizvoda izražava se vrednostima a^* , b^* i L^* , određenim na tristimulusnom fotokolorimetru. Rezultati određivanja površinske boje tri uzorka proizvoda (proizvod sa semenom koprive, proizvod sa ekstraktom semena koprive i kontrolni proizvod) prikazani su u tabeli 30.

Tabela 30. *Razlike u parametrima boje uzoraka proizvoda*

	PSK	PEK	PPB
L^*	40,65±1,35 ^a	72,94±1,27 ^b	77,34±1,97 ^c
a^*	2,13±0,43 ^a	3,27±0,30 ^b	1,05±0,31 ^c
b^*	15,45±1,65 ^a	25,59±1,21 ^b	25,15±1,73 ^b

L^* - svetloća; a^* - crveni ton; b^* - žuti ton

Najmanja svetloća (L^*) uočena je kod proizvoda sa semenom koprive. Uočava se trend smanjenja svetloće proizvoda sa dodatkom i ekstrakta semena koprive i samog semena koprive.

Učešće crvenog tona (a^*) u boji površine proizvoda znatno je veće kod proizvoda sa ekstraktom semena koprive u odnosu na kontrolni uzorak, dok je ta razlika manje izražena u slučaju proizvoda sa semenom koprive. Povećanje učešća crvenog tona registruje se i kod proizvoda sa ekstraktom semena koprive u odnosu na kontrolni uzorak proizvoda. Učešće crvenog tona bilo je nisko u svim uzorcima proizvoda.

Učešće žutog tona (b^*) u boji površine proizvoda neznatno varira, statistički značajna razlika je kod proizvoda sa semenom koprive u odnosu na proizvod sa ekstraktom koprive i kontrolni uzorak.

Uopšteno, proizvod sa semenom koprive ima manju svetloću i manje učešće žutog tona u boji u odnosu na kontrolni uzorak.

Ukupan utisak boje izraženiji je kod proizvoda sa semenom koprive i može se zaključiti da su ovi uzorci ostvarili bolji senzorski kvalitet sa stanovišta boje u odnosu na kontrolne uzorke.

4.4.8.1.2. Senzorska ocena proizvoda određena metodom bodovanja

Proizvod sa semenom koprive statistički se značajno razlikuje po svim parametrima kvaliteta koji su uzeti kao reprezentativni za senzorska svojstva, što se može videti i na slici 27.



Slika 27. Vizuelni prikaz proizvoda sa semenom koprive, ekstraktom semena koprive i kontrolnog proizvoda

Izgled, tekstura, miris i ukus su sa najvećom ocenom ocenjeni kod uzoraka sa semenom koprive. Miris i ukus su veoma prijatno zaokruženi u proizvodu sa samlevenim semenom koprive. Senzorski kvalitet kontrolnog proizvoda i proizvoda sa ekstraktom od semena koprive su u velikom delu identični.

Tabela 31. Rezultati senzorske ocene proizvoda obogaćenih semenom koprive i ekstraktom od semena koprive

Senzorska svojstva	PSK	PEK	PPB
Izgled (oblik, homogenost, površina)	4,48±0,38 ^a	3,55±0,38 ^{bc}	3,82±0,24 ^b
Tekstura (struktura, čvrstoća, prhkost)	4,75±0,65 ^a	3,68±0,28 ^b	3,54±0,42 ^b
Tekstura (žvkljivost)	4,12±0,65 ^a	3,57±0,28 ^b	3,34±0,79 ^c
Miris	4,15±0,62 ^a	3,25±0,58 ^b	3,18±0,67 ^b
Ukus	4,42±0,93 ^a	4,15±1,34 ^b	4,12±1,42 ^b
Kvalitetni broj	4,45	3,65	3,58

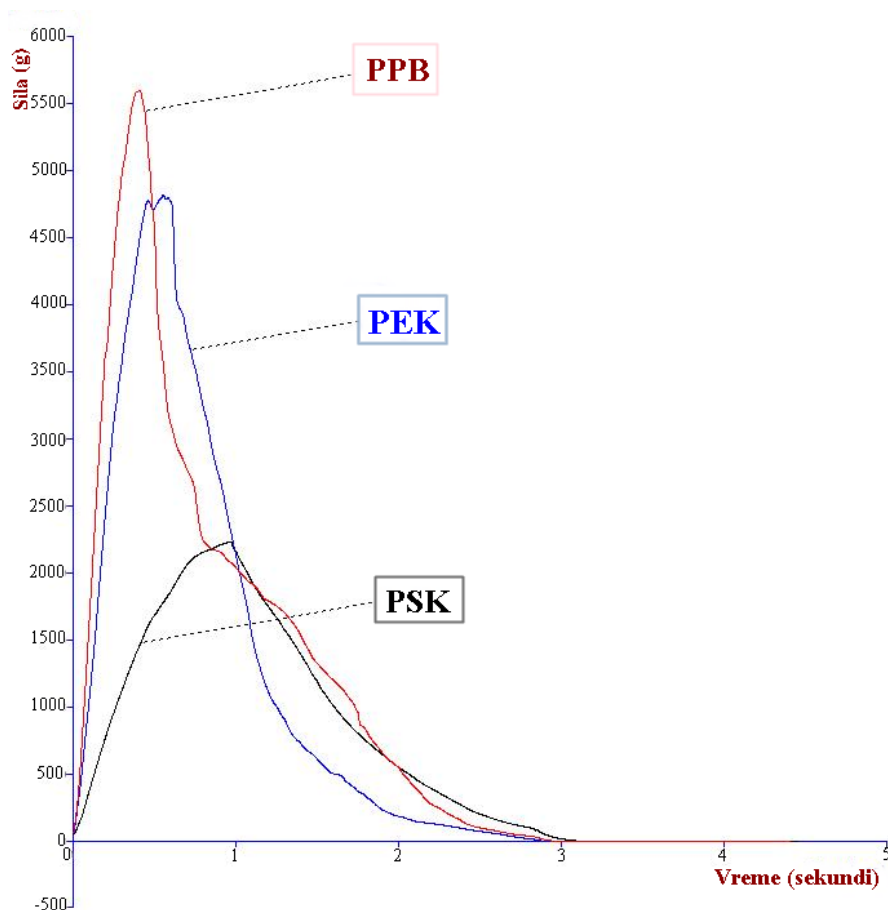
Ocene su srednja vrednost pet ocenjivanja od strane sedam panelista±SD

Vrednosti u istom redu označene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$)

Proizvod sa semenom koprive po svojim senzorskim i funkcionalnim karakteristikama može doprineti proširenju asortimana ove grupe proizvoda na tržištu.

4.4.8.1.3. Teksturane karakteristike proizvoda sa semenom koprive, ekstraktom semena koprive i kontrolnog proizvoda

Tekstura proizvoda je vrlo bitan parametar kvaliteta, koji značajno doprinosi njegovom ukupnom kvalitetu i prihvatljivosti. Pored izgleda i ukusa, tekstura se ubraja u tri najznačajnija faktora prepoznata od strane potrošača pri oceni prehrambenih proizvoda (Bourne, 1990). Korišćenjem teksturometra, „three-point bending“ tehnikom, određeni su čvrstoća i lomljivost proizvoda. Izgled tipičnih krivih, za proizvode, dobijenih na TA-XT2 Texture Analyzer-u, prikazan je na slici 28.



Slika 28. Izgled tipičnih krivih za kontrolni uzorak proizvoda i proizvoda sa ekstraktom semena koprive i sa semenom koprive dobijen na TA-XT2 Texture Analyzer-u

Čvrstoća uzoraka, određena kao maksimalna sila neophodna da se postigne lom proizvoda, statistički se značajno razlikuje ($p < 0,05$) između sva tri uzorka proizvoda. Iz tabele 32 se uočava da su proizvodi sa semenom koprive znatno mekši od kontrolnog proizvoda i proizvoda sa ekstraktom semena koprive.

Na čvrstoću proizvoda, određenu teksturometrom, utiču debljina i oblik proizvoda (Mamat i sar., 2010), kao i vrsta i sadržaj masnoće (Sudha i sar., 2007). Obzirom da su uzorci proizvoda pripremljeni sa istom vrstom i količinom masnoće i u proseku imaju vrlo sličnu debljinu i oblik, može se pretpostaviti da je razlika u čvrstoći proizvoda posledica korišćenja dodatih sirovina.

Lomljivost proizvoda, određena kao rastojanje u trenutku loma, odnosno otpor koji uzorak pruža sili savijanja, izražena je u mm, a rezultati su prikazani u tabeli 32. Lomljivost izražena na ovaj način pokazuje da je uzorak, ukoliko se lomi na maloj razdaljini, više lomljiv. Rezultati lomljivosti sva tri uzorka proizvoda, kao i u slučaju čvrstoće, statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$), s tim što su razlike u lomljivosti manje izražene u poređenju sa razlikama

u čvrstoći. Veća lomljivost je ustanovljena kod kontrolnog proizvoda, a manja lomljivost je kod proizvoda sa semenom koprive u odnosu na kontrolni uzorak i na uzorak sa ekstraktom semena koprive.

Mamat i sar. (2010) navode da se udelom i vrstom pojedinačnih sastojaka proizvoda ne mogu u potpunosti objasniti čvrstoća i lomljivost, već da su one posledica interakcija sastojaka.

Tabela 32. Teksturne karakteristike finalnih proizvoda

	PSK	PEK	PPB
Čvrstoća, g	2381,01 ^a	5669,90 ^{bc}	5396,62 ^b
Lomljivost, mm	2,60 ^c	1,61 ^b	1,20 ^a
Snaga potrebna za lom, kg·mm⁻¹	0,04 ^a	0,11 ^c	0,098 ^b

Unutar redova, vrednosti označene istim slovima u superskriptu se statistički ne razlikuju značajno, $p > 0,05$

Čvrstoća i lomljivost proizvoda, kao pokazatelji teksturnog kvaliteta proizvoda dobijeni primenom instrumentalne metode, značajno se razlikuju kod sva tri uzorka proizvoda. U literaturi ne postoji adekvatno tumačenje uticaja ovog parametra na kvalitet proizvoda iz grupe finih pekarskih proizvoda. Rezultati dobijeni za čvrstoću i lomljivost ispitivanih uzoraka proizvoda u saglasnosti su sa senzorskom ocenom teksturnih svojstava proizvoda, određenih metodom bodovanja (tabela 31). Teksturna svojstva ocenjena metodom bodovanja, struktura, čvrstoća i prhkost, uporediva su sa čvrstoćom određenom „three-point bending“ tehnikom, dok se žvakljivost može porediti sa lomljivošću proizvoda.

Pokazatelji teksturnog kvaliteta proizvoda, određeni metodom bodovanja i instrumentalno, ukazuju da zamena pšeničnog brašna samlevenim semenom u proizvodnji proizvoda rezultira finalnim proizvodom povišenog kvaliteta.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata sprovedenih istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- ✓ Najveći udeo hemijskog sastava semena koprive čine ugljeni hidrati sa sadržajem od 36,19%, zatim proteini sa sadržajem od 22,45% i lipidi sa sadržajem od 20,1%. Najveći udeo mineralnih materija u semenu koprive čine esencijalni (glavni) minerali (Ca, P, K, Mg i Na), a među njima je najzastupljeniji Ca. Od esencijalnih minerala u tragovima najzastupljenije je gvožđe, dok je stroncijum najzastupljeniji od ispitivanih neesencijalnih minerala.
- ✓ Ulje semena koprive pripada grupi jestivih ulja linolnog tipa, visokog je nutritivnog kvaliteta (sadržaj linolne masne kiseline iznosi 86,05%) i visoko nezasićeno ulje (vrednost jednog broja je 117,54 mg J₂/g ulja). U pogledu antioksidativnog potencijala, hidrofilna frakcija ulja pokazuje veći antioksidativni potencijal u odnosu na lipofilnu frakciju i nefrakcionisano ulje. DSC analiza pokazuje da ulje semena koprive ima izraženu termooksidativnu stabilnost, a visoka koncentracija polinezasićenih masnih kiselina ga čini alternativnim izvorom sirovine za prehrambenu, kozmetičku i druge industrije.
- ✓ Sadržaj slobodnih polifenolnih jedinjenja u semenu koprive značajno je veći u odnosu na sadržaj vezanih (do 2,14 puta), ali ekstrakti vezanih polifenolnih jedinjenja imaju veću sposobnost neutralisanja DPPH radikala i veću redukcionu snagu.
- ✓ Najveći sadržaj polifenola iz semena koprive dobijen je upotrebom 70% metanola, rastvarača sa najvećim, a najmanji sadržaj upotrebom 96% etanola, rastvarača sa najnižim indeksom polarnosti. Poređenje vodeno-alkoholnih smeša sa rastvaračima analitičke čistoće (70% metanol vs. 100% metanol i 70% etanol vs. 96% etanol) kazuje da vodeno-alkoholne smeše pokazuju bolju ekstraktabilnost polifenolnih jedinjenja.
- ✓ Ekstrakti dobijeni korišćenjem vodeno-alkoholnih smeša imali su bolji antioksidativni potencijal od ekstrakata dobijenih rastvaračima analitičke čistoće: ekstrakti dobijeni 70% metanolom i etanolom bili su znatno efikasniji hvatači DPPH radikala i pokazali su bolju redukcionu snagu i veću FRAP vrednost od ekstrakata dobijenih 100% metanolom i 96% etanolom, dok se 70% metanol pokazao kao najefikasniji rastvarač.
- ✓ Postoji pozitivna i visoka korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i njihovog antioksidativnog potencijala. Razlike u R i R² vrednostima između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog potencijala određenog različitim metodama navode na zaključak da postoje različiti odgovori polifenola u različitim sistemima analize, u zavisnosti od njihove hemijske strukture. Korelacija vrednosti antioksidativnog potencijala

analiziranog upotrebom tri različite metode pokazuje da su sve tri metode ispitivanja bile pogodne i pouzdane za procenu ukupnog antioksidativnog potencijala alkoholnih ekstrakata semena koprive: visoko značajna linearna korelacija ($R^2 = 0,8724$ i $R = 0,9340$), postignuta je između antioksidativnog potencijala analiziranog testom redukcione snage i FRAP testom.

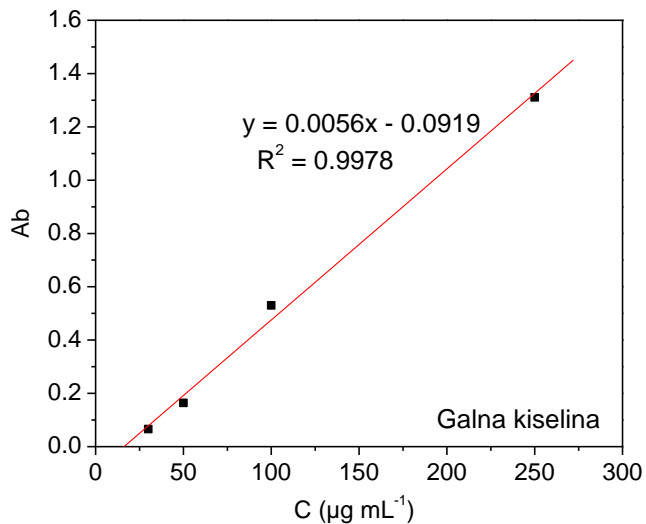
- ✓ Ekstrakt vezanih polifenolnih jedinjenja ima bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakt slobodnih polifenolnih jedinjenja: ekstrakt slobodnih polifenola je delovao na dve, dok je ekstrakt vezanih polifenola delovao na pet od deset testiranih mikrobnih vrsta. Najbolji inhibicioni efekat oba ekstrakta postignut je na rast istih mikrobnih vrsta, *Bacillus cereus* ATCC 11778 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.
- ✓ U metanolnom ekstraktu slobodnih polifenola, primenom izokratnog eluiranja HPLC analize identifikovano je devet (galna, hlorogena, kafeinska, siringinska, elaginska, kumarinska, *trans*-ferulinska kiselina, rutin, myricetin) polifenolnih jedinjenja, među kojima je hlorogena kiselina bila najzastupljenija, a u ekstraktu vezanih polifenola sedam jedinjenja (galna, hlorogena, kafeinska, taninska, kumarinska, *trans*-ferulinska kiselina, rutin), među kojima je kafeinska kiselina bila najzastupljenija. Gradijentnim eluiranjem je identifikovano devet (hidroksicimetna kiselina, 5-*O*-kofeoilšikiminska kiselina, kempferol 3-*O*-7-*O*-diglukozid, fenol 'P5', protogenkvanin-4-*O*-glukozid, kvercetin 3-*O*-glukozid-7-*O*-ramnozik, kempferol 3-*O*-rutinozik-7-*O*-ramnozik, kvercetin 3-*O*-ramnozik, kempferol 3-*O*-rutinozik) polifenolnih jedinjenja u ekstraktu slobodnih, a pet u ekstraktu vezanih polifenola (kempferol 3-*O*-7-*O*-diglukozid, monokafeoil-mezo-vinska kiselina, kempferol 3-*O*-rutinozik-7-*O*-glukozid, nid₁ i nid₂). Među identifikovanim jedinjenjima u ekstraktu slobodnih polifenola, najzastupljeniji je kempferol 3-*O*-rutinozik-7-*O*-ramnozik, a u ekstraktu vezanih polifenola, najzastupljenije je jedinjenje sa retencionim vremenom od 67,73 min.
- ✓ Sadržaj polifenolnih jedinjenja bio je za oko 7% veći u ekstraktu dobijenom iz samlevenog semena nego u ekstraktu dobijenom iz nesamlevenog semena. Vodeni ekstrakt dobijen iz samlevenog semena ima značajno veći antioksidativni potencijal u poređenju sa ekstraktom dobijenim iz nesamlevenog semena. Galna i hlorogena kiselina bile su najzastupljenije fenolne kiseline, a derivati kempferola najzastupljenija flavonoidna jedinjenja u ekstraktima dobijenim iz samlevenog i nesamlevenog semena koprive.
- ✓ Zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive dovodi do statistički značajnog povećanja proteina (sa 6,93% na 9,53%), lipida (sa 6,28% na 8,52%), vlakana

(sa 1,5% na 4,1%) i pepela (sa 0,29 na 2,93%), ali do smanjenja ugljenih hidrata za 10,55% u dobijenim prehrambenim proizvodima.

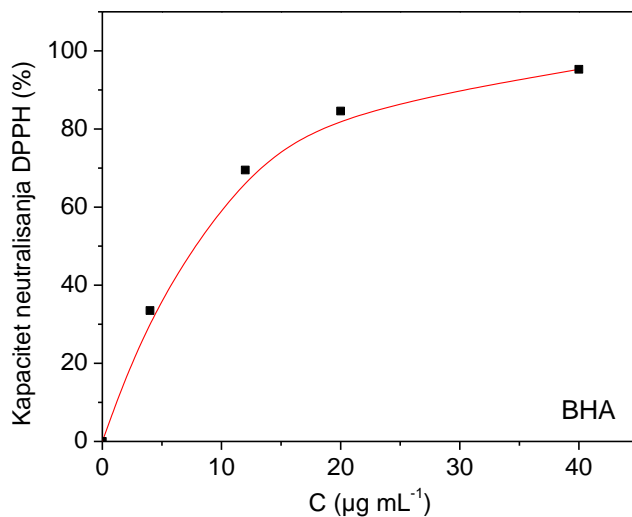
- ✓ Zamenom dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primenom vodenog ekstrakta za zames testa statistički se značajno povećava sadržaj svih esencijalnih minerala, među kojima kalcijum zauzima najveći udeo. U slučaju esencijalnih minerala u tragovima, značajno se povećava koncentracija gvožđa i bakra, pri čemu je gvožđe najzastupljenije među mineralima i proizvodima. Kod neesencijalnih minerala, značajno povećanje javlja se u slučaju litijuma i stroncijuma.
- ✓ Termooksidativna stabilnost proizvoda pokazuje da dodatak semena i vodenog ekstrakta semena koprive u proizvod na bazi pšeničnog brašna povećava njihovu stabilnost za 5,36% i 3,53%, redom.
- ✓ Zamenom dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive i primenom vodenog ekstrakta za zames testa dobijaju se proizvodi sa unapređenim funkcionalnim svojstvima (veći sadržaj polifenolnih jedinjenja i bolji antioksidativni potencijal), u odnosu na proizvod dobijen samo od pšeničnog brašna. Primena semena koprive doprinosi povećanju sadržaja slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja 2,1 i 2,5 puta, dok primena ekstrakta semena koprive povećava sadržaj slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja za 9,9 i 28,0%, redom. Među polifenolnim jedinjenjima, izrazito povećanje u sadržaju primećeno je u slučaju hlorogene, galne, kafeinske, elaginske, kumarinske i siringinske kiseline.
- ✓ Zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive povećava DPPH slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja 9,2 i 4,6 puta, a redukcionu snagu 1,6 i 3,4 puta, redom. Primena vodenog ekstrakta za zames testa povećava DPPH slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja 1,9 i 1,6 puta, redom, a redukcionu snagu 1,25 i 1,36 puta.
- ✓ Termička obrada dovodi do značajnih promena u sadržaju slobodnih i vezanih polifenolnih jedinjenja. Tokom termičke obrade u periodu od 0 do 25 minuta dolazi do povećanja i smanjenja ukupnog sadržaja polifenola usled disocijacije vezanog fenolnog dela, reakcija polimerizacije i oksidacije, kao i formiranja novih jedinjenja koji nisu prisutni pre termičke obrade. Termička obrada od 25 minuta dovela je do značajnog povećanja sadržaja slobodnih polifenola (za 21,5%) u proizvodu sa semenom koprive, ali i do značajnog smanjenja sadržaja slobodnih polifenola u proizvodu sa ekstraktom semena koprive i kontrolnom proizvodu (za 13,85% i 10,8%, redom). Termička obrada je dovela do smanjenja sadržaja vezanih polifenola u svim proizvodima (u proizvodu sa semenom koprive za 6,7%, u proizvodu sa ekstraktom semena koprive za 24,3 i u kontrolnom proizvodu za 35,6%).

- ✓ Tokom termičke obrade dešavaju se i različite promene antioksidativnog potencijala, u zavisnosti od oblika polifenola (slobodni ili vezani), porekla polifenola (iz pšenice, ekstrakta ili semena koprive) i testa ispitivanja antioksidativnog potencijala (DPPH ili redukciona snaga). Termička obrada je kod svih ispitivanih proizvoda dovela do povećanja antioksidativnog potencijala slobodnih i vezanih polifenola ispitivanog DPPH metodom: antioksidativni potencijal slobodnih polifenola proizvoda sa semenom koprive je bio veći za 21,43%, dok je antioksidativni potencijal proizvoda sa ekstraktom semena koprive i kontrolnog proizvoda bio veći za oko 80% i 66%, redom. Antioksidativni potencijal slobodnih polifenola analiziran testom redukcionne snage takođe se povećao tokom termičke obrade, u proizvodu sa semenom koprive za 41,8%, a u proizvodu sa ekstraktom semena koprive i kontrolnom proizvodu za 38,3 i 39,5%, redom. U slučaju vezanih polifenola, kapacitet neutralisanja DPPH radikala proizvoda sa semenom koprive nakon termičke obrade povećao se značajno, za 14,8%, a u slučaju proizvoda sa ekstraktom semena koprive i kontrolnog proizvoda za 72,1% i 67,8%, redom. Redukciona snaga vezanih polifenola u proizvodu sa semenom koprive se povećala tokom termičke obrade za približno 39%, dok je u proizvodu sa ekstraktom semena koprive i kontrolnom proizvodu smanjena za 9,7, odnosno 29,5%.
- ✓ Zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive dovodi i do boljeg senzornog kvaliteta. Izgled, tekstura, miris i ukus su sa najvećom ocenom ocenjeni kod uzoraka sa semenom koprive, dok je senzorski kvalitet kontrolnog proizvoda i proizvoda sa ekstraktom od semena koprive u velikom delu identičan. U pogledu boje, proizvod sa semenom koprive ima manju svetloću (L^*) i manje učešće žutog tona (b^*) u odnosu na kontrolni uzorak, dok je učešće crvenog tona (a^*) bilo malo u svim uzorcima proizvoda. Pokazatelji senzorskog i teksturnog kvaliteta proizvoda, određeni metodom bodovanja i instrumentalno, ukazuju da zamena pšeničnog brašna usitnjenim semenom koprive u proizvodnji proizvoda rezultira finalnim proizvodom povišenog kvaliteta.
- ✓ Seme koprive je pogodna sirovina za dobijanje prehrambenog proizvoda na bazi pšeničnog brašna sa unapređenim funkcionalnim i senzornim svojstvima. Zamena dela pšeničnog brašna samlevenim semenom koprive omogućava dobijanje proizvoda koji po svojim senzorskim i funkcionalnim karakteristikama može doprineti proširenju asortimana ove grupe proizvoda na tržištu.

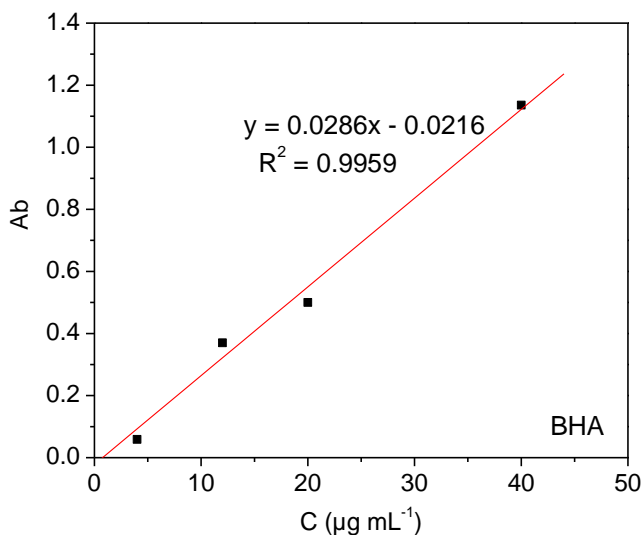
6. PRILOZI



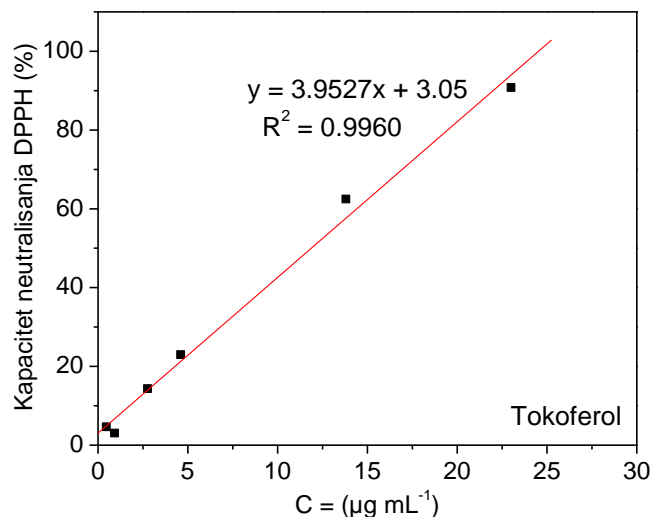
Slika P₁. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih polifenola sa galnom kiselinom



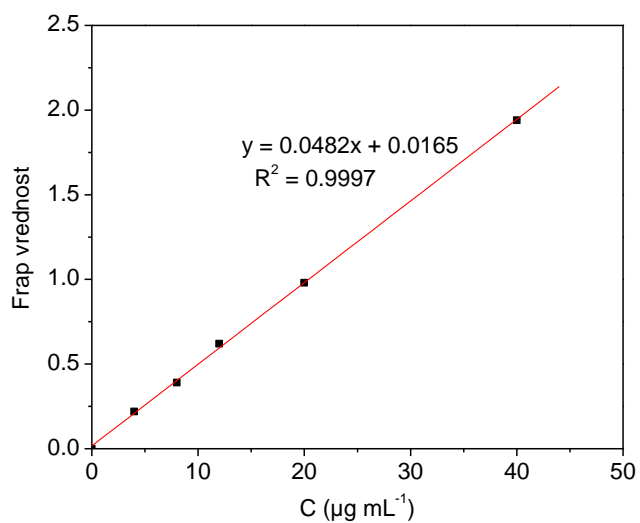
Slika P₂. Zavisnost kapaciteta neutralisanja DPPH radikala od koncentracije rastvora butil-hidroksi anizola kao standarda



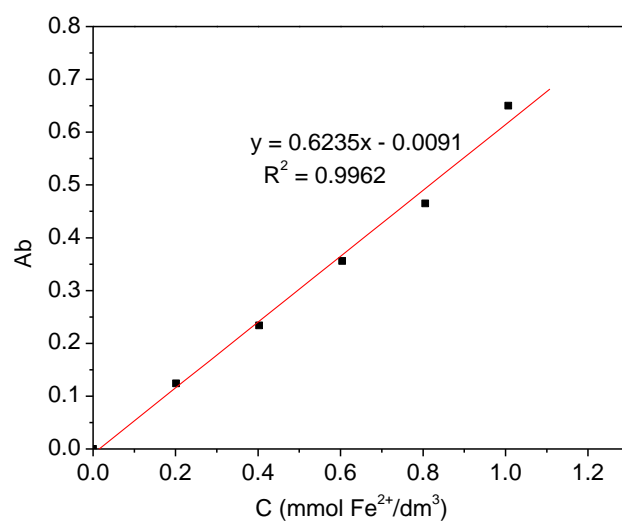
Slika P₃. Zavisnost redukcione snage od koncentracije rastvora butil-hidroksi anizola



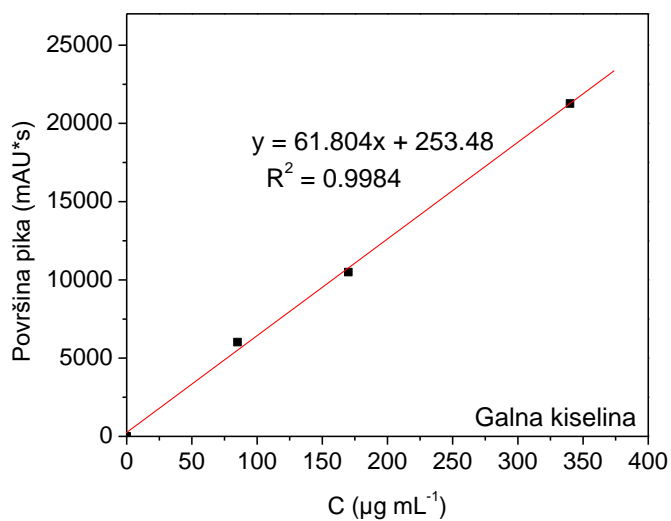
Slika P₄. Zavisnost kapaciteta neutralisanja DPPH radikala od koncentracije rastvora tokoferola kao standarda



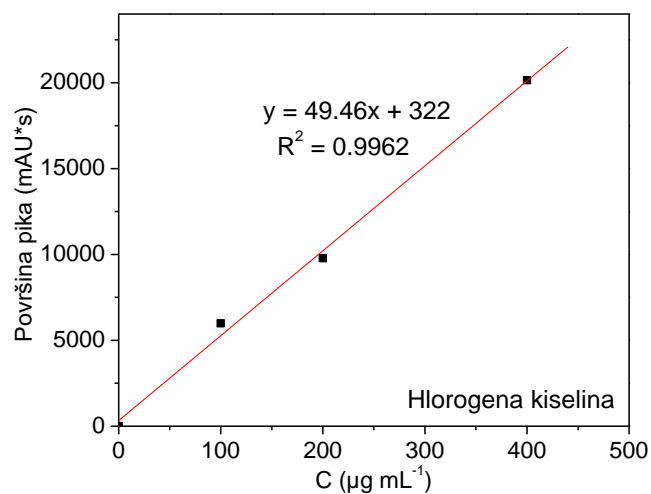
Slika P5. Zavisnost FRAP vrednosti od koncentracije rastvora butil-hidroksi-anizola kao standarda



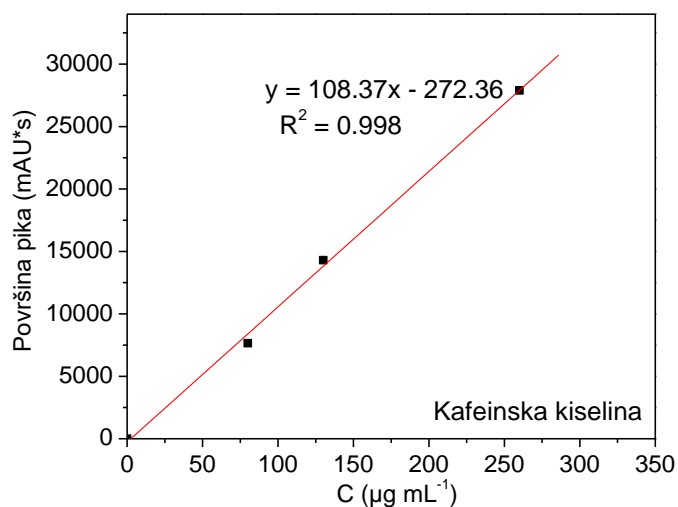
Slika P6. Kalibraciona prava za određivanje FRAP vrednosti ispitivanih ekstrakata semena koprive



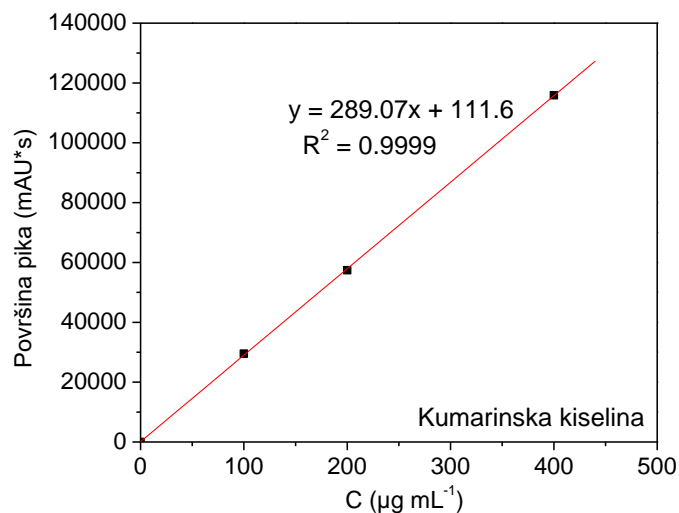
Slika P7. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja galne kiseline dobijena HPLC metodom



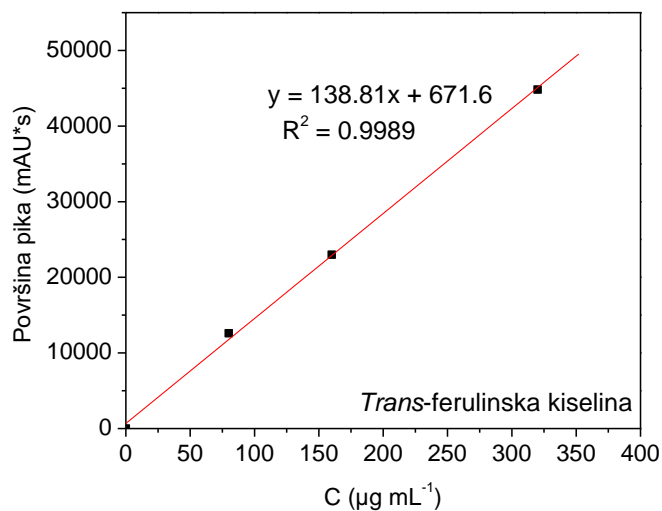
Slika P8. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja hlorogene kiseline dobijena HPLC metodom



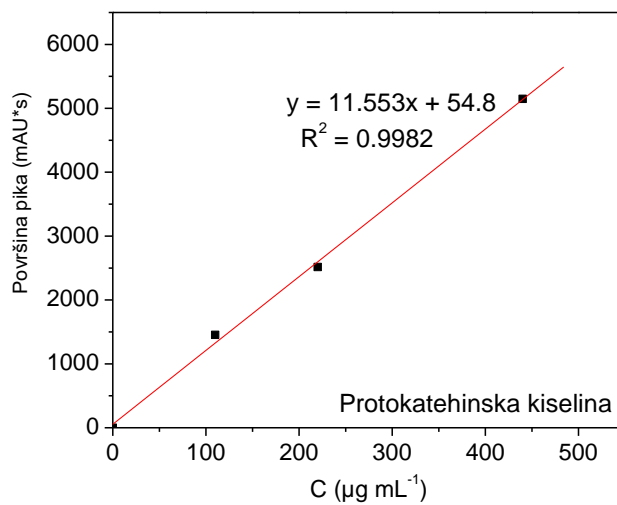
Slika P₉. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja kafeinske kiseline dobijena HPLC metodom



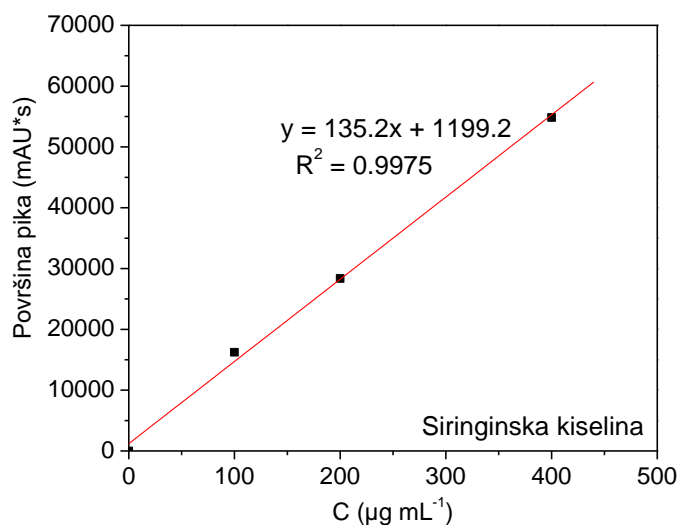
Slika P₁₀. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja kumarinske kiseline dobijena HPLC metodom



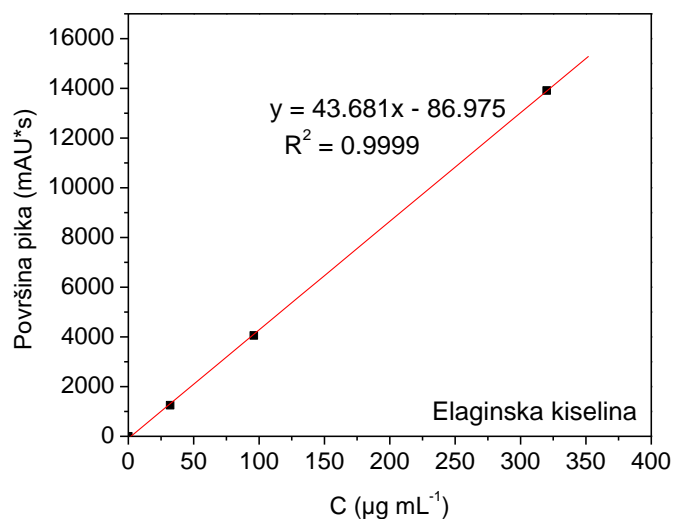
Slika P₁₁. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja trans-ferulinske kiseline dobijena HPLC metodom



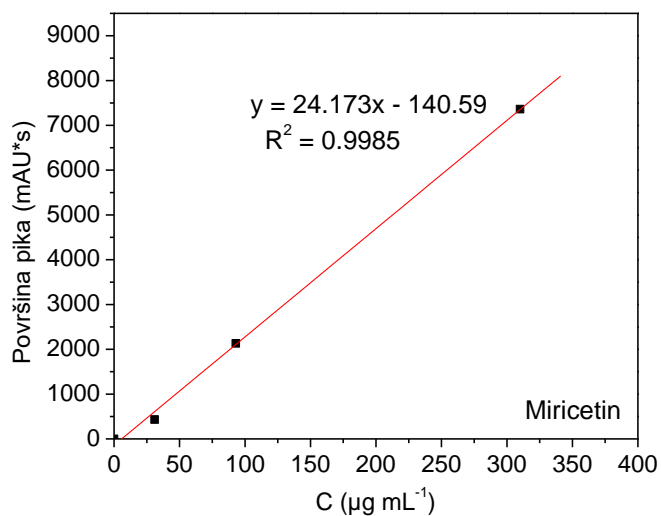
Slika P₁₂. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja protokatehinske kiseline dobijena HPLC metodom



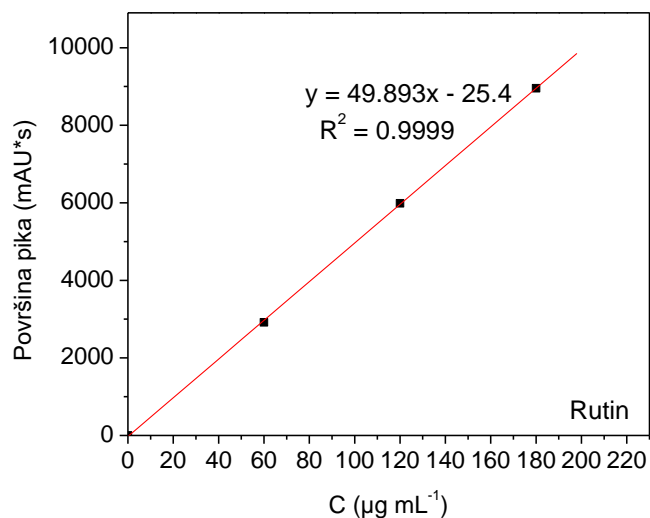
Slika P₁₃. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja siringinske kiseline dobijena HPLC metodom



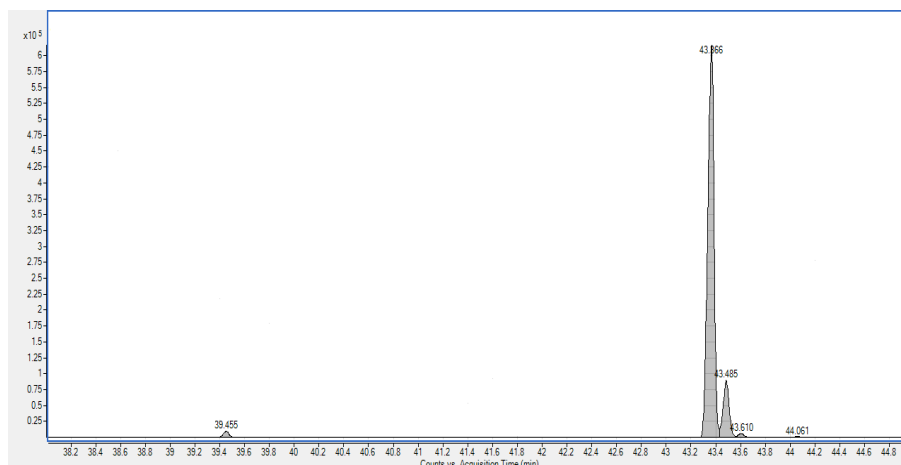
Slika P₁₄. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja elaginske kiseline dobijena HPLC metodom



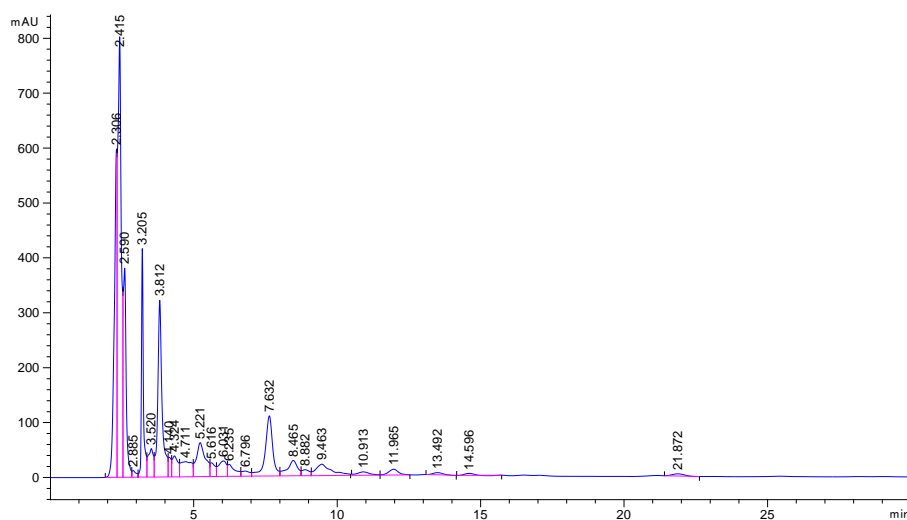
Slika P₁₅. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja miricetina dobijena HPLC metodom



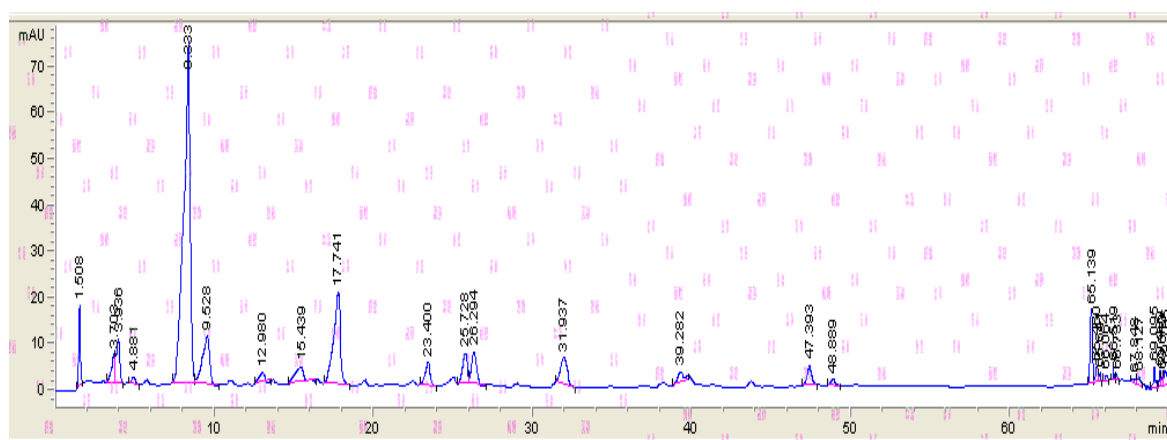
Slika P₁₆. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja rutina dobijena HPLC metodom



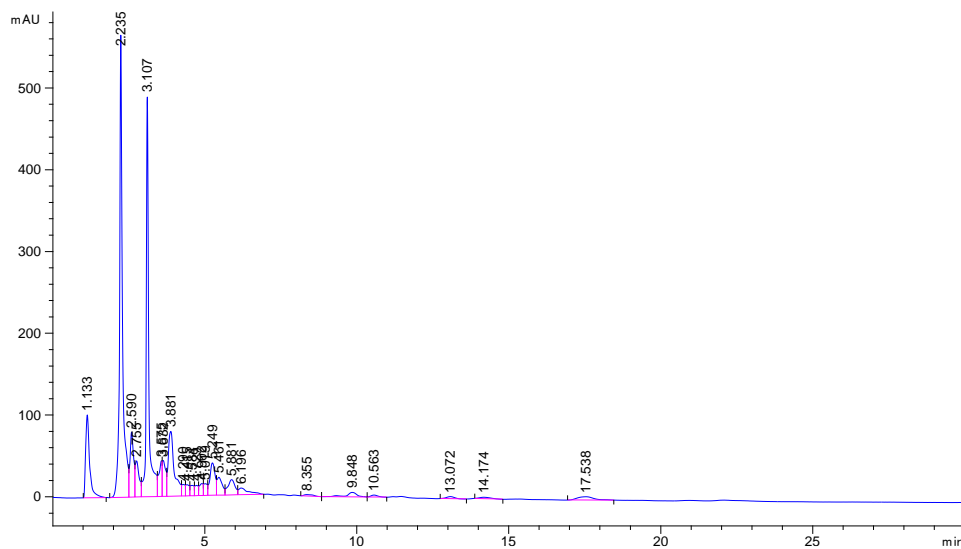
Slika P17. GC hromatogram masnih kiselina ulja semena koprive



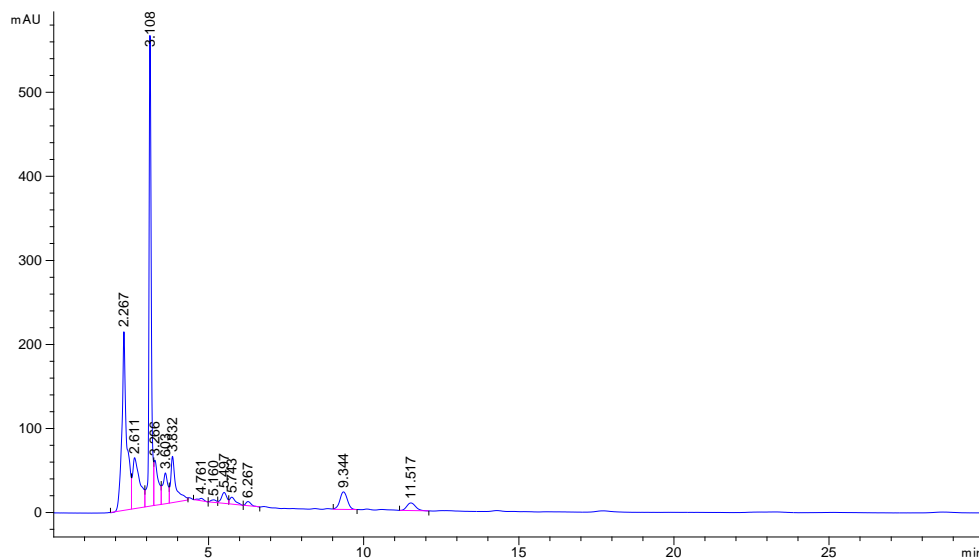
Slika P18. HPLC hromatogrami fenolnih kiselina u ekstraktu slobodnih polifenola semena koprive



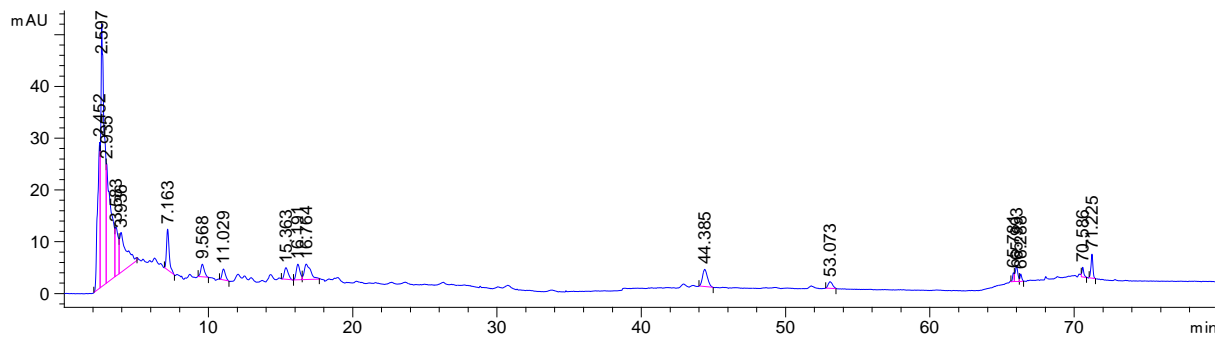
Slika P19. HPLC hromatogrami fenolnih kiselina u ekstraktu vezanih polifenola semena koprive



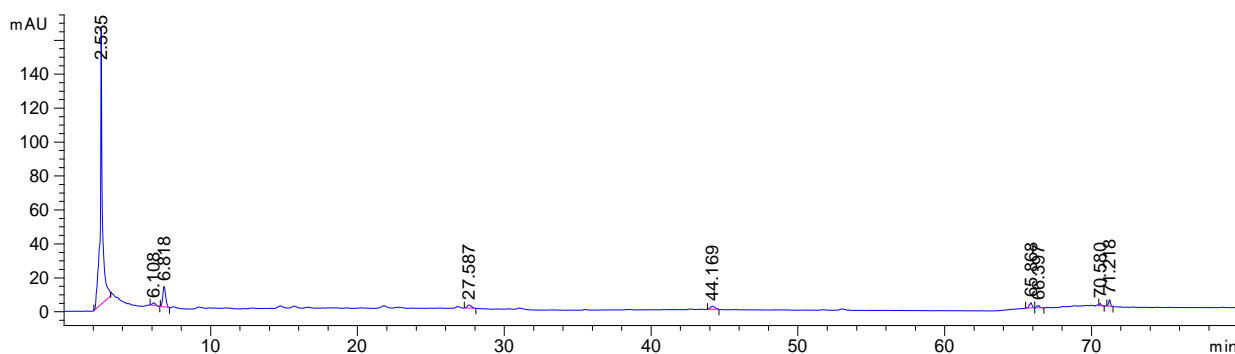
Slika P20. HPLC hromatogram fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu slobodnih polifenola nesamlevenog semena koprive (izokratno eluiranje)



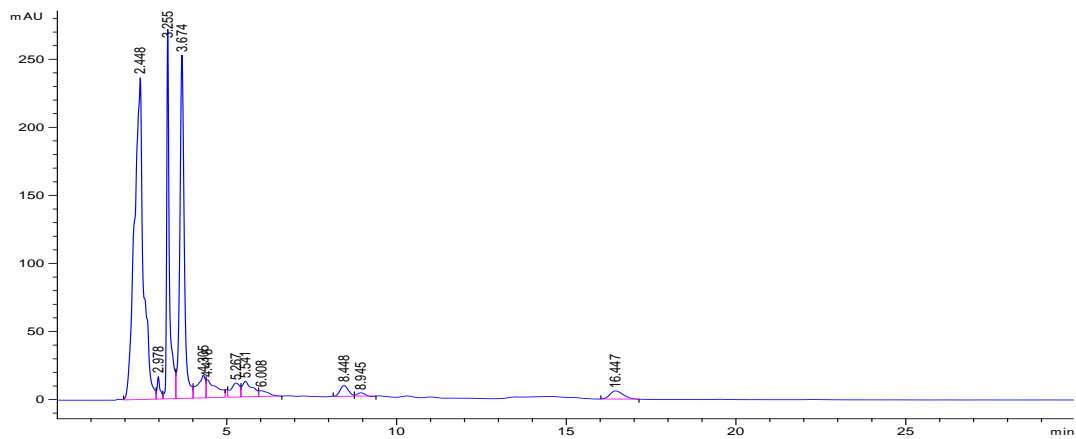
Slika P21. HPLC hromatogram fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu slobodnih polifenola samlevenog semena koprive (izokratno eluiranje)



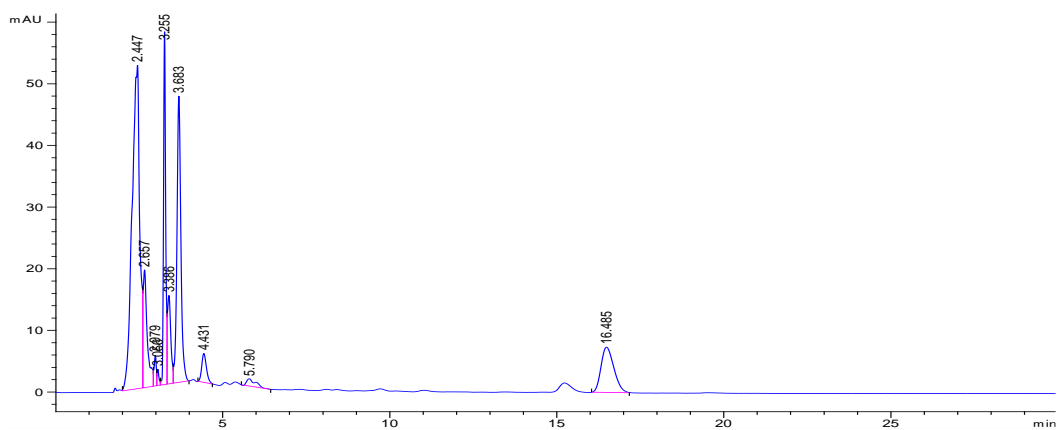
Slika P22. HPLC hromatogram fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu slobodnih polifenola nesamlevenog semena koprive (gradijentno eluiranje)



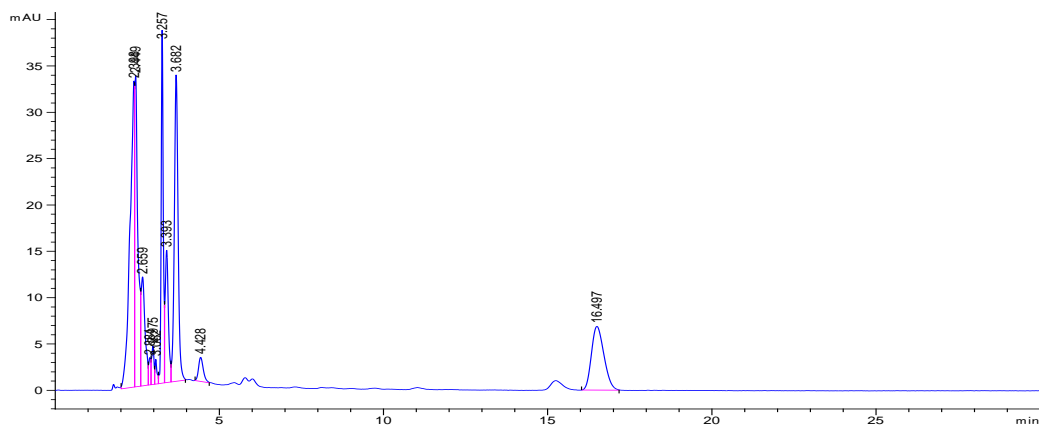
Slika P23. HPLC hromatogram fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu slobodnih polifenola samlevenog semena koprive (gradijentno eluiranje)



a)

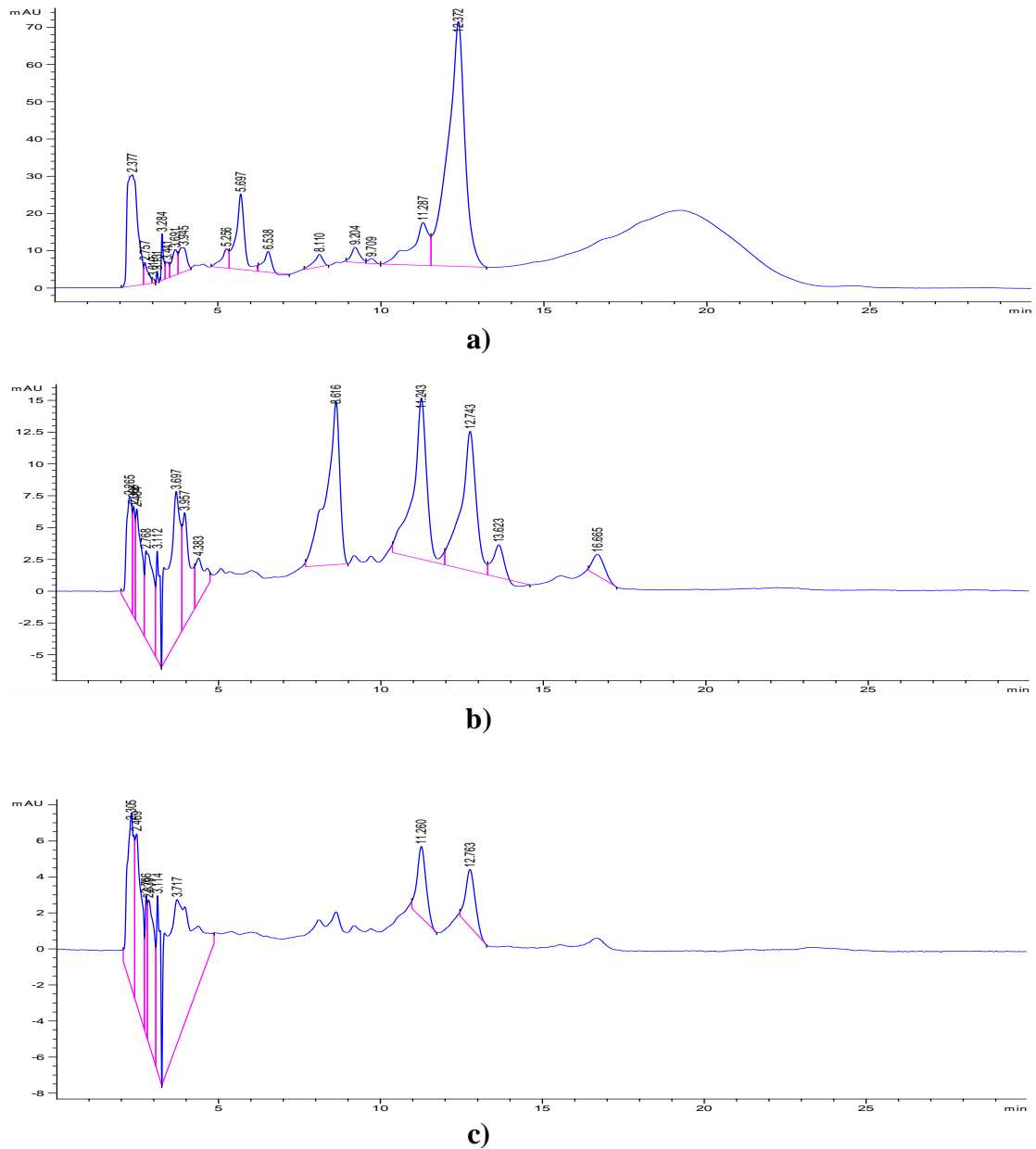


b)



c)

Slika P₂₄. HPLC hromatogrami fenolnih kiselina u ekstraktu slobodnih polifenola dobijenih iz PSK (a) PEK (b) i PPB (c)



Slika P₂₅. HPLC hromatogrami fenolnih kiselina u ekstraktu vezanih polifenola dobijenih iz PSK (a) PEK (b) i PPB (c)

7. LITERATURA

- Abd El-Aziz, M., Mohamed, S. H. S., & Seleet, F. L. (2012). Production and evaluation of soft cheese fortified with ginger extract as a functional dairy food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(2), 77–83. <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0046-0>
- Abdel-Aal, E. S. M., & Rabalski, I. (2013). Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. *Journal of Cereal Science*, 57(3), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.12.001>
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Adhikari, B. M., Bajracharya, A., & Shrestha, A. K. (2016). Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 119–124. <https://doi.org/10.1002/fsn3.259>
- Adhvaryu, A., Erhan, S. Z., Liu, Z. S., & Perez, J. M. (2000). Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetables using pressurized differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Thermochimica Acta*, 364(1–2), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(00\)00626-2](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(00)00626-2)
- Ahmed Kk, M., & Parsuraman, S. (2014). *Urtica dioica* L., (Urticaceae): A stinging nettle. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 5(1), 6–8. <https://doi.org/10.5530/srp.2014.1.3>
- Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., & Jahangir, M. (2016). Oxidation of Lipids in Foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3), 230–238. <https://doi.org/10.17582/journal.sja/2016.32.3.230.238>
- Ait Haj Said, A., Otmani, I. S. El, Derfoufi, S., & Benmoussa, A. (2015). Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica Dioica*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10), 8–14.
- Ajila, C. M., Leelavathi, K., & Prasada Rao, U. J. S. (2008). Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.10.001>
- Aksoylu, Z., Çağindi, Ö., & Köse, E. (2015). Effects of blueberry, grape seed powder and poppy seed incorporation on physicochemical and sensory properties of biscuit. *Journal of Food Quality*, 38(3), 164–174. <https://doi.org/10.1111/jfq.12133>
- Aktaş, N., Gerçekaslan, K. E., & Uzlaşır, T. (2018). The effect of some pre-roasting treatments on quality characteristics of pumpkin seed oil. *OCL - Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 25(3), A301. <https://doi.org/10.1051/ocl/2018025>
- Akahira, T., & Sunose, T. T. (1971). Joint Convention of Four Electrical Institutes, Report of Research. *Chiba Institute of Technology*, 16, 22-31.
- Akkaya, M. R. (2018). Prediction of fatty acid composition of sunflower seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2318–2325. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3150-x>
- Alzaabi, M. M., Hamdy, R., Ashmawy, N. S., Hamoda, A. M., Alkhayat, F., Khademi, N. N., Al Joud, S. M. A., El-Keblawy, A. A., & Soliman, S. S. M. (2022). Flavonoids are promising safe therapy against COVID-19. *Phytochemistry Reviews*, 21(1), 291-312.

- <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09759-z>.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 183-188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00625-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00625-7)
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, 49(5), 633-649. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.996146>
- AOAC. (1995). Official methods of analysis of AOAC International, 16th edition. Volume 2. 1995. AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International; Arlington; USA.
- Anese, M., Manzocco, L., Nicoli, M. C., & Lericci, C. R. (1999). Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(5), 750-754. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199904\)79:5<750::AID-JSFA247>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199904)79:5<750::AID-JSFA247>3.0.CO;2-A)
- Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523-524, 9-20. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00317-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00317-2)
- Arain, S., Sherazi, S. T. H., Bhangar, M. I., Talpur, F. N., & Mahesar, S. A. (2009). Oxidative stability assessment of Bauhinia purpurea seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods. *Thermochimica Acta*, 484(1-2), 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.11.004>
- Aslam, M. N., Nelson, M. N., Kailis, S. G., Bayliss, K. L., Speijers, J., & Cowling, W. A. (2009). Canola oil increases in polyunsaturated fatty acids and decreases in oleic acid in drought-stressed Mediterranean-type environments. *Plant Breeding*, 128(4), 348-355. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01577.x>
- Aureman, L. J. (1979). Tehnologija pekarske proizvodnje. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391-396. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.001>
- Balpetek, K. D., Demir Gökışık, C., & Aydın, S. (2019). An Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activity of Nettle (*Urtica dioica* L.), Mint (*Mentha piperita*), Thyme (*Thyme serpyllum*) and *Chenopodium album* L. Plants from Yaylacık Plateau, Giresun, Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(1), 73-80. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i1.73-80.2123>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bender, D. A. (2003). Nutritional biochemistry of the vitamins. Cambridge, UK.
- Biesiada, A., Kucharska, A., Sokół-Łętowska, A., & Kuś, A. (2010). Effect of the Age of Plantation and Harvest Term on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Ecological Chemistry and Engineering A*, 17(9), 1061-1068.
- Biliaderis, C. G. (1983). Differential scanning calorimetry in food research-A review. *Food*

- Chemistry*, 10(4), 239–265. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90081-X)
- Bisht, S., & Dada, R. (2017). Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 9(3), 420–447. <https://doi.org/10.2741/s495>
- Bourne, M. C. (1990). Basic principles of food texture measurement. In: Dough Rheology and Baked Products Texture, (Eds.) Faridi, H., Faubion, J. M., New York, p. 331.
- Bouloumpasi, E., Hatzikamari, M., Lazaridou, A., Chatzopoulou, P., Biliaderis, C. G., & Irakli, M. (2021). Antibacterial and Antioxidant Properties of Oregano and Rosemary Essential Oil Distillation By-Products. *Biology and Life Sciences Forum*, 6, 47. <https://doi.org/10.3390/Foods2021-11020>
- Bucar, F., Britzmann, B., Streit, B., Weigend, M., (2006). LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts of aerial parts of *Urtica* species. *Planta Medica*, 72, 152.
- Blaine, R. L., & Harris, M. B. (1997). A proposed reference material for oxidative induction time by differential scanning calorimetry. *ASTM Special Technical Publication*, 1326, 193–204. <https://doi.org/10.1520/stp13823s>
- Blasi, F., & Cossignani, L. (2020). An overview of natural extracts with antioxidant activity for the improvement of the oxidative stability and shelf life of edible oils. *Processes*, 8(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/PR8080956>
- Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., & Boskou, D. G. (2002). Biophenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3688–3692. <https://doi.org/10.1021/jf0115138>
- Bhanger, M. I., Iqbal, S., Anwar, F., Imran, M., Akhtar, M., & Zia-Ul-Haq, M. (2008). Antioxidant potential of rice bran extracts and its effects on stabilisation of cookies under ambient storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5), 779–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01515.x>
- Bhusal, K. K., Magar, K. S., Thapa, R., Lamsal, A., Bhandari, S., Maharjan, R., Shrestha, S., & Shrestha, J. (2022). Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon*, 8(6), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09717>
- Bressa, F., Tesson, N., Dalla Rosa, M., Sensidoni, A., & Tubaro, F. (1996). Antioxidant effect of Maillard reaction products: Application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 692–695. <https://doi.org/10.1021/jf950436b>
- Brunschwig, C., Senger-Emonnot, P., Aubanel, M. L., Pierrat, A., George, G., Rochard, S., & Raharivelomanana, P. (2012). Odor-active compounds of Tahitian vanilla flavor. *Food Research International*, 46(1), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.006>
- Byers, M., Mifflin, J. B., & Smith, J. S. (1983). A quantitative comparison of the extraction of protein fractions from wheat grain by different solvents, and of the polypeptide and amino acid composition of the alcohol-soluble proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34, 447–462. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740340506>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids:

- structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*; 22(5), 749-60. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00351-6)
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Ciric, A., Barreira, J. C. M., Sokovic, M., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Journal of Functional Foods*, 16, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.033>
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.075>
- Carvalho, A. R., Costa, G., Figueirinha, A., Liberal, J., Prior, J. A. V., Lopes, M. C., Cruz, M. T., & Batista, M. T. (2017). *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International*, 99, 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.008>
- Cassidy-Aedin, a, H.-B., & Rosa-M, L.-R. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes - Origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1044-1062. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1044::AID-JSFA586%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1044::AID-JSFA586%3E3.0.CO;2-N)
- Celenk, V. U., Gumus, Z. P., Argon, Z. U., Buyukhelvacigil, M., & Karasulu, E. (2018). Analysis of chemical compositions of 15 different cold-pressed oils produced in turkey: A case study of tocopherol and fatty acid analysis. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.335012>
- Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience*, 11, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.03.002>
- CIE. (1976). International Commission on Illumination, Colorimetry: Official Recommendation of the International Commission on Illumination. Publication CIE No. (E-1.31) Bureau Central de la CIE, Paris, France.
- Coates, J. P., & Setti, L. C. (1985). Infrared Spectroscopic Methods for the Study of Lubricant Oxidation Products. *Taylor & Francis*, 29(3), 394-401. <http://dx.doi.org/10.1080/05698198608981701>
- Chahardehi, A. M., Ibrahim, D., & Sulaiman, S. F. (2010). Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of *Pilea microphylla*. *International Journal of Microbiology*, 2010, 826-830. <https://doi.org/10.1155/2010/826830>
- Chakravartula, S. S. N., Moscetti, R., Farinon, B., Vinciguerra, V., Merendino, N., Bedini, G., Neri, L., Pittia, P., & Massantini, R. (2021). Stinging nettles as potential food additive: Effect of drying processes on quality characteristics of leaf powders. *Foods*, 10(6), 1152. <https://doi.org/10.3390/foods10061152>
- Chen, J. H., & Ho, C. T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2374–2378. <https://doi.org/10.1021/jf970055t>
- Cheng, Z., Su, L., Moore, J., Zhou, K., Luther, M., Yin, J. J., & Yu, L. (2006). Effects of postharvest treatment and heat stress on availability of wheat antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5623–5629. <https://doi.org/10.1021/jf060719b>
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive*

- Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169–186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
- Choi, H. J., Song, J. H., Park, K. S., & Kwon, D. H. (2009). Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3–4), 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.03.002>
- Chrubasik, J. E., Roufogalis, B. D., Wagner, H., & Chrubasik, S. (2007). A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Part II: *Urticae radix*. *Phytomedicine*, 14(7–8), 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.014>
- Cibulková, Z., Čertík, M., & Dubaj, T. (2014). Thermooxidative stability of poppy seeds studied by non-isothermal DSC measurements. *Food Chemistry*, 150, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.011>
- Çiftçi, O. N., Kowalski, B., Göğüş, F., & Fadiloglu, S. (2009). Effect of the addition of a cocoa butter-like fat enzymatically produced from olive pomace oil on the oxidative stability of cocoa butter. *Journal of Food Science*, 74(4), 184–190. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01128.x>
- Clifford, M. N., & Toma, F. A. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1080, 1073–1080. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1073::AID-JSFA568%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1073::AID-JSFA568%3E3.0.CO;2-B)
- Copeland, L. O., & McDonald, M. B. (1999). The Chemistry of Seeds. *Principles of Seed Science and Technology*, 3, 40–58. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1783-2_3
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Cvitanović, B. A., Komes, D., Durgo, K., & Vojvodić, A. (2015). Nettle extracts as functional ingredients for chocolate with improved bioactive content and sensory properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7723–7734. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1916-y>
- D'Alonzo, R. P., Kozarek, W. J., & Wade, R. L. (1982). Glyceride composition of processed fats and oils as determined by glass capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59(7), 292–295. <https://doi.org/10.1007/BF02662229>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dar, S. A., Ganai, F. A., Yousuf, A. R., Balkhi, M. U. H., Bhat, T. M., & Sharma, P. (2013). Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 51(2), 170–180. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.715172>
- Das, A. K., Rajkumar, V., Nanda, P. K., Chauhan, P., Pradhan, S. R., & Biswas, S. (2016). Antioxidant efficacy of litchi (*Litchi chinensis* sonn.) pericarp extract in sheep meat nuggets. *Antioxidants*, 5(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antiox5020016>
- Dayu, R. U. R. H. (2012). Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Perspectives in Medicine*, 3(1), 9–38. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>
- Delbert, I. (1990). Shelf-life prediction from induction period calorimetric measurements on

- materials undergoing autocatalytic decomposition. *Canadian Journal of Chemistry*, 68, 2111-2114. <https://doi.org/10.1139/v90-321>
- Dewanto, V., Wu, X., & Liu, R. H. (2002a). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4959–4964. <https://doi.org/10.1021/jf0255937>
- Dewanto, V., Wu, X., & Liu, R. H. (2002b). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4959–4964. <https://doi.org/10.1021/jf0255937>
- Di Virgilio, N., Papazoglou, E. G., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., & Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Products*, 68, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.012>
- Dignum, M. J. W., Van Der Heijden, R., Kerler, J., Winkel, C., & Verpoorte, R. (2004). Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase. *Food Chemistry*, 85(2), 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00293-0)
- Dimić, E. B., Vujasinović, V. B., Radočaj, O. F., & Pastor, O. P. (2012). Characteristics of blackberry and raspberry seeds and oils. *Acta Periodica Technologica*, 43, 1–9. <https://doi.org/10.2298/APT1243001D>
- Dileesh, S. Determination of Saponification, Acid and Ester Values; Percentage of Free Fatty Acids and Glycerol in some Selected edible Oils: Calculation of concentration of Lye Needed to Prepare soap from These Oils. Department of Chemistry. St. Peter's College. Kolenchery, 2013.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J. F., & Stocker, P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224(6), 801–809. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0361-6>
- Dukić, M., Ninković, M., & Jovanović, M. (2008). Oxidative stress - Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry*, 27(4), 409–425. <https://doi.org/10.2478/v10011-008-0024-1>
- Drăghici, O., Păcală, M. L., & Oancea, S. (2018). Kinetic studies on the oxidative stabilization effect of red onion skins anthocyanins extract on parsley (*Petroselinum crispum*) seed oil. *Food Chemistry*, 265, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.075>
- Drusch, S., Groß, N., & Schwarz, K. (2008). Efficient stabilization of bulk fish oil rich in long-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(4), 351-359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.079>
- Đaković, L.J. (1998). Pšenično brašno. Zavod za tehnologiju žita i brašna, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Đurović, S., Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Pertonić, M., Radojković, M., Cvetanović, A., & Zeković, Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *Journal of Functional Foods*, 32, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.019>
- Đurović, S., Vujanović, M., Radojković, M., Filipović, J., Filipović, V., Gašić, U., Tešić, Ž., Mašković, P., & Zeković, Z. (2020). The functional food production: Application of stinging nettle leaves and its extracts in the baking of a bread. *Food Chemistry*, 312, 126091. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126091>

- Durđević, M. S. Optimizacija procesa ekstrakcije ulja divljeg nara (*Punica granatum L.*) primenom mikrotalasa i ispitivanje biološke aktivnosti dobijenog ulja. Tehnološko-metalurški fakultet. Univerzitet u Beogradu. Beograd, 2018.
- Eadmusik, S., Phungamngoen, C., & Choosuk, N. (2019). Kinetic degradation of total phenolic content, DPPH radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities in Yanang (*Tiliacora triandra*) leaf extract during preparation process. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 23(3), 516–523. <https://doi.org/10.17576/mjas-2019-2303-16>
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648–656. <https://doi.org/10.1021/jf9908188>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9236–82. <https://doi.org/10.3390/ijms16059236>.
- Fatland, B. L., Ke, J., Anderson, M. D., Mentzen, W. I., Li, W. C., Allred, C. C., Johnston, J. L., Nikolau, B. J., & Wurtele, E. S. (2002). Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in arabidopsis. *Plant Physiology*, 130(2), 740–756. <https://doi.org/10.1104/pp.008110>
- Fattahi, S., Zabihi, E., Abedian, Z., Pourbagher, R., Motevalizadeh Ardekani, A., Mostafazadeh, A., & Akhavan-Niaki, H. (2014). Total Phenolic and Flavonoid Contents of Aqueous Extract of Stinging Nettle and In Vitro Antiproliferative Effect on HeLa and BT-474 Cell Lines. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(2), 102–107.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035860>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4082812>
- Fazary, A. E., & Ju, Y. H. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(11), 811–828. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00348.x>
- Farzami, B., Ahmadvand, D., Vardasbi, S., Majin, F. J., & Khaghani, S. (2003). Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00220-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00220-4)
- Fereidoon, S., & Ying, Z. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4067–4079. <https://doi.org/10.1039/b922183m>
- Fernandes, A. C. F., Vieira, N. C., Santana, Á. L. de, Gandra, R. L. de P., Rubia, C., Castro-Gamboa, I., Macedo, J. A., & Macedo, G. A. (2020). Peanut skin polyphenols inhibit toxicity induced by advanced glycation end-products in RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 145(July), 111619. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111619>
- Flynn, K. J., Wall, A. L. (1966). General Treatment of the Thermogravimetry of Polymers. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 70A(6), 487–

523. <https://doi.org/10.6028/jres.070A.043>.
- Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*, April, 1-28. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., López, Ó., Fernández-Bolaños, J. G., Sánchez, J., De Miguel, C., Gil, M. V., & Martín-Vertedor, D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 163, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.091>
- Francišковиć, M., Gonzalez-Pérez, R., Orčić, D., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., Svirčev, E., Simin, N., & Mimica-Dukić, N. (2017). Chemical Composition and Immuno-Modulatory Effects of *Urtica dioica* L. (Stinging Nettle) Extracts. *Phytotherapy Research*, 31(8), 1183–1191. <https://doi.org/10.1002/ptr.5836>
- Fuentes, E., Báez, M. E., Bravo, M., Cid, C., & Labra, F. (2012). Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV-visible Spectrometry and Multivariate Calibration. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1311–1319. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9379-5>
- Gavrilović, M. (2000). Tehnologija konditorskih proizvoda. Tehnološki fakultet, Mlinpek Zavod, Novi Sad.
- Garofulić, I. E., Malin, V., Repajić, M., Zorić, Z., Pedisić, S., Sterniša, M., Možina, S. S., & Dragović-Uzelac, V. (2021). Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of nettle leaves extracts obtained by advanced extraction techniques. *Molecules*, 26(20), 6153. <https://doi.org/10.3390/molecules26206153>
- Gironés-vilaplana, A., Mena, P., García-viguera, C., & Moreno, D. A. (2012). LWT - Food Science and Technology A novel beverage rich in antioxidant phenolics : Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.020>
- Ghaima, K. K., Hashim, N. M., & Ali, S. A. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(5), 96–99. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3518>
- Glei, M., Kirmse, A., Habermann, N., Persin, C., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Bread enriched with green coffee extract has chemoprotective and antigenotoxic activities in human cells. *Nutrition and Cancer*, 56(2), 182–192. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5602_9
- Gramza-Michalowska, A., & Regula, J. (2007). Use of tea extracts (*Camelia sinensis*) in jelly candies as polyphenols sources in human diet. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(SUPPL.1), 43–46.
- Grauso, L., de Falco, B., Lanzotti, V., & Motti, R. (2020). Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 19(6), 1341-1377. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09680-x>
- Gray, J. I., & Monahan, F. J. (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 3(December), 315–319. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(10\)80019-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(10)80019-6)
- Guil-Guerrero, J. L., Reboloso-Fuentes, M. M., & Torija Isasa, M. E. (2003). Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(2), 111–119. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00172-2)

- Guillén, M. D., & Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77(4), 503–510. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00371-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00371-5)
- Gül, S., Emirci, B., Başer, K. H., Akpulat, H. A., & Aksu, P. (2012). Chemical composition and *in vitro* cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from urtica dioica L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(5), 666–671. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0535-9>
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. I., Oktay, M., & Büyükokuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2–3), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.028>
- Guyot, S., Marnet, N., & Drilleau, J.-F. (2001). Thiolysis-HPLC Characterization of Apple Procyanidins Covering a.pdf. *Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 14–20. <https://doi.org/10.1021/jf000814z>
- Gupta, R. C., & Kanwar, G. (1994). Determination of Iodine Numbers of Edible Oils. *Archives of Oral Biology*, 22(1984), 1994.
- Gromadzka, J., Wardencki, W., Pawłowicz, R., & Muszyński, G. (2010). Photoinduced and thermal oxidation of rapeseed and sunflower oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(11), 1229–1235. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000057>
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B., & Kolahi, M. (2009). Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(1), 58–63. <https://doi.org/doi: 10.3923/pjbs.2009.58.63>
- Han, H., & Baik, B.-K. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(11), 1971–1978. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01800.x>
- Hartwig, V. G., Brumovsky, L. A., Fretes, R. M., & Boado, L. S. (2012). Procedimento padronizado para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de erva-mate. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 126–133. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000022>
- Hofmann, T., Bors, W., & Stettmaier, K. (1999). Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 379–390. <https://doi.org/10.1021/jf980626x>
- Holčapek, M., Jandera, P., Fischer, J., & Prokeš, B. (1999). Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A*, 858(1), 13–31. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00790-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00790-6)
- Huang, C. J., & ZAYAS, J. F. (1991). Phenolic Acid Contributions to Taste Characteristics of Corn Germ Protein Flour Products. *Journal of Food Science*, 56(5), 1308–1310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04759.x>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huang, S. W., Frankel, E. N., & German, J. B. (1994). Antioxidant activity of α - and γ -

- tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2108-2114.
- Hudec, J., Burdová, M., Kobida, L., Komora, L., Macho, V., Kogan, G., Turianica, I., Kochanová, R., Ložek, O., Habán, M., & Chlebo, P. (2007). Antioxidant capacity changes and phenolic profile of Echinacea purpurea, nettle (*Urtica dioica* L.), and dandelion (*Taraxacum officinale*) after application of polyamine and phenolic biosynthesis regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5689–5696. <https://doi.org/10.1021/jf070777c>
- Ifie, I., & Marshall, L. J. (2018). Food processing and its impact on phenolic constituents in food. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1507782>
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., & Sasner, J. J. (2003). Utilization of folin-ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1811–1815. <https://doi.org/10.1021/jf021099r>
- Irshad, M., Zafaryab, M., Singh, M., & Rizvi, M. M. A. (2012). Comparative Analysis of the Antioxidant Activity of Cassia fistula Extracts. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/157125>
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: Effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077–1090. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1990-x>
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Sportono, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., & Tomas, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 166-174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.08.006>
- Ixtaina, V. Y., Vega, A., Nolasco, S. M., Tomás, M. C., Gimeno, M., Bázquez, E., & Tecante, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *Journal of Supercritical Fluids*, 55(1), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.06.003>
- Jafari, Z., Samani, S. A., & Jafari, M. (2020). Insights into the bioactive compounds and physico-chemical characteristics of the extracted oils from *Urtica dioica* and *Urtica pilulifera*. *SN Applied Sciences*, 2(3), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2219-0>
- Jain, J. L., Jain, S., & Jain, N. (2004). *Fundamentals of Biochemistry*. Published by Chand (S.) & Co Ltd, India, 230-640.
- Jakobsen, M. U., Overvad, K., Dyerberg, J., Schroll, M., & Heitmann, B. L. (2004). Dietary fat and risk of coronary heart disease: Possible effect modification by gender and age. *American Journal of Epidemiology*, 160(2), 141–149. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh193>
- Jayathilakan, K., Sharma, G. K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2007). Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chemistry*, 105(3), 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.068>
- Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 295–350. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74079-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4)
- Ji, H. F., Li, X. J., & Zhang, H. Y. (2009). Natural products and drug discovery: Can thousands

- of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports*, 10(3), 194–200. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.12>
- Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Golay, P. A., Cotting, C., Lardeau, A., & Keely, B. J. (2008). Antioxidant activity of oregano, parsley, and olive mill wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7151-9. <https://doi.org/10.1021/jf801154r>.
- Joshi, B. C., Mukhija, M., & Kalia, A. N. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *International Journal of Green Pharmacy*, 201-209.
- Jolić, N. Antioksidacijska aktivnost fenola : interakcija derivata hidroksibenzoeve kiseline. Kemijsko-Tehnološki Fakultet. Sveučilište u Splitu. Split, 2017.
- Kan, Y., Orhan, İ., Koca, U., Özcelik, B., Aslan, S., Kartal, M., & Küsmenoglu, E. (2009). Fatty acid profile and antimicrobial effect of the seed oils of *Urtica dioica* and *U. pilulifera*. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 6 (1), 21-30.
- Kara, D. (2009). Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry*, 114(1), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.054>
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 703–725. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00513.x>
- Kamal-Eldin, A., & Pokorn, J. (2005). Lipid oxidation products and methods used for their analysis. In: *Analysis of lipid oxidation* (1st Edition). Chapter: 1, Publisher: AOCS Press, Editors: Kamal-Eldin, A., Pokorny, J., 5-12.
- Kenar, J. A., Gunstone, F. D., & Knothe, G. (2007) Chemical properties. In: *The lipid handbook* (3rd Edition). Chapter: 8, Publisher: CRC Press, Editors: Harwood, J. L., Frank, D., Gunstone, F. D., Dijkstra, A. J., 535-590.
- Khan, N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: Progress and promise. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(3), 475-510. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1740>
- Khare, V., Kushwaha, P., Verma, S., Gupta, A., Srivastava, S., & Rawat, A. (2012). Pharmacognostic Evaluation and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. *Chinese Medicine*, 03(03), 128–135. <https://doi.org/10.4236/cm.2012.33021>
- Khayri, M. J., Sahana, R. G., Nagella, P., Joseph, V. B., Alessa, M. F., & Al-Mssallem, Q. M. (2022). Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*, 27(9), 1-24. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kissinger, E. H. (2002). Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. *Analytical Chemistry*, 29(11), 1702–1706. <https://doi.org/10.1021/ac60131a045>
- Knaggs, A. R. (2001). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 18, 334-355.
- Knežević, M. Atlas korovne, ruderalne i travnjačke flore. Poljoprivredni fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2006.

- Koga, T., & Terao, J. (1995). Phospholipids Increase Radical-Scavenging Activity of Vitamin E in a Bulk Oil Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(6), 1450–1454. <https://doi.org/10.1021/jf00054a007>
- Koponen, J. M., Buchert, J., Poutanen, K. S., & Törrönen, A. R. (2008). Anthocyanins--nature, occurrence and dietary burden. *European Food Research & Technology*, 227(2), 1063–1072. <https://doi.org/10.1201/9781420039443>
- Körpe, D. A., Işeri, Ö. D., Sahin, F. I., Cabi, E., & Haberal, M. (2013). High-antibacterial activity of *Urtica* spp. seed extracts on food and plant pathogenic bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(3), 355–362. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.734290>
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., & Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 23(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982). Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. Extraction and Purification Procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330–334. <https://doi.org/10.1021/jf00110a028>
- Kukrić, Z. Z., Topalić-Trivunović, L. N., Kukavica, B. M., Matoš, S. B., Pavičić, S. S., Boroja, M. M., & Savić, A. V. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43, 257–272. <https://doi.org/10.2298/APT1243257K>
- Kumar H. M., Prathima, V. R., Sowmya, S., & Thribhuvan, K. R. (2013). Study of nutritional quality, phytochemical constituents and antioxidant activities by different solvents of nettle (*Urtica urens*) from madikeri-karnataka state. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 3, 112–119.
- Laguette, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–282. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>
- Lajnef, H. Ben, Mejri, H., Feriani, A., Khemiri, S., Saadaoui, E., Nasri, N., & Tlili, N. (2015). *Prosopis farcta* Seeds: Potential Source of Protein and Unsaturated Fatty Acids? *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(7), 1043–1050. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2660-1>
- Lambert, J. D., & Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.013>
- Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A. H., Fessi, H., & Elaissari, A. (2021). Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. *International Journal of Pharmaceutics*, 601(March), 120538. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538>
- Lampart-Szczapa, E. (2008). Compounds in Cold-Pressed Plant Oils. *System*, 15, 137–149.
- Landbo, A. K., & Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3169–3177. <https://doi.org/10.1021/jf001443p>

- Lapinskaya, E. S., Kopyt'ko, Y. F., Timokhina, E. A., Krapivkin, B. A., Levandovskii, G. S., Dargaeva, T. D., & Sokol'skaya, T. A. (2008). Amino acids and cyclic dipeptides in stinging nettle (*Urtica dioica* and *U. urens*) homeopathic matrix tinctures. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(11), 650–653. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0189-z>
- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., & Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3–4), 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00190-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00190-7)
- Litwinienko, G. (2001). Autooxidation of unsaturated fatty acids and their esters. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 65(2), 639–646. <https://doi.org/10.1023/A:1017974313294>
- Litwinienko, G., & Kasprzycka-Guttman, T. (1998). A DSC study on thermoxidation kinetics of mustard oil. *Thermochimica Acta*, 319(1–2), 185–191. [https://doi.org/10.1016/s0040-6031\(98\)00410-9](https://doi.org/10.1016/s0040-6031(98)00410-9)
- Litwinienko, Grzegorz, Kasprzycka-Guttman, T., & Studzinski, M. (1997). Effects of selected phenol derivatives on the autoxidation of linolenic acid investigated by DSC non-isothermal methods. *Thermochimica Acta*, 307(1), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(97\)00366-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(97)00366-3)
- Liu, K. S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/BF02540534>
- López De Dicastillo, C., Rodríguez, F., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2016). Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.013>
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 14–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- Malićanin, M. V. Izolovanje i fizičko-hemijska karakterizacija ulja iz semena crvenih sorti grožđa. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu. Beograd, 2014.
- Makri, M. (2013). Effect of oregano and rosemary essential oils on lipid oxidation of stored frozen minced gilthead sea bream muscle. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 8, 67–70. <https://doi.org/10.1007/s00003-013-0814-3>
- Mamat, H., Hardan, M.O.A., & Hill, S.E. (2010). Physicochemical properties of commercial semi-sweet biscuit. *Food Chemistry*, 121, 1029–1038.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mandal, P., Misra, T., Singh, I., Das, K., & Bhunia, M. (2009). Free-radical-scavenging activity in the inflorescence of European nettle/sisnu (*Urtica dioica* L.). *Journal of Young Pharmacists*, 1(2), 129. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.55745>
- Mandge, H. M., Sharma, S., & Dar, B. N. (2014). Instant multigrain porridge: Effect of cooking treatment on physicochemical and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 97–103. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0461-6>
- Mandić, V. Razvoj i validacija novog tipa hplc detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka

- u hrani. Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, 2015.
- Mansouri, F., Benmoumen, A., Richard, G., Fauconnier, M. L., Sindic, M., Serghini-Caid, H., & Elamrani, A. (2016). Characterization of monovarietal virgin olive oils from introduced cultivars in eastern Morocco. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 93(1), 21–30.
- Marcotte, M. (2007). Heat and mass transfer during baking. *Heat Transfer in Food Processing*, 13, 239–265. <https://doi.org/10.2495/978-1-85312-932-2/08>
- Marineli, R. da S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P2), 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>
- Martínez-Monteagudo, S. I., Saldaña, M. D. A., & Kennelly, J. J. (2012). Kinetics of non-isothermal oxidation of anhydrous milk fat rich in conjugated linoleic acid using differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 107(3), 973–981. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1649-8>
- Marzocchella, L., Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2011). Dietary Flavonoids: Molecular Mechanisms of Action as Anti- Inflammatory Agents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 5(3), 200–220. <https://doi.org/10.2174/187221311797264937>
- Masek, A., Chrzescijanska, E., & Latos, M. (2016). Determination of antioxidant activity of caffeic acid and p-coumaric acid by using electrochemical and spectrophotometric assays. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(12), 10644–10658. <https://doi.org/10.20964/2016.12.73>
- Maslowski, M., Aleksieiev, A., Miedzianowska, J., & Strzelec, K. (2021). Common nettle (*Urtica dioica* L.) as an active filler of natural rubber biocomposites. *Materials*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/ma14071616>
- Matijašević, B. O., & Turkulov, J. Tehnologija ulja i masti I deo. Tehnološki fakultet. Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad, 1980.
- Medicine, A., & Voiume, R. (2007). *Urtica urens* (Nettle). *Alternative Medicine Review*, 12(3), 280–285.
- Medoua, G. N., & Oldewage-Theron, W. H. (2014). Effect of drying and cooking on nutritional value and antioxidant capacity of morogo (*Amaranthus hybridus*) a traditional leafy vegetable grown in South Africa. *Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 736–742. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0560-4>
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research: PTR*, 15(2), 127–130. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>
- Mendoza, F., Dejmek, P., & Aguilera, J. (2006). Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.04.004>
- Metivier, R. P., Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. (1968). Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45(4), 1099–1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07534.x>
- Mihaljev, Ž., Živkov-Baloš, M., Čupić, Ž., & Jakšić, S. (2014). Levels of some microelements

- and essential heavy metals in herbal teas in Serbia. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 71(3), 385–391.
- Micić, D. M., Ostojić, S. B., Simonović, M. B., Krstić, G., Pezo, L. L., & Simonović, B. R. (2015). Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC. *Thermochimica Acta*, 601, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.12.018>
- Musakhanian, J., Rodier, D. J., & Dave, M. (2022). Oxidative Stability in Lipid Formulations: a Review of the Mechanisms, Drivers, and Inhibitors of Oxidation. *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, 23(151), 1-30. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02282-0>
- Mudgil, D., Barak, S., & Khatkar, S. B. (2017). Cookie texture, spread ratio and sensory acceptability of cookies as a function of soluble dietary fiber, baking time and different water levels. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 537-542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.009>
- Mohammed, M. T., Sura Mohammed Kadhim, A. M. N., & Abbas, J. and S. I. (2015). Free Radicals and Human Health. *International Journal of Innovation Science and Research*, 4(6), 218–223. <http://www.ijisr.com/sites/default/files/issues-pdf/101.pdf>
- Mocanu, M., Nagy, P., & Szöll, J. (2015). Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Polyphenols. *Molecules*, 20, 22578–22620. <https://doi.org/10.3390/molecules201219864>
- Moran, L., Horton, R., Rawn, D., Scrimgeour, G., & Perry, M. (2012). Principles of Biochemistry (5th Edition). Pearson Education, 256-511.
- Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(7), 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Mzid, M., Khedir, S. Ben, Salem, M. Ben, Regaieg, W., & Rebai, T. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 775–781. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1275025>
- Nair, H. K., Rao, K. V. K., Aalinkeel, R., Mahajan, S., Chawda, R., & Schwartz, S. A. (2004). Inhibition of Prostate Cancer Cell Colony Formation by the Flavonoid Quercetin Correlates with Modulation of Specific Regulatory Genes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 63–69. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.1.63-69.2004>
- Nair, M. P., Mahajan, S., Reynolds, J. L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S. A., & Kandaswami, C. (2006). The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(3), 319–328. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.3.319-328.2006>
- Namazi, N., Esfanjani, A. T., Heshmati, J., Bahrami, A., & Nazemiyeh, H. (2012). A systematic review about effects of aerial portions of *Urtica dioica* (nettle) on some cardiovascular risk factors in diabetes mellitus. *International Journal of Pharmacology*, 8(5), 306–313. <https://doi.org/10.3923/ijp.2012.306.313>
- Nardini, M., & Ghiselli, A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84(1), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00257-7)
- Nayak, B., Liu, R. H., & Tang, J. (2015). Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 887–918. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.654142>

- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797–1806. <https://doi.org/10.5897/AJB07.613>
- Nerling, D., Coelho, C. M. M., & Brümmer, A. (2018). Biochemical profiling and its role in physiological quality of maize seeds. *Journal of Seed Science*, 40(1), 7–15. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n1172734>
- Nestel, P. J., Noakes, M., Belling, G. B., McArthur, R., Clifton, P. M., & Abbey, M. (1992). Plasma cholesterol-lowering potential of edible-oil blends suitable for commercial use. *American Journal of Clinical Nutrition*, 55(1), 46–50. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.1.46>
- Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 94–100. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00023-0)
- Nicoli, Maria Cristina, Anese, M., Parpinel, M. T., Franceschi, S., & Lericci, C. R. (1997). Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*, 114(1–2), 71–74. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04628-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04628-4)
- Nikolić, N. Č., Cakić, S. M., Novaković, S. M., Cvetković, M. D., & Stanković, M. Z. (2009). Effect of extraction techniques on yield and composition of soybean oil. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 28(2), 173–179. <https://doi.org/10.20450/mjccce.2009.208>
- Nikolić, N., Stojanović, J., Mitrović, J., Lazić, M., Karabegović, I., & Stojanović, G. (2016). The antioxidant activity and the composition of free and bound phenolic acids in dough of wheat flour enriched by *Boletus edulis* after mixing and thermal processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2019–2025. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13172>
- Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry*, 275(May 2018), 644–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.083>
- Oñate, M., & Munné-Bosch, S. (2009). Influence of plant maturity, shoot reproduction and sex on vegetative growth in the dioecious plant *Urtica dioica*. *Annals of Botany*, 104(5), 945–956. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp176>
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., & Girard, B. (2000). Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 69(2), 187–193. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00260-5)
- Oellig, C., Blankart, M., Hinrichs, J., Schwack, W., & Granvog, M. (2020). Determination of mono- and diacylglycerols from E 471 food emulsifiers in aerosol whipping cream by high-performance thin-layer chromatography–fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 7441–7451. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02876-2>
- Oliveira, M. dos S., Cipolatti, E. P., Furlong, E. B., & Soares, L. de S. (2012). Compostos fenólicos e atividade antioxidante em farelo de arroz (*Oryza sativa*) fermentado. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 32(3), 531–537. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000071>
- Orcic, D., Franciškovic, M., Bekvalac, K., Svircev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukic,

- N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, *143*, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097>
- Osman, N. M., Mohamed Ahmed, I. A., & Babiker, E. E. (2010). Fermentation and cooking of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) leaves: Changes in chemical and amino acid composition, antinutrients and protein fractions and digestibility. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*(1), 124–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02111.x>
- Oswell, N. J., Thippareddi, H., & Pegg, R. B. (2018). Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. *Meat Science*, *145*, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.020>
- Otles, S., & Yalcin, B. (2012). Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *The Scientific World Journal*, *2012*, 1-12. <https://doi.org/10.1100/2012/564367>
- Ozawa, T. (1965). A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *38*(11), 1881–1886. <https://doi.org/10.1246/bcsj.38.1881>
- Özcan, M. M., & Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, *129*(1), 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.055>
- Özkan, A., Yumrutaş, Ö., Saygideğer, S. D., & Kulak, M. (2011). Evaluation of antioxidant activities and phenolic contents of some edible and medicinal plants from Turkey's flora. *Advances in Environmental Biology*, *5*(2 SPEC. ISSUE), 231–236.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, *44*(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2006). Lipid oxidation. In: *Advanced Dairy Chemistry. Lipids* (3rd Edition). Chapter: 16, Publisher: Springer Science+Business Media, Inc. 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, Editors: Fox, P. F., McSweeney, P., 557-600.
- O'Keefe, F. S., Wiley, A. V., Knauff, A. D. (1993). Comparison of oxidative stability of high- and normal-oleic peanut Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *70*(5), 489 – 493. <https://doi.org/10.1007/BF02542581>
- Paulauskienė, A., Tarasevičienė, Ž., & Laukagalis, V. (2021). Influence of harvesting time on the chemical composition of wild stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Plants*, *10*(4), 686. <https://doi.org/10.3390/plants10040686>
- Pant, V., & Sundriyal, R. C. (2016). Nutritional and therapeutic efficacy of Stinging Nettle-A review Ph ton The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine Ph ton Nutritional and therapeutic efficacy of Stinging Nettle-A review. *The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine. Photon*, *126*(January), 1240–1254. <https://sites.google.com>
- Pardaul, J. J. R., Souza, L. K. C., Molfetta, F. A., Zamian, J. R., Rocha Filho, G. N., & Da Costa, C. E. F. (2011). Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. *Bioresource Technology*, *102*(10), 5873–5877. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.022>
- Pajin, B. Praktikum iz tehnologije konditorskih proizvoda. Tehnološki fakultet. Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad, 2009.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical*

- Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Piluzza, G., & Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 240–247. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., & Romani, A. (2008). Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9127–9132. <https://doi.org/10.1021/jf801552d>
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.015>
- Petkova YZ, Antova AG, and Angelova-Romova YM. 2020. Biologically active components and health benefits of nettle seed oil. *Grasas y aceites*. 71(1):e347. <https://doi.org/10.3989/gya.0108191>
- Porter, W. L. (1993). Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health*, 9(1-2), 93-122. <https://doi.org/10.1177/0748233793009001-209>
- Porter, W. L. (1980). Recent trends in food applications of antioxidants. In: *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Chapter: 19, Publisher: Springer, Boston, MA, Editors: Simic G. M. and Karel M., 295-365. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9351-2_19
- Porter, W. L., Black, E. D., & Drolet, A. M. (1989). Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 615-624. <https://doi.org/10.1021/jf00087a009>
- Pradhan, S., Manivannan, S., & Tamang, J. P. (2015). Proximate, mineral composition and antioxidant properties of some wild leafy vegetables. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 74(3), 155–159.
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) Using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1270–1276. <https://doi.org/10.1021/jf001211q>
- Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J. E., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95(4), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.049>
- Radojković, M. M., Zeković, Z. P., Dojinović, B. P., Stojanović, Z. S., Cvetanović, A. D., & Manojlović, D. D. (2014). Characterization of *Morus* species in respect to micro, macro, and toxic elements. *Acta Periodica Technologica*, 45(January), 229–237. <https://doi.org/10.2298/APT1445229R>
- Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., Simonovska, J., & Srbinska, M. (2013). Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Quality of Life*, 4(1–2), 26-30. <https://doi.org/10.7251/qol1301026r>
- Rafalowski, R., Zegarska, Z., Kuncewicz, A., & Borejszo, Z. (2008). Fatty Acid Composition, Tocopherols and Beta-Carotene Content in Polish Commercial Vegetable Oils. *Pakistan*

- Journal of Nutrition*, 7(2), 278-282. <https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2008.278.282>
- Ragae, S., Seetharaman, K., & Abdel-Aal, E. S. M. (2014). The Impact of Milling and Thermal Processing on Phenolic Compounds in Cereal Grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 837–849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.610906>
- Rajput, P., Chaudhary, M., & Sharma, R. A. (2018). Phytochemical and pharmacological importance of genus urtica - a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(4), 1387–1396. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(4\).1387-96](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1387-96)
- Raemy, A., Froelicher I., & Loeliger, J. (1987). Oxidation of lipids studied by isothermal heat flux calorimetry. *Thermochimica acta*, 114, 159-164. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(87\)80255-1](https://doi.org/10.1016/0040-6031(87)80255-1)
- Redondo-Cuevas, L., Castellano, G., Torrens, F., & Raikos, V. (2018). Revealing the relationship between vegetable oil composition and oxidative stability: A multifactorial approach. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.027>
- Reis Giada, M. de L. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A role for antioxidants*. Chapter: 4, Publisher: Intech Publisher, Editors: Moralez-González J. A. <https://doi.org/10.5772/51687>
- Repajić, M., Cegledi, E., Zorić, Z., Pedisić, S., Garofulić, I. E., Radman, S., Palčić, I., & Dragović-Uzelac, V. (2021). Bioactive compounds in wild nettle (*Urtica dioica* L.) leaves and stalks: Polyphenols and pigments upon seasonal and habitat variations. *Foods*, 10(1), 190. <https://doi.org/10.3390/foods10010190>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Riva, M., & Schiraldi, A. (1993). Kinetic parameterization of transitions and reactions in food systems from isothermal and non-isothermal DSC traces. *Thermochimica Acta*, 220(C), 117–130. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(93\)80459-N](https://doi.org/10.1016/0040-6031(93)80459-N)
- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 657-691. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00058-X)
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- Roman-Gutierrez, A. D., Guilbert, S., & Cuq, B. (2002). Description of microstructural changes in wheat flour and flour components during hydration by using environmental scanning electron microscopy. *LWT - Food Science and Technology*, 35(8), 730–740. <https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0932>
- Roszkowska, B., Tańska, M., Czaplicki, S., & Konopka, I. (2015). Variation in the composition and oxidative stability of commercial rapeseed oils during their shelf life. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(5), 673–683. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400271>
- Roat-Malone, R. M. (2007). *Bioinorganic chemistry: A short course* (2nd ed.). Publishers: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. <https://doi.org/10.1002/9780470191712>

- Rutakhli, A., Sabahi, H., & Riazi, G. H. (2019). Nanocomposite of montmorillonite/nettle extract: A potential ingredient for functional foods development. *Journal of Functional Foods*, 57(April), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.004>
- Rutto, L. K., Xu, Y., Ramirez, E., & Brandt, M. (2013). Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International Journal of Food Science*, 2013, 857120. <https://doi.org/10.1155/2013/857120>
- Rudnik, E., Szczucinska, A., Gwardiak, H., Szulc, A., & Winiarska, A. (2001). Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. *Thermochimica Acta*, 370(1–2), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(00\)00781-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(00)00781-4)
- Ryan, E., Aherne, S. A., O’Grady, M. N., McGovern, L., Kerry, J. P., & O’Brien, N. M. (2009). Bioactivity of herb-enriched beef patties. *Journal of Medicinal Food*, 12(4), 893–901. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0069>
- Sabinus, O. O. E. (2012). Physico-chemical properties of oil from some selected underutilized oil seeds available for biodiesel preparation. *African Journal of Biotechnology*, 11(42), 10003-10007. <https://doi.org/10.5897/ajb11.1659>
- Safamehr, A., Mirahmadi, M., & Nobakht, A. (2012). Effect of nettle (*Urtica dioica*) medicinal plant on growth performance, immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chickens. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(4), 721–728. <http://www.irjabs.com>
- Saldaña, M. D. A., & Martínez-Monteagudo, S. I. (2013). Oxidative Stability of Fats and Oils Measured by Differential Scanning Calorimetry for Food and Industrial Applications. *World's largest Science, Technology & Medicine*, 445-475. <http://dx.doi.org/10.5772/54486>
- Sani, N. A., Taip, F. S., Kamal, S. M. M., & Aziz, N. A. (2014). Effects of temperature and airflow on volume development during baking and its influence on quality of cake. *Journal of Engineering Science and Technology*, 9(3), 303–313.
- Sanders, M. E. (1998). Overview of functional foods: Emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5–6), 341–347. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00056-9)
- Sandra, P., & David, F. (2000). High Temperature Gas Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*, 497-504. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/01201-1>
- Sari, H. S. (2016). Effects of Purslane , Stinging Nettle and Flax Seed Flours on Some Physicochemical and Sensory Properties of Naturally Fermented Turkish Style Semi-Dry Sausage (Sucuk). *International Journal of Applied Science and Technology*, 6(3), 67–78.
- Sarma Katak, M. (2012). Antioxidant, Hepatoprotective, and Anthelmintic Activities of Methanol Extract of *Urtica dioica* L. Leaves. *Pharmaceutical Crops*, 3(1), 38–46. <https://doi.org/10.2174/2210290601203010038>
- Scapin, G., Schmidt, M. M., Prestes, R. C., & Rosa, C. S. (2016). Phenolics compounds, flavonoids and antioxidant activity of chia seed extracts (*Salvia hispanica*) obtained by different extraction conditions. *International Food Research Journal*, 23(6), 2341–2346.
- Schmid, M., & Affolter, S. (2003). Interlaboratory tests on polymers by differential scanning calorimetry (DSC): Determination and comparison of oxidation induction time (OIT) and oxidation induction temperature (OIT). *Polymer Testing*, 22(4), 419–428. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(02\)00122-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(02)00122-8)

- Schulte, L. R., Ballard, T., Samarakoon, T., Yao, L., Vadlani, P., Staggenborg, S., & Rezac, M. (2013). Increased growing temperature reduces content of polyunsaturated fatty acids in four oilseed crops. *Industrial Crops and Products*, *51*, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.075>
- Seiquer, I., Rueda, A., Olalla, M., & Cabrera-Vique, C. (2015). Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, *188*, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.006>
- Sekeroglu, N., Ozkutlu, F., Metin, D., Ozbay, D., & Nuri, Y. (2006). Evaluation of Some Wild Plants Aspect of Their Nutritional Values Used as Vegetable in Eastern Black Sea Region of Turkey. *Asian Journal of Plant Sciences*, *5*(2), 185–189. <https://scialert.net/abstract/?doi=ajps.2006.185.189>
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., & Boudoukha, C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *54*(4), 313–318. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00260>
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *3*(1), 91–100.
- Şensoy, Í., Rosen, R. T., Ho, C. T., & Karwe, M. V. (2006). Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, *99*(2), 388–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.007>
- Septoe, N. L., & Town, C. Effect of Fluid Substitutions on the Total Antioxidant Capacity of Breads : Comparing the Indigenous Herbal Teas Rooibos and Honeybush with Black Tea. Faculty of Applied Sciences. The Cape Peninsula University of Technology. Cape Town, 2011.
- Serfert, Y., Drusch, S., & Schwarz, K. (2009). Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, *113*(4), 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.079>
- Shahidi, F., & Yeo, J. D. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, *21*(9), 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Sharma V. (1995). Chemical analysis of the oils from the seeds of Urticaceae family [two species].<URL:https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/128060/9/06_chapter%202.pdf. Accessed 9 January 2020.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y., & Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - Engineering and technology. *Food Reviews International*, *21*(1), 139–166. <https://doi.org/10.1081/FRI-200040606>
- Shin, J. E., Kim, J. M., Bae, E. A., Hyun, Y. J., & Kim, D. H. (2005). *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of Helicobacter pylori. *Planta Medica*, *71*(3), 197–201. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837816>
- Shonte, T. T., Duodu, K. G., & de Kock, H. L. (2020). Effect of drying methods on chemical composition and antioxidant activity of underutilized stinging nettle leaves. *Heliyon*, *6*(5), e03938. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03938>
- Shen, N., Fehr, W., Johnson, L., & White, P. (1997). Oxidative stability of soybean oils with elevated palmitate and reduced linolenate contents. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*, 299 -302. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0140-y>

- Shu-Cheng Duan, Soon J. K., & Seok, H. E., (2021). Effect of Thermal Processing on Color, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Leaves and Seeds. *Antioxidants*, 10, 1207. <https://doi.org/10.3390/antiox10081207>
- Shankwalkar, S., & Placek, D. (1993). Oxidation kinetics of tricresyl phosphate (TCP) using differential scanning calorimetry (DSC). *Lubrication Engineering*, 50(3), 261-264.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., Quek, S., & Perera, C. O. (2011). Physicochemical properties of bread dough and finished bread with added pectin fiber and phenolic antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(3), 97-107. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02086.x>
- Sikora, M., Kowalski, S., Krystyan, M., Krawontka, J., & Sady, M. (2007). Optimization of cornstarch/xanthan gum content for thickening of cocoa syrups. *Journal of Food Quality*, 30, 682-702. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00150.x>
- Skouroliakou, M., Kastanidou, O., Stathopoulou, M., & Vourli, G. (2009). Evaluation of the antioxidant effect of a new functional food enriched with sideritis euboica in healthy subjects. *Journal of Medicinal Food*, 12(5), 1105-1110. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0172>
- Sokol-Łetowska, A., Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chemistry*, 103(3), 853-859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.036>
- Son, S., & Lewis, B. A. (2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 468-472. <https://doi.org/10.1021/jf010830b>
- Sudha, M. L., Srivastava, A. K., Vetrmani, R., & Leelavathi, K. (2007). Fat replacement in soft dough biscuits: Its implication on dough rheology and biscuit quality. *Journal of Food Engineering*, 80, 922-930. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.08.006>
- Spencer, J. P. E. (2003). Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health : Role of Flavonoids in the Diet Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Nutrition*, 133(27), 3255-3261. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073577>
- Spiridon, I., Bodirlau, R., & Teaca, C. A. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology*, 6(3), 388-396. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0028-6>
- Srinivasan, K. (2018). Cumin (*Cuminum cyminum*) and black cumin (*Nigella sativa*) seeds: Traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. *Food Quality and Safety*, 2(1), 1-16. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx031>
- Stanojević, Lj. P., Zdravković, A. S., & Stanković, M. Z. (2013). Antioksidativna Aktivnost Vodeno-Etanolnih Ekstrakata Iz Lista Koprive (*Urtica dioica* L.). *Savremene Tehnologije*, 2(1), 51-59.
- Steinke, R. D., & Paulson, M. C. (1964). Phenols from grain: The Production of Steam-Volatile Phenols during Cooking and Alcoholic Fermentation of Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(4), 381-387. <https://doi.org/10.1021/jf60134a022>
- Stojanović, I. Ž., Radulović, N. S., Mitrović, T. L., Stamenković, S. M., & Stojanović, G. S.

- (2011). Volatile constituents of selected Parmeliaceae lichens. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(7), 987–994. <https://doi.org/10.2298/JSC101004087S>
- Stojković, B. M. Antioksidativna aktivnost, fenolni i mineralni sastav biljnih vrsta: *Geranium macrorrhizum* L., *Allium ursinum* L., *Stachys germanica* L. I *Primula veris* L. Prirodno-matematički fakultet. Univerzitet u Nišu. Niš, 2014.
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
- Szewczuk, C., & Mazur, M. (2004). Wpływ zróżnicowanych dawek nawozów azotowych na skład chemiczny pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica* L.) zbieranej w trzech fazach rozwojowych. Cz. II. Zawartość składników mineralnych. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura*, 03(1), 229–237.
- Tabrez, S., Priyadarshini, M., Urooj, M., Shakil, S., Ashraf, G. M., Khan, M. S., Kamal, M. A., Alam, Q., Jabir, N. R., Abuzenadah, A. M., Chaudhary, A. G. A., & Damanhour, G. A. (2013). Cancer chemoprevention by polyphenols and their potential application as nanomedicine. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 31(1), 67–98. <https://doi.org/10.1080/10590501.2013.763577>
- Tack, P. M., & Verloo, M. G. (1996). Metal contents in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as affected by soil characteristics. *Science of the Total Environment*, 192(1), 31–39. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05289-8](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05289-8)
- Talcott, S. T., Brenes, C. H., Pires, D. M., & Del Pozo-Insfran, D. (2003). Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 957–963. <https://doi.org/10.1021/jf0209746>
- Tan, C. P., Che Man, Y. B., Selamat, J., & Yusoff, M. S. A. (2001). Application of Arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(11), 1133–1138. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0401-1>
- Tan, C. P., Che Man, Y. B., Selamat, J., & Yusoff, M. S. A. (2002). Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chemistry*, 76(3), 385–389. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00272-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00272-2)
- Tang, Y., Zhang, B., Li, X., Chen, P. X., Zhang, H., Liu, R., & Tsao, R. (2016). Bound Phenolics of Quinoa Seeds Released by Acid, Alkaline, and Enzymatic Treatments and Their Antioxidant and α -Glucosidase and Pancreatic Lipase Inhibitory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(8), 1712–1719. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05761>
- Tian, X., Li, F., Zhu, L., & Ye, B. (2008). Study on the electrochemical behavior of anticancer herbal drug rutin and its interaction with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 621(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.02.022>
- Turyan, I. Y., Berezin, Y. O., Kuselman, I., & Shenhar, A. (1998). Determination of acid values in oil seeds. United States Patent, Patent Number: 5,773,295.
- Troszyńska, A., Estrella, I., Lamparski, G., Hernández, T., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2011). Relationship between the sensory quality of lentil (*Lens culinaris*) sprouts and their phenolic constituents. *Food Research International*, 44(10), 3195–3201.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.007>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812(1-2), 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.028>
- Tsao, R., Khanizadeh, S., & Dale, A. (2006). Designer fruits and vegetables with enriched phytochemicals for human health. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(3), 773–786. <https://doi.org/10.4141/P05-138>
- Tsao, R., & McCallum, J. (2009). Chemistry of Flavonoids. In: *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. Chapter: 5, Publisher: Ames, IA, USA, Editors: de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., E., 131–153.
- Tuberoso, C. I. G., & Orrù, C. D. (2008). Phenolic compounds in food. *Progress in Food Chemistry*, 4, 1–45. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>
- Tura, D., & Robards, K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 71–93. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00879-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00879-8)
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.034>
- Ulkowski, M., Musialik, M., & Litwinienko, G. (2005). Use of differential scanning calorimetry to study lipid oxidation. Oxidative stability of lecithin and linolenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9073–9077. <https://doi.org/10.1021/jf051289c>
- Uluata, S., & Özdemir, N. (2012). Antioxidant activities and oxidative stabilities of some unconventional oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(4), 551–559. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1955-0>
- Vajić, U. J., Grujić-Milanović, J., Živković, J., Šavikin, K., Godevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B., & Mihailović-Stanojević, N. (2015). Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74, 912–917. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.032>
- Van Krevelen, D. W. (1997). Thermal Decomposition. *Properties of Polymers*, 1(5), 641–653. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-82877-4.50028-7>
- Velasco, J., Andersen, M. L., & Skibsted, L. H. (2004). Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85(4), 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.020>
- Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S., & Dordević, A. S. (2014). Sadržaj fenola, antioksidativna i antimikrobna aktivnost ekstraktata ploda trnjine (*Prunus spinosa* L.). *Hemijska Industrija*, 68(3), 297–303. <https://doi.org/10.2298/HEMIND130312054V>

- Verma, A. K., Johnson, J. A., Gould, M. N., & Tanner, M. A. (1988). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-and n-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Research*, *48*(20), 5754–5758.
- Verma, B., Hucl, P., & Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, *116*(4), 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.060>
- Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P. M., & Vangelisti, R. (2003). A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*(2–3), 221–244. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.08.003>
- Vogl, C. R., & Hartl, A. (2003). Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: A review. *American Journal of Alternative Agriculture*, *18*(3), 119–128. <https://doi.org/10.1079/AJAA200242>
- Vyazovkin, S., Burnham, A. K., Criado, J. M., Pérez-Maqueda, L. A., Popescu, C., & Sbirrazzuoli, N. (2011). ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data. *Thermochimica Acta*, *520*(1–2), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2011.03.034>
- Vyazovkin, S., Chrissafis, K., Di Lorenzo, M. L., Koga, N., Pijolat, M., Roduit, B., Sbirrazzuoli, N., & Suñol, J. J. (2014). ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations. *Thermochimica Acta*, *590*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.05.036>
- Wang, Lijun, & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(6), 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wang, Lu, Lin, X., Zhang, J., Zhang, W., Hu, X., Li, W., Li, C., & Liu, S. (2019). Extraction methods for the releasing of bound phenolics from *Rubus idaeus* L. leaves and seeds. *Industrial Crops and Products*, *135*(April), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.003>
- Wang, S. Y., & Gao, H. (2013). Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x aranassa* Duch.). *LWT - Food Science and Technology*, *52*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.003>
- Warren P., 2006. 101 uses for Stinging Nettles. Wildeye United Kingdom. p. 50.
- Wetherilt, H. (1992). Evaluation of URTICA Species as Potential Sources of Important Nutrients. *Developments in Food Science*, *29*, 15–25. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-88834-1.50007-7>
- Wijtmans, M., A. Pratt, D., Brinkhorst, J., Serwa, R., Valgimigli, L., Franco Pedulli, G., & A. Porter, N. (2004). Synthesis and Reactivity of Some 6-Substituted-2,4-dimethyl-3-pyridinols, a Novel Class of Chain-Breaking Antioxidants. *The Journal of Organic Chemistry*, *69*(26), 9215–9223. <https://doi.org/10.1021/jo048842u>
- Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(6), 1060–1066. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.010>
- Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (1992). Inhibited oxidation of lipids I: complex estimation and comparison of the antioxidative properties of some natural and synthetic antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *94* (10), 374–379.

- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, 57(3), 508–514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>
- Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F., & Bal, R. (2009). Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.031>
- Yunuskhodzhaeva, N. A., Abdullabekova, V. N., Ibragimova, K. S., & Mezhlumyan, L. G. (2014). Amino- Acid Composition of *Urtica dioica* leaves and *Polygonum hydropiper* and *P. aviculare* herbs. *Chemistry of Natural Compounds*; 50(5), 970-971. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs10600-014-1137-z>
- Youzbachi, N., Trabelsi, H., Elfalleh, W., Khaldi, A., Nasri, N., & Tlili, N. (2019). Fatty acids and triacylglycerols composition from Tunisian *Acacia* species seed oil. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3302–3308. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.020>
- Zahoranová, A., Štefečka, M., Černák, M., & Šurda, V. (1999). Prebreakdown positive corona streamers and the streamer-cathode contact in hydrogen. *Czechoslovak Journal of Physics*, 49(6), 941–956. <https://doi.org/10.1023/A:1021424902394>
- Zarroug, Y., Sriti, J., Sfayhi, D., Slimi, B., Alloucha, W., Zayani, K., Hammami, K., Sowalhia, M., & Kharrat, M. (2021). Effect of addition of Tunisian *Zizyphus lotus* L. Fruits on nutritional and sensory qualities of cookies. *Italian Journal of Food Science*, 33 (4), 84–97. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33i4.2095>
- Zeković, Z., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Gorjanović, S., Sužnjević, D., Mašković, P., Savić, S., Radojković, M., & Đurović, S. (2017). Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 108(May), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.055>
- Zhou, K., & Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 717–721. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.008>
- Žilić, S., Kocadağlı, T., Vančetović, J., & Gökmen, V. (2016). Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.057>
- Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Mitrović je rođena 01. jula 1991. godine u Gnjilanu. Osnovnu školu završila je u Ranilugu (Kosovska Kamenica), a srednju Medicinsku školu u Velikom Ropotovu kao nosilac Vukove diplome. Tehnološki fakultet u Leskovcu, studijsko područje Prehrambene tehnologije i biotehnologija, upisala je 2010. godine, i u toku studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Osnovne akademske studije na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Nišu, završila je u roku sa prosečnom ocenom 9,80, master akademske studije sa prosečnom ocenom 10 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.



Tokom osnovnih i master studija bila je dobitnik mnogobrojnih nagrada i priznanja. Školske 2012/13. godine nagrađena je Konstantinovom stipendijom i specijalnim priznanjem za ostvaren akademski uspeh, društveni angažman i postignute rezultate u unapređenju lokalne zajednice, koju grad Niš i kompanija Phillip Morris kroz program „Pokreni se za budućnost“ dodeljuje najistaknutijim studentima Univerziteta. Dobitnik je stipendije „Fonda za mlade talente - Dositeja“ za najbolje studente završnih godina master akademskih studija 2014/15. godine u Republici Srbiji. Za izuzetan uspeh u toku studija, nagrađena je i Specijalnim priznanjem za 2015. godinu od strane Srpskog hemijskog društva u Beogradu. Tokom studija je svake godine nagrađivana od strane Tehnološkog fakulteta za ostvaren uspeh i postignute rezultate.

Još u toku studiranja, 2011. godine, Jelena Mitrović postaje član nevladine organizacije „Centar za društvenu afirmaciju mladih“ u Ranilugu gde kao volonter obavlja aktivnosti u cilju poboljšanja uslova života. Nakon toga, 2013. godine volontira 100 radnih sati u Upravi za privredu, održivi razvoj i zaštitu životne sredine u Nišu. Januara 2014. godine postaje član Skupštine opštine Ranilug (odbornik) i ovu dužnost obavlja četiri godine. Septembra 2015. godine postaje nastavnik biologije u Medicinskoj školi u Velikom Ropotovu. Svoje znanje i veštine usavršava i učešćem na brojnim seminarima u vezi sa izradom biznis planova, preduzetništvom, menadžmentom malih i srednjih preduzeća i drugim relevantnim temama.

Doktorske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, studijski program Tehnološko inženjerstvo, upisuje 2015. godine. Od 2016. godine angažovana je na izvođenju laboratorijskih vežbi iz predmeta koji pripadaju Katedri za prehrambene tehnologije i biotehnologiju. Juna 2018. godine, Jelena Mitrović je angažovana i na poslovima istraživač-pripravnik Ministarstva

prosvete i nauke Republike Srbije u realizaciji projekta „Biljni i sintetički bioaktivni proizvodi novije generacije“ (evidencioni broj projekta 34012), a od februara 2021. godine angažovana je na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu sa zvanjem istraživač-saradnik na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Novembra 2022. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Prehrambene tehnologije i biotehnologija na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu. Učestvovala je u recenzijama naučnih radova međunarodnih časopisa sa SCI liste, na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima u Srbiji i inostranstvu, sajmovima nauke i bila član komisija i podkomisija koje učestvuju u radu Fakulteta. Autor i koautor je jednog rada koji je objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), tri rada u vrhunskom međunarodnom časopisu M22, jednog rada u međunarodnom časopisu M23, jednog rada u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja M24, dva saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini (M33), osam saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34), jednog rada u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (M51), jednog rada u časopisu nacionalnog značaja (M52) i sedam saopštenja sa nacionalnog skupa štampana u izvodu (M64).

PREGLED DOSADAŠNJEG NAUČNO-ISTRAŽIVAČKOG RADA

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21 (8):

Nada Č. Nikolić, Marija Stojanović Krasić, Olivera Šimurina, Suzana Cakić, **Jelena Mitrović**, Mirjana Pešić, Ivana Karabegović, Regression analysis in examination the rheology properties of dough from wheat and *Boletus edulis* flour, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 115, 105022. DOI:10.1016/j.jfca.2022.105022. (IF 4.52 za 2021., Chemistry, Applied, 19/73)

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M22 (5):

Nada Nikolić, Jelena Stojanović, **Jelena Mitrović**, Miodrag Lazić, Ivana Karabegović, Gordana Stojanović, The antioxidant activity and the composition of free and bound phenolic acids in dough of wheat flour enriched by *Boletus edulis* after mixing and thermal processing, *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, 51(9), pp. 2019–2025. DOI:10.1111/ijfs.13172. (IF 1.755 za 2016., Food Science & Technology, 57/130)

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Gordana Stojanović, Characterization of free and insoluble-bound phenolics of chia (*Salvia*

hispanica L.) seeds, *Natural Product Research*, 2020, 36(1), pp. 385-389, ISSN: 1478-6419. DOI:10.1080/14786419.2020.1761357. (IF 2.862 za 2020., Chemistry, Applied, 33/74)

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Ljubiša Nikolić, Saša Savić, Mirjana Pešić, Olivera Šimurina, Marija Stojanović-Krasić, The effect of thermal processing on the content and antioxidant capacity of free and bound phenolics of cookies enriched by nettle (*Urtica dioica* L.) seed flour and extract, *Food Science and Technology = Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 2021, pp. 1-9, ISSN: 1678-457X. DOI:10.1590/fst.62420. (IF 2.968 za 2021., Food Science and Technology, 82/143)

Rad u međunarodnom časopisu, M23 (3):

Nada Nikolić, **Jelena Mitrović**, Ivana Karabegović, Saša Savić, Sanja Petrović, Miodrag Lazić, Gordana Stojanović, A comparison between wheat and different kinds of corn flour based on minerals, free phenolic acid composition and antioxidant activity, *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 2019, 11(4), pp. 341-349, ISSN: 1757-837X. DOI:10.3920/QAS2018.1411 (IF 0.70 za 2019., Food Science and Technology, 113/139)

Nacionalni časopis međunarodnog značaj, M24 (3):

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Bojana Danilović, Miodrag Lazić, Ljubiša Nikolić, Nettle (*Urtica dioica* L.) seeds as a source of free and bound phenolics: the antioxidant, antimicrobial activity and the composition, *Advanced technologies*, 2020, 9(1), pp. 13-20.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini, M33 (1):

Nada Nikolić, **Jelena Mitrović**, Miodrag Lazić, Ivana Karabegović, Gordana Stojanović, Jasna Mastilović, The effect of mixing and thermal processing on the content and composition of free and bound phenolics acids in wheat flour dough, *Proceedings - III International Congress Food Technology, Quality and Safety*, 25-27 October, Novi Sad, Serbia, 2016, pp. 499-503.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, The content, composition and antioxidant activity of phenolic compounds of different aqueous extracts of nettle (*Urtica dioica* L.) seeds, *Proceedings - IV International Congress "Food Technology, Quality and Safety"*, 23-25 October, Novi Sad, Serbia, 2018, pp. 1-5.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu, M34 (0,5):

Jelena Mitrović, Saša Savić, Sanja Petrović, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Nada Nikolić, The content and composition of minerals in white corn (*Zea mays* L.) flour, Abstract book - III International Congress Food Technology, Quality and Safety, 25-27 October, Novi Sad, Serbia, 2016, pp. 232-232.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Suzana Cakić, Ljubiša Nikolić, Ivana Karabegović, The content and scavenging capacity of dpph radical of bound phenolics from *Urtica dioica* L. seeds, 17th Interantional multidisciplinary scientific conference on earth & geoscinces, 27-29 November, Vienna, Austria, 2017.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Ljubiša Nikolić, The antioxidant activity and composition of the phenolics from non-ground nettle (*Urtica dioica* L.) seeds extracted by distilled and tap water, Book of Abstracts - 1st International Conference on Advanced Production and Processing, 10-11 October, Novi Sad, Serbia, 2019, pp. 24-24.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Ljubiša Nikolić, Nettle (*Urtica dioica* L.) seed oil: extraction, chemical characterisation and antioxidant activity, Book of Abstracts - Food Quality and Safety, Health and Nutrition Congress - Nutricon, isbn 978-608-4565-14-7, 2-4 September, Ohrid, Macedonia 2020, pp. 67-68.

Jelena S. Mitrović, Nada Č. Nikolić, Ivana T. Karabegović, Miodrag M. Lazić, Aleksandar Ž. Kostić, Danijel D. Milinčić, Mirjana B. Pešić, Chemical composition of nettle (*Urtica dioica* L.) seeds and fatty acid composition of nettle seed oil, Book of Abstracts - 2nd UNIFood International Conference – UNIFood2021, University of Belgrade, isbn 978-86-7522-066-4, 24-25 September, Belgrade, Serbia, 2021, pp. 113.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Saša Savić, Olivera Šimurina, Mirjana Pešić, The composition of phenolic compounds of cookies enriched by nettle (*Urtica dioica* L.) seeds and extract, Book of Abstracts – 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad, pp. 34-34, isbn: 978-86-6253-160-5, Novi Sad, Serbia, 20th-22nd Oct, 2022.

Nada Nikolić, Suzana Cakić, **Jelena Mitrović**, Mirjana Pešić, Ljiljana Takić, Goran Nikolić, The content of some phtalates in mushy peach and apple juice during storage time, Book of Abstracts – 2nd International Conference on Advanced Production and

Processing, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad, pp. 39-39, isbn: 978-86-6253-160-5, Novi Sad, Serbia, 20th-22nd Oct, 2022.

Suzana Cakić, Nada Nikolić, Ivan Ristić, Ljubiša Nikolić, **Jelena Mitrović**, Snežana Ilić-Stojanović, Determination of benzyl butyl and di-n-octyl phthalate from matrix of mushy peach and apple juice by using liquid-liquid extraction, Book of Abstracts – 2nd International Conference on Advanced Production and Processing, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad, pp. 47-47, isbn: 978-86-6253-160-5, Novi Sad, Serbia, 20th-22nd Oct, 2022.

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja, M51 (2):

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Zoran Todorović, Miodrag Lazić, Gordana Stojanović, The comparative study on the composition of acylglycerols and fatty acids in celery, parsnip and black radish roots, *Advanced technologies*, 2018, 7(1), pp. 28-34.

Rad u časopisu nacionalnog značaja, M52 (1,5):

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Ljubiša Nikolić, Nettle (*Urtica dioica* L.) seed oil: extraction, chemical characterisation and antioxidant activity, *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 2021, 34, pp. 119-123.

Saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u izvodu, M64 (0,2):

Nada Nikolić, **Jelena Mitrović**, Saša Savić, Sanja Petrović, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Gordana Stojanović, The content and composition of minerals in yellow corn (*Zea mays* L.) flour, Book of abstracts - 12th symposium "Novel technologies and economic development", 20-21 October, Leskovac, Serbia, 2017, pp. 63-63.

Jelena Mitrović, Ljubiša Nikolić, Suzana Cakić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Nada Nikolić, The effect of extragent on content and dpph scavenging capacity of free polyphenols of *Urtica dioica* L. seeds, Book of abstracts - 12th symposium "Novel technologies and economic development", 20-21 October, Leskovac, Serbia, 2017, pp. 49-49.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ljubiša Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, The effect of extragent on content and antioxidant activity of free phenolic compounds of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, Zbornik apstrakta radova-1. Naučno-stručna konferencija „Kongres studenata Tehnoloških fakulteta“, 11-13 Oktobar, Banja Luka, Bosna i Hercegovina, 2018, pp. 21-22.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Ljubiša Nikolić, The effect of solvents on reducing power and ferric reducing antioxidant power of free polyphenols from nettle (*Urtica dioica* L.) seeds, Book of abstracts - 13th symposium „Novel technologies and Economic development“, 18-19 October, Leskovac, Serbia, 2019, pp. 40-40.

Nada Nikolić, **Jelena Mitrović**, Ivana Karabegović, Gordana Stojanović, Miodrag Lazić, A content and composition of free phenolic compounds of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, Book of abstracts - 13th symposium „Novel technologies and Economic development“, 18-19 October, Leskovac, Serbia, 2019, pp. 39-39.

Nada Nikolić, **Jelena Mitrović**, Ivan Ristić, Ljubiša Nikolić, Suzana Cakić, Determination of thermooxidative stability of nettle (*Urtica dioica* L.) seed oils by differential scanning calorimetry, Book of abstracts - 14th symposium „Novel technologies and Economic development“, 22-23 October, Leskovac, Serbia, 2021, pp. 36-36.

Jelena Mitrović, Nada Nikolić, Marija Stojanović-Krasić, Ivana Karabegović, Miodrag Lazić, Statistical analysis of content of free phenolics in the products based on wheat flour enriched by nettle (*Urtica dioica* L.) seed or extract, Book of abstract - 14th symposium „Novel technologies and economic development“, 22-23 October, Leskovac, Serbia, 2021, pp. 37-37.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL POLIFENOLA I ULJA SEMENA KOPRIVE
(URTICA DIOICA L.) I KARAKTERIZACIJA PROIZVODA OD PŠENIČNOG
BRAŠNA SA DODATKOM SEMENA KOPRIVE**

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 29.06.2023.

Потпис аутора дисертације:

Јелена С. Митровић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL POLIFENOLA I ULJA SEMENA KOPRIVE
(*URTICA DIOICA* L.) I KARAKTERIZACIJA PROIZVODA OD PŠENIČNOG
BRAŠNA SA DODATKOM SEMENA KOPRIVE**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 29.06.2023.

Потпис аутора дисертације:

Јелена С. Митровић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL POLIFENOLA I ULJA SEMENA KOPRIVE
(URTICA DIOICA L.) I KARAKTERIZACIJA PROIZVODA OD PŠENIČNOG
BRAŠNA SA DODATKOM SEMENA KOPRIVE**

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 29.06.2023.

Потпис аутора дисертације:

Јелена С. Митровић