

# ANTIOKSIDATIVNI SINERGIZAM CIJEĐENOG SOKA ARONIJE I MJEŠAVINE CRNOG VINA TRIJU SORTI GROŽĐA S PODRUČJA BUJŠTINE

---

Mijatović, Ela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:061534>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ela Mijatović

ANTIOKSIDATIVNI SINERGIZAM CIJEĐENOG SOKA ARONIJE I MJEŠAVINE

CRNOG VINA TRIJU SORTI GROŽĐA S PODRUČJA BUJŠTINE

Završni rad

Rijeka, 2019. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ela Mijatović

ANTIOKSIDATIVNI SINERGIZAM CIJEĐENOG SOKA ARONIJE I MJEŠAVINE

CRNOG VINA TRIJU SORTI GROŽĐA S PODRUČJA BUJŠTINE

Završni rad

Rijeka, 2019. godina

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Dalibor Broznić

Završni rad obranjen je dana 19.09.2019. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Marin Tota, mr.ph.
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.san.ing.
3. izv.prof.dr.sc. Dalibor Broznić, dipl.san.ing

Rad ima 47 stranica, 18 slika, 4 tablice, 34 literaturna navoda.

Istraživanje je provedeno u okviru znanstveno-istraživačkog projekta broj 6.7.1.1.1.80 s potporom Sveučilišta u Rijeci voditelja izv. prof. dr. sc. Dalibora Broznića.

**Zahvala:**

*Veliku zahvalu upućujem mentoru, izv. prof. dr. sc. Daliboru Brozniću, čiji su znanstveni savjeti i stručna objašnjenja iznimno pomogli u izradi ovog rada. Posebno se zahvaljujem i ocu, Branislavu Mijatoviću, na uzorku vlastitog crnog vina koje se koristilo u ovom istraživanju.*

## SAŽETAK

U ljudskom organizmu pronađene su brojne uloge soka aronije i crnog vina. Ovi napitci poznati su po jakom antioksidativnom učinku, kardioprotektivnom, hepatoprotektivnom, antibakterijskom te neuroprotektivnom djelovanju u kojima antioksidansi reduciraju brojne slobodne radikale koji uzrokuju veliki broj bolesti. Kinetika njihovih reakcija može se opisati matematičkim pristupom, odnosno modeliranjem pomoću jednadžbi.

Ovim istraživanjem proučavan je sinergizam antioksidanasa iz soka aronije i crnog vina. Pripremljeno je pet uzoraka (ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2, MIX 3) kojima se analizirala antioksidativna aktivnost uz DPPH<sup>\*</sup> i TEAC test te kinetika kemijskih reakcija s tri monofazna i jednim bifaznim matematičkim modelom.

Ukazano je da smjesa aronije i crnog vina u omjeru 1:1 (MIX 1), pokazuje najjači sinergizam ovih komponenti te najjači antioksidativni kapacitet u odnosu na druge mješavine. Uspoređivanjem statističkih pokazatelja, o slaganju eksperimentalnih i modelnih podataka, utvrđeno je kako bifazni model prvog reda najbolje opisuje kinetiku kemijskih reakcija DPPH radikala i antioksidanasa, dok je najlošiji opis kinetike dao model nultog reda. Time je i dokazano postojanje dvaju vrsta antioksidanasa koji reagiraju s DPPH radikalom različitim brzinama te uzrokuju i dvije faze reakcije.

Dodatak soka aronije u crno vino uzrokuje porast njegove antioksidativne aktivnosti. Odnosno, ukoliko se priprema smjesa aronijinog soka i crnog vina, komponente moraju biti u jednakim udjelima kako bi se postigao što bolji sinergizam ovih dvaju vrsta antioksidanasa i što bolji zdravstveni učinak.

Ključne riječi: aronija, crno vino, antioksidansi, DPPH radikal, TEAC, matematički modeli, kinetika

## **ABSTRACT**

The antioxidants from aronia juice and red wine are responsible for countless roles in the human body. Besides the antioxidant activity, these beverages are known for their cardioprotective, hepatoprotective, antibacterial and neuroprotective effects, but their main function is to reduce free radicals that can cause a large number of diseases. The kinetics of these reactions could be described by a mathematical approach or by equation modeling.

In this reasearch, the synergism of antioxidants from aronia juice and red wine was examined. Five samples (ARONIA, WINE, MIX 1, MIX 2, MIX 3) were prepared in order to analyze the antioxidant activity, using the DPPH<sup>•</sup> and TEAC assay. Furthermore, the kinetics of chemical reactions between DPPH<sup>•</sup> and antioxidants were studied using three single-phase and one biphasic mathematical models.

Results of the study pointed that mixture of aronia and red wine in a 1:1 ratio (MIX 1) demonstrates the strongest synergism of aronia juice and red wine as well as the strongest antioxidant capacity compared to other mixtures. Statistical parameters which tested differences between experimental and model data, showed that the biphasic first-order model best describes the chemical reaction kinetics between DPPH radical and antioxidants in all mixtures. This confirmed that two types of antioxidants react with the DPPH radical at different rates, making two different reaction phases.

The addition of aronia juice to the red wine increases its antioxidant activity. Therefore, mixture od aronia juice and red wine in equal quantity make the most out of their synergism and have a much better health effect.

Keywords: aronia, red wine, antioxidants, DPPH radical, TEAC, mathematical models, kinetics

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. ARONIJA.....	1
1.1.1. KEMIJSKI SASTAV ARONIJE.....	1
1.1.2. KARDIOPROTEKTIVNA I HEPATOPROTEKTIVNA ULOGA ARONIJE .....	2
1.1.3. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE KEMIJSKIH KOMPONENTI ARONIJE NA BIOFILMU <i>E. Coli</i> i <i>B. Cereus</i> .....	2
1.1.4. NEUROPROTEKTIVNA I ANTIKANCEROGENA ULOGA ARONIJE.....	3
1.2. CRNO VINO .....	4
1.2.1. KEMIJSKI SASTAV CRNOG VINA .....	4
1.2.2. POZITIVAN UČINAK CRNOG VINA U KARDIOVASKULARNOM SUSTAVU I JETRI .....	5
1.2.3. POZITIVAN UČINAK CRNOG VINA U MIKROBNOM SVIJETU .....	5
1.2.4. POZITIVAN UČINAK CRNOG VINA U MOZGU I U BORBI PROTIV KARCINOMA .....	6
1.3. ANTIOKSIDANSI.....	6
1.4. SLOBODNI RADIKALI .....	8
1.4.1. MEHANIZAM REAKCIJE DPPH RADIKALA I ANTIOKSIDANASA.....	9
1.5. OKSIDATIVNI STRES .....	10
1.6. KINETIKA KEMIJSKIH REAKCIJA.....	11
1.6.1. KINETIKA NESTAJANJA DPPH RADIKALA U REAKCIJI S ANTIOKSIDANSIMA .....	11
1.6.2. MATEMATIČKO MODELIRANJE U KINETICI.....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. UZORCI ARONIJE I CRNOG VINA .....	15
3.2. KEMIKALIJE .....	15
3.3. INSTRUMENTI.....	16
3.4. METODE RADA .....	17
3.4.1. PRIPREMA UZORAKA ZA DPPH <sup>•</sup> ANALIZU.....	17
3.4.2. PRIMJENA DPPH <sup>•</sup> TESTA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI UZORAKA .....	18



3.4.3. PRIMJENA TEAC METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA UZORAKA .....	19
3.4.4. ODREĐIVANJE KINETIKE NESTAJANJA DPPH RADIKALA POMOĆU MATEMATIČKIH MODELA.....	21
3.4.5 STATISTIČKA ANALIZA .....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA (DPPH• TEST) .....	23
4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA (TEAC TEST).....	27
4.3. REZULTATI KINETIKE NESTAJANJA RADIKALA U REAKCIJI S ANTIOKSIDANSIMA UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA .....	28
4.3.1. USPOREĐIVANJE STATISTIČKIH POKAZATELJA NAJBOLJE I NAJLOŠIJE OPISANE KINETIKE UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA .....	28
4.3.2. USPOREĐIVANJE KINETIČKIH PARAMETARA NAJBOLJE OPISANE KINETIKE UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA.....	29
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČAK .....	39
7. LITERATURA.....	40
8. POPIS SLIKA .....	44
9. POPIS TABLICA.....	46
10. ŽIVOTOPIS .....	47

## 1. UVOD

### 1.1. ARONIJA

Aronija je ljekovita biljka koja pripada porodici ruža *Rosaceae*, a podrijetlom je iz Sjeverne Amerike. Prirodna staništa su joj kisela i vlažna tla atlantske klime. Upravo radi toga, zahtjeva veću količinu vode za rast te je otporna na niže temperature. Riječ je o grmolikoj biljci visine ispod 1 m, čiji plodovi sazrijevaju u kolovozu i nalikuju šumskim borovnicama.

Na spomenutom kontinentu poznate su dvije vrste *Aronia melanocarpa* (crni plodovi) i *Aronia arbutifolia* (crveni plodovi), koje su tradicionalno koristili sjevernoamerički Indijanci Potawatomi u liječenju bolesti. Iako aronija potječe s područja Amerike, početkom 20.st. uspjela se proširiti i Europom.

Zahvaljujući ljekovitom djelovanju kemijskih komponenti (antioksidativna aktivnost, antikancerogenost, antibakterijsko djelovanje, kardioprotektivnost, hepatoprotektivnost, neuroprotektivnost itd.), aronija se danas sve više koristi u prehrambenoj industriji u proizvodnji sokova, čajeva, džemova, vina i kao prirodno bojilo hrane. Crne bobice aronije, osim navedene primjene, svoju popularnost stekle su i na području homeopatije gdje se, posebice u Rusiji, koriste kao prirodan lijek protiv povišenog tlaka i ateroskleroze. [1]

#### 1.1.1. KEMIJSKI SASTAV ARONIJE

Zbog velikog udjela polifenolnih komponenti, aronija se smatra biljkom s izrazito jakom antioksidativnom aktivnošću. Ovaj jaki antioksidans reducira radikale, supresira formaciju reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, obnavlja ostale antioksidanse te sprječava djelovanje prooksidativnih enzima. Osim polifenola, u kemijskom sastavu aronije mogu se pronaći i antocijanini, proantocijanidini i hidroksicinamična kiselina. U manjim količinama, u plodovima se nalaze i kvercetin, kvercetin glikozid te epikatehini. Prema brojnim studijama, kemijske komponente aronije odgovorne su za brojne zdravstvene beneficije. [2]

### **1.1.2. KARDIOPROTEKTIVNA I HEPATOPROTEKTIVNA ULOGA ARONIJE**

Svoju kardioprotektivnu ulogu (smanjenje masti, antiagregacija, direktno poboljšanje krvožilne aktivnosti) aronija ostvaruje djelovanjem antocijanina i niacina. U istraživanju na štakorima s hiperkolesterolemijom otkriveno je, uz davanje soka aronije u trajanju od 30 dana, kako se u sisavaca značajno smanjila razina ukupnog kolesterola (TC), kao i njegovih fragmenata u LDL kolesterolu te triglicerida u krvi. Značajne promjene na lipidima plazme uočene su i kod pacijenata s povećanim kolesterolom i krvnim tlakom. Konzumirajući sok aronije u periodu od 6 mjeseci, njihove razine su se smanjile s visokih na optimalne vrijednosti.

U istom istraživanju, na štakorima, utvrđeno je kako sok crnih bobica aronije smanjuje histopatološke promjene poput nekroze, degeneracije te nakupljanja upalnog infiltrata limfocita u jetri. Sok se pokazao uspješnim i kod liječenja intoksikacija tetraklorugljikom, aminopirinom, natrijevim nitritom te kadmijem. Kod trovanja kadmijem, uspjela se zaustaviti pojačana akumulacija u jetri, smanjiti koncentracija bilirubina i uree u krvi te reducirati reakcije aminotransferaza.[3]

### **1.1.3. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE KEMIJSKIH KOMPONENTI ARONIJE NA BIOFILMU *E. Coli* i *B. Cereus***

Studije su pokazale kako voćni ekstrakti i sokovi brusnice mogu reducirati stvaranje biofilma *S. epidermiditisa* na kontaktnim lećama i uropatogene *E. Coli* na urinarnim kateterima. Uzrok ovog uspješnog rezultata je A tip proantocijanidina koji djeluje antiadhezijski sprječavajući vezanje bakterijskih adhezina na površine katetera i leća. Prema istraživanju Marie Bräunlich i suradnika, uz pretpostavku kako se isti spoj nalazi u aroniji, pojedini ekstrakti soka aronije pokazali su se uspješnima u redukciji biofilma *E. Coli* i *B. Cereusa*. Međutim, učinak ekstrakta proantocijanidina aronije pokazao se neznatnim. Izolirani 50% EtOH ekstrakt iz biljke iskazao se najboljim u suzbijanju stvaranja biofilma *B. Cereusa* (rast do 50%), dok je epikatehin bio uspješan kod *E. Coli* (rast do 60%). Zanimljivo je kako se cijanidin-3-ksilozid pokazao pozitivnim u oba slučaja. Bakterijske vrste

inkubirale su se s 9 različitih spojeva (ekstrakata) aronije u različitim uvjetima (48 h i 30 °C *B. Cereus.*, 24 h i 37 °C *E. Coli*). [4]

#### **1.1.4. NEUROPROTEKTIVNA I ANTIKANCEROGENA ULOGA ARONIJE**

Za napitke vrste *A. melanocarpa*, nedavno je otkriveno kako subkronično pospješuju sposobnost učenja i memorije. Pretpostavlja se kako do toga dolazi zbog smanjenja glutamat-potaknute smrti HT-22 neuronskih stanica zbog povećanja antioksidanasa u njihovoj mitohondrijskoj membrani, reaktivnih kisikovih vrsta i unutar staničnih razina  $Ca^{2+}$  iona. Ipak, najbitnija neuroprotektivna uloga ove biljke je poticanje centralnog kolinergičnog sustava (CKS) koji je odgovoran za kognitivne moždane funkcije. CKS regulira acetilkolin koji djeluje na neuronske sklopove uvidu neurogeneze i formacije sinapse. Smanjeno izlučivanje ovog neurotransmitera, uočeno je kod starijih osoba i pacijenata s dijagnosticiranom Alzheimerovom bolesti. [5]

Kod ljudi oboljelih od raka, razine reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta su u znatnom porastu. To se može dokazati pojedinim oksidativnim / nitratnim stres markerima poput lipid peroksidaze i 3-nitrotirozina. Za vrijeme kemoterapija, upotrebom antikancerogenih droga i njihovih kombinacija, dolazi do indukcije oksidativnog stresa i hemostaze. Aronija, kao jaki antioksidans, kod takvih pacijenata, uspijeva potaknuti sintezu antioksidativnih enzima poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze u krvi. Time dolazi do prekida prekomjerne polimerizacije fibrina i rizika od tromboze. Osim antikoagulacijske uloge, djelujući kao antioksidans, aronija ovim putem blokira slobodne radikale koji uzrokuju oksidativni stres u organizmu navedenih bolesnika. [6]

## 1.2. CRNO VINO

Općenito, vino je jedno od najstarijih pića čija proizvodnja datira još od antičkog doba. Danas se razlikuju bijela i crna vina koja se najviše uzgajaju u vinogradima mediteranske klime. Blage zime i topla ljeta, uz srednje količine padalina, jesu ono što najviše odgovara vinovoj lozi.

Kolijevke uzgoja u Europi su Francuska i Italija te zemlje Sredozemlja kao što su Grčka, Cipar pa i Hrvatska. Hrvatska se ponosi svojim najboljim vinarima na području Istre i Hrvatskog primorja, Dalmacije, srednjoistočnog i srednjozapadnog dijela države. Osim poznatih sorti bijelog vina (malvazija, muškat, graševina), treba istaknuti kako naša zemlja ima više autohtonih vrsta crnog vina. Neke od njih su plavac mali srednje i južne Dalmacije, babiće crni šibenskog podrijetla, crljenak voćkaste arome od kojeg potječu plavac mali, talijanski primitivo i američki zinfandel te istarske sorte terana i hrvaticice s područje Kaštelira. U Istri potrebno je spomenuti njezino plodno sjeverozapadno područje crvenice u kojem se ističe lokacija Bujštine. Naime, Brtonigla, Buje i Oprtalj, jesu gradovi okruženi brojnim vinogradima i vinskim podrumima. Na takvom području čuveni su uzgoji sorti crnog vina poput terana i hrvaticice, merlota, refoška, pinota crnog, syraha, barbere crne, borgonje, caberneta francuskog itd. [7,8]

Crno vino poznato je po svom antioksidativnom djelovanju. Osim što njegova umjerena konzumacija produžuje životni vijek, svoj pozitivan učinak pokazuje u kardiovaskularnom sustavu, jetri, u mikrobnom svijetu, mozgu te u borbi protiv karcinoma.

### 1.2.1. KEMIJSKI SASTAV CRNOG VINA

Osim vode, alkohola, organskih kiselina i šećera, u kemijskom sastavu crnog vina nalaze se i tanini, katehini, terpeni, flavonoidi, merkaptani, esteri i antocijanini. Tanini su složene strukture koje nastaju polimerizacijom katehina (odgovorni za gorki okus) u lance. Ovi spojevi reagiraju s proteinima slinje u usnoj šupljini te čine 50% polifenola vina. Nehlapljivi terpeni čine primarnu aromu i grade glikozidne veze koje mogu puknuti. Zato tijekom procesa proizvodnje neka vina mogu dobiti jaču

aromu ili im se ona može izgubiti ukoliko oslobođeni terpeni reagiraju s drugim prisutnim kemijskim spojevima. U skupini flavonoida ističu se flavoli koji apsorbiraju UV svjetlost i time mogu povećati intenzitet pigmentacije. Preostali merkaptani odgovorni su za jake mirise, esteri za voćnu aromu, a antocijanini daju boju grožđa. [9]

### **1.2.2. POZITIVAN UČINAK CRNOG VINA U KARDIOVASKULARNOM SUSTAVU I JETRI**

Konzumacija crnoga vina pospješuje cirkulaciju u tijelu. Nakon što poveća sistolički i dijastolički tlak, za razliku od ostalih alkoholnih pića, ono smanjuje unutarnje srčane i ventrikularne polarizacijske intervale. Time se zaobilazi rizik od ishemičnog miokarda, kardiopatije i općenito smrti. Velika uloga crnog vina uočava se u metabolizmu masti i šećera u jetri. Studije su pokazala kako vino reducira kolesterol u plazmi, ukupne trigliceride, loši LDL te intracelularni kolesterol. Paralelno tome, konzumacija doprinosi smanjenju sinteze glukoze u jetri. [10]

Istraživanje Totha i suradnika, [11] dokazalo je kako crno vino smanjuje agregaciju crvenih krvnih stanica i pozitivno utječe na hematološke parametre. Uočena je i dnevna konzumacija (do 3 dL) koja sprječava inflamacije, bolesti koronarnih žila i rizik od ateroskleroze te pospješuje antioksidativno stanje i endotelnu funkciju u organizmu. Prema znanstvenom radu Da Luz i suradnika, [12] nakon određenog unosa crnog vina u organizam ispitanika, razine glukoze značajno su se smanjile u krvi. Glavni razlog ovog rezultata je povećana osjetljivost na inzulin, što je iznimno protektivno kod osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2.

### **1.2.3. POZITIVAN UČINAK CRNOG VINA U MIKROBNOM SVIJETU**

U svijetu znanosti sve češće se spominje veza između polifenola i antibakterijskog djelovanja. Polifenoli, kao sastavni dijelovi crnog vina, oslobađaju hidroksilne radikale koji produciraju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i time oštećuju bakterijsku DNA, remete strukturu stanične membrane bakterija i uzrokuju poremećaj u

izmjeni iona između bakterijske stanice i okoline. Za ove kemijske spojeve dokazano je kako inhibiraju rast bakterija iz roda *Streptococcus* i ostalih bakterija koje uzrokuju zubni karijes. Prirodnom konzumacijom crnog vina, ujedno dolazi i do inhibicije rasta subgingivalnih biofilmova periodontalnih patogena poput *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* i *F. nucleatum*. [13]

#### **1.2.4. POZITIVAN UČINAK CRNOG VINA U MOZGU I U BORBI PROTIV KARCINOMA**

Polifenoli vina i u mozgu imaju značajnu ulogu. Ovi spojevi poboljšavaju kognitivne sposobnosti, reduciraju neuroinflamacije i oksidativni stres koji se javljaju starenjem i prilikom neurodegenerativnih bolesti. Kao i u slučaju aronije, polifenoli crvenog vina zaštićuju HT-22 stanice i to trima mehanizmima: povećanje glutaciona, smanjenje reaktivnih kisikovih vrsta, regulacija unosa  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Nedavne studije pokazale su kako antocijanini i njihovi metaboliti, isto sudjeluju u neuronskim aktivnostima. Njihovom lokalizacijom u mozgu dolazi do snažnog neuroprotektivnog djelovanje, a time i do sprječavanja potencijalnih oboljenja.

Za mediteransku dijetu uočeni su protektivni efekti ne samo u kardiovaskularnom sustavu već i u borbi protiv brojnih karcinoma. Prilikom ovakve vrste bolesti u organizmu narušena je ravnoteža, a svi putovi signalnih stanica koji ju održavaju mogu se obnoviti flavonoidima. Navedeni spojevi sprječavaju proliferaciju i nekontrolirano dijeljenje stanica kod renalnog, gastrointestinalnog i plućnog karcinoma te kod karcinoma dojke i prostate. [14]

### **1.3. ANTIOKSIDANSI**

Antioksidansi su bilo koje supstance koje u malim koncentracijama odgađaju reakcije oksidacije. To su tvari koje smanjuju, preveniraju ili uklanjaju oksidativnu štetu ciljnih molekula. Glavna im je uloga uklanjanje slobodnih radikala i njihova pretvorba u manje reaktivne vrste. To postižu u obliku velikog antioksidativnog sustava, gdje nedostatak jedne komponente utječe na

efikasnost ostalih. Postoje četiri mehanizma kojima ove tvari sprječavaju oksidaciju makromolekula: a) antioksidativna donacija vodika, b) antioksidativna donacija elektrona, c) vezanje lipida na antioksidans i d) formacija kompleksa lipid-antioksidans.

Antioksidansi se u velikim količinama nalaze u biljnim materijalima (voće, povrće) tzv. prirodni egzogeni antioksidansi, ali najviše ih ima u citrusima, bobičastom voću, jagodama, grejpu, špinatu, brokuli i šljivama. Drugu vrstu, endogenih, antioksidanasa nalazimo u organizmu u obliku enzima (primarni, sekundarni) [15], ne enzimskih tvari i metal vezujućih proteina. U primarne enzime ubrajaju se glutacion peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza, dok u sekundarne enzime spadaju glutacion reduktaza i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza. Bilirubin, melatonin jedni su od ne enzimskih tvari, a proteinski kompleksi s željezom poput feritina, transferina čine metal vezujuće antioksidanse (Tablica 1, 2).

**Tablica 1.** Egzogeni antioksidansi u različitim izvorima hrane (uređeno prema: Da Costa L.A., Badawi A, El-Sohehy A, Nutrigenetics and Modulation of Oxidative Stress, *Annals of Nutrition & Metabolism*, 2012).

<b>Egzogeni antioksidansi</b>	<b>Izvor hrane</b>
Karotenoidi ( $\beta$ -karoten, $\alpha$ -karoten)	Rajčica, mrkva, marelica, šljiva, špinat
Vitamin C	Jagoda, kiwi, brokula, citrusi
Vitamin E (tokoferoli, tokotrienoli)	Margarin, orasi, sjemenke, biljno ulje
Polifenoli (flavonoli, flavanoli, antocijanini, izoflavoni, fenolna kiselina)	Jabuka, bobičasto voće, grejp, celer, luk, grah, vino, zeleni čaj
Elementi u tragovima (Se, Zn)	Morska hrana, meso, cjelovite žitarice



**Tablica 2.** Endogeni antioksidansi u organizmu (uređeno prema: Da Costa L.A., Badawi A, El-Sohemy A, Nutrigenetics and Modulation of Oxidative Stress, Annals of Nutrition & Metabolism, 2012).

<b>Endogeni antioksidansi</b>	<b>Primjeri</b>
Enzimi (primarni i sekundarni)	Glutation peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza, glutacion reduktaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, glutacion-S-transferaza, aldehid dehidrogenaza, hem-oksigenaza
Ne enzimске tvari	Ubikvinol, bilirubin, melatonin, mokraćna kiselina, lipoična kiselina
Metal vezujući proteini	Feritin, laktoferin, metalotionein, transferin

#### **1.4. SLOBODNI RADIKALI**

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje u svojim atomskim ili molekulskim orbitalama sadrže jedan ili više slobodnih elektrona. Dijele se na reaktivne kisikove vrste (ROS) i reaktivne dušikove vrste (RNS) te sudjeluju u patogenezi brojnih bolesti poput Parkinsonove, Alzheimerova, dijabetesa, srčanih bolesti i raka. Procjenjuje se da svakodnevno 10000-20000 radikala napada sve stanice u organizmu. Neke od njih bitne su za održavanje zdravlja, zaštitu od infekcija, bolesti itd.

Postoji nekoliko okidača zbog kojih se slobodni radikali mogu pronaći u organizmu. Najčešće nastanu kao reakcija imunološkog sustava na pojedine alergene, tijekom stresa zbog prekomjerne mitohondrijske aktivnosti, radi loše životne navike (loša prehrana, previše kofeina, alkohol, droga) i utjecaja okolišnih faktora (polutanti, X zrake, radijacije, otrovi).

Slobodni radikali najviše utječu od makromolekula na lipide, proteine i DNA. U reakciji s lipidima u substancičnom prostoru, dolazi do reakcija peroksidacije koje utječu na fluidnost i propusnost membrane te na funkciju enzima i receptora. Osim njihove uloge, radikali remete i strukturu proteina. Oni proteini koji su prije tog susreta bili stabilni lako se uklanjaju iz tijela, ali oni

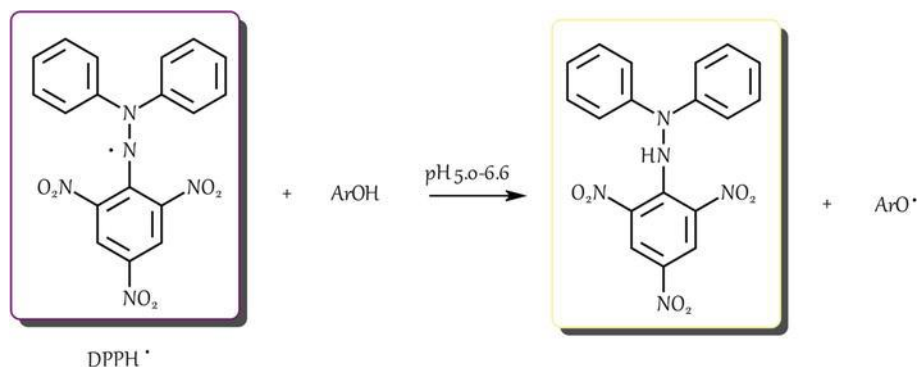
koji su bili nestabilni dalje će se nakupljati u tijelu u obliku kompleksa s metalima. Takve formacije često uzrokuju Alzheimerovu bolest i ostale probleme u centralnom živčanom sustavu. Brojna oštećenja uzrokovana su i vezanjem radikala s DNA molekulom. Nakon ostvarivanja veza s pirimidinima, može doći do nagomilavanja poli-A repa i nepotrebnog popravka (izrezivanje i direktan popravak nukleotida, isjecanje i rekombinacija DNA) genetskog materijala što dovodi do mutacija. [16]

#### **1.4.1. MEHANIZAM REAKCIJE DPPH RADIKALA I ANTIOKSIDANASA**

Reakcijski mehanizam između antioksidanasa i DPPH radikala najviše ovisi o strukturnoj konformaciji antioksidanasa. Pojedini uzorci reagiraju jako brzo s DPPH<sup>•</sup> i reduciraju onoliko molekula koliko imaju slobodnih hidroksilnih skupina. Ipak, za većinu uzoraka mehanizam ove redukcije je složenije i sporije prirode. [17]

S obzirom kako u svojim strukturama DPPH radikal sadrži jedan slobodan elektron, izrazito je nestabilan te podliježe sudaranju s najbližim molekulama. Na takav način, sudarom, pucanjem veza u molekulama, oslobađaju se elektroni zbog čega nastane još slobodnih radikala (lančana reakcija).

Slika 1. prikazuje reakciju između DPPH<sup>•</sup> i antioksidansa ArOH koji donira vodikov atom kako bi nastao radikal stabilne strukture. Kao produkti, nastaju reducirani DPPH<sup>•</sup> i ArO<sup>•</sup> koji reagira s ostalim radikalima i time formira stabilne strukture koje prekidaju lančane reakcije (DPPH-OAr, ArO-OAr). Ova se redukcija još naziva i dekolorizacijom u kojoj radikal mijenja boju iz ljubičaste u žutu. [18]



**Slika 1.** Redukcija DPPH radikala antioksidansom ArOH (preuzeto iz: Santos-Sánchez N.F., Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B, Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism, 2019).

## 1.5. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je neravnoteža između oksidansa i antioksidansa zbog pretjerane proizvodnje i smanjenog uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Ova metabolička disfunkcija uzrokuje oksidaciju biomolekula, oštećenje stanica i tkiva te doprinosi razvoju tumora, srčanih bolesti, dijabetesa i pretilosti.

Visoke razine koje se javljaju kod oksidativnog stresa, često su uzrokovane unutarnjim i vanjskim faktorima. U organizmu njihovu sintezu često potiče metabolizam lijekova, pretjerana aktivacija enzima za produkciju ROS-a i nedostatak antioksidanasa. Od vanjskih faktora najveći utjecaj ima izloženost ionizirajućem zračenju kao i loša prehrana, alkohol te smanjena tjelesna aktivnost. Ovakvi preduvjeti mogu povećati udio radikala u odnosu na antioksidanse, uzrokovati strukturna oštećenja stanica i prekinuti njihove proliferacije i replikacije. Sve navedeno usko je povezano sa starenjem, radi čega se ono često naziva posljedicom oksidativnog stresa. [19]

## 1.6. KINETIKA KEMIJSKIH REAKCIJA

Kemijska kinetika je područje fizikalne kemije koje se bavi brzinom kemijskih reakcija, faktorima koji utječu na njihovo odvijanje i mehanizmima reakcija. Brzina reakcija može varirati od vrlo brzih (gorenje) do vrlo sporih (raspad plastike na suncu), a prate ih proporcionalni rast pojedinih čimbenika kao što su koncentracija reaktanata, temperatura, reakcijska površina i katalizatori. Mehanizmi predstavljaju koliziju i potrebne događaje za pretvorbu reaktanata u produkte. Odnosno, potpuni mehanizam uključuje cijelu transformaciju reaktivnog međuprodukta, aktivnog kompleksa i prijelaznog stanja u kojoj dolazi do pucanja i formiranja kemijskih veza. [20]

### 1.6.1. KINETIKA NESTAJANJA DPPH RADIKALA U REAKCIJI S ANTIOKSIDANSIMA

Za sokove koji sadrže komponente s antioksidativnom aktivnošću, pretpostavlja se kako se kinetika njihove reakcije s DPPH radikalom može podijeliti u tri grupe: 1) brza-kinetika, 2) brza + spora-kinetika i 3) spora-kinetika.

U prvoj grupi kinetike, komponente sadrže antiradikalne skupine koje imaju jedino mogućnost brzog prijenosa vodikovog atoma. Antioksidativna aktivnost ovih skupina iznimno je jaka te zbog toga dolazi do ireverzibilne reakcije s DPPH<sup>•</sup> koja se na grafičkom prikazu može vidjeti kao linearna ovisnost dodane i preostale koncentracije DPPH radikala. Smatra se kako u ovu grupu ulaze samo sokovi koji sadrže askorbinsku kiselinu ili vitamin C.

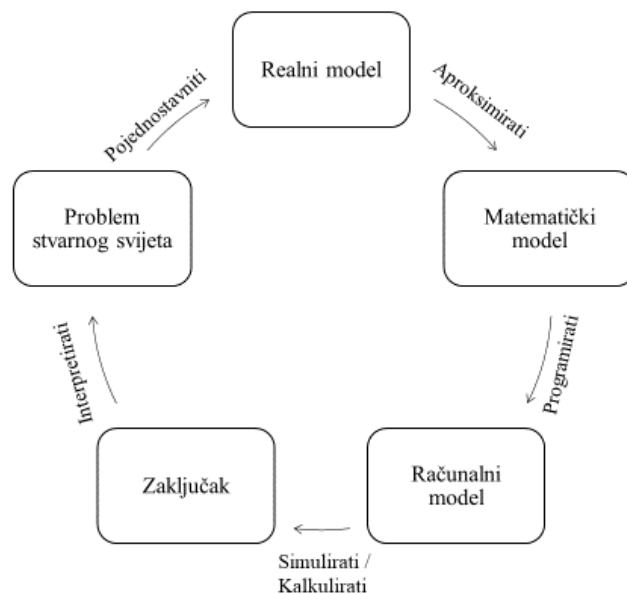
Brza + spora kinetika odnosi se na reaktivne skupine namirnica koje imaju sposobnost i brzog i sporog prijenosa vodikovog atoma. To su najčešće spojevi koje sadrže slobodnu ili monosupstituiranu katehol skupinu. Za brzu fazu ove kinetike, kao u prvoj grupi, vrijedi ireverzibilno linearna ovisnost dodanog i preostalog DPPH<sup>•</sup>. Uzimajući u obzir sporu fazu, u njoj jednako dolazi do ireverzibilnih reakcija koje ovise o kemijskim skupinama komponenti. To je najviše primijećeno za polifenolne derivate poput kvercetina kojeg se može naći u kemijskom sastavu aronije.

Treća grupa, spora-kinetika, uključuje komponente koje mogu samo sporo prenijeti vodikov atom. U takvim prijenosima dolazi do reverzibilnih reakcija s DPPH• koje ne prate linearnu ovisnost koncentracija dodanog i preostalog radikala, već se grafički prikazuju pomoću hiperbola. To vrijedi za flavonoide citrusa i sve ostale polifenole kojima nedostaje 3',4'-dihidroksi ili katehol skupina ili ju sadrže u manjim količinama. [21]

### 1.6.2. MATEMATIČKO MODELIRANJE U KINETICI

Matematičko modeliranje može se definirati kao postupak koji opisuje realni sustav matematičkih jednadžbi kako bi se mogao razviti i uporabiti matematički model u kasnijim analizama, projektima i sustavu zbog kojih je izrađen. Matematički modeli sastoje se od matematičkih operatora, koeficijenata i varijabli koje mogu biti ulazne i izlazne, zavisne i nezavisne, varijable stanja i slučajne varijable, a predstavljaju se vektorima. Općenito, za modeliranje koriste se matematičke funkcije i parametri koji se moraju aproksimirati, a osnovni se problemi modeliranja svrstavaju u modele crne i bijele kutije. Ukoliko su veze među varijablama nepoznate, tada se govori o modelu crne kutije. Kod modela bijele kutije više je poznatih varijabli te zbog toga njegova upotreba nekada može biti složenija, ali ujedno i preciznija. [22]

Obično, svako matematičko modeliranje počinje s problemom u stvarnom svijetu. Ponekad takvi problemi proizlaze iz kontroliranih uvjeta laboratorija, a ponekad i iz nekontroliranih uvjeta okoliša. Svaki taj problem potrebno je opažati, a rješava se najviše na bazi znanja, iskustva i prepoznavanja sličnosti trenutnih i već poznatih situacija. Drugi korak u modeliranju je u potpunosti identificirati i selektirati problem, odnosno aproksimirati na najbolji način. Time se dobiva realan model koji s vremenom postaje matematički model (treći korak) koji zamjenjuje stvarne količine i procese s matematičkim simbolima, relacijama (jednadžbe, funkcije) i matematičkim operacijama. Određenim programom, dobiveni matematički model postaje računalni model koji simulacijama i izračunima, dovodi do zaključka ili informacija o problemu stvarnog svijeta (Slika 2). [23]



**Slika 2.** Shematski prikaz matematičkog modeliranja u pet koraka (preuzeto s: <http://www.indiana.edu/~hmathmod/modelmodel.html>).

Matematičkim modeliranjem dolazi se do saznanja i o području kinetike (brzine kemijskih reakcija) te općenito o raznim fizikalno-kemijskim procesima. Kako bi se to ostvarilo, rezultate mjerenja potrebno je ubaciti u odgovarajući računalni program koji prema definiranim modelima (monofaznim, bifaznim) obrađuje podatke. Time se može doći do informacija o vrsti kinetike, brzini nestajanja DPPH radikala, kojoj pripadaju uzorci analize.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Zdrava prehrana sve više zauzima dominantno mjesto u prehrani populacije. Eko uzgoj, prirodne namirnice i napitci glavne su teme diskusija o zdravome životu. To je najviše izraženo na internetskim stranicama na kojima se mogu pronaći razni recepti za pripremu kvalitetnog obroka. Iako se zna za nutritivne vrijednosti pojedinog voća i povrća, često se pogriješi u njihovim kombinacijama. Različite varijacije, sinergizmi namirnica ponekad mogu ometati pojedinačnu učinkovitost. Zato je potrebno poznavati kemijsku pozadinu hrane kako bi se znalo izbjegavati nepoželjne mješavine.

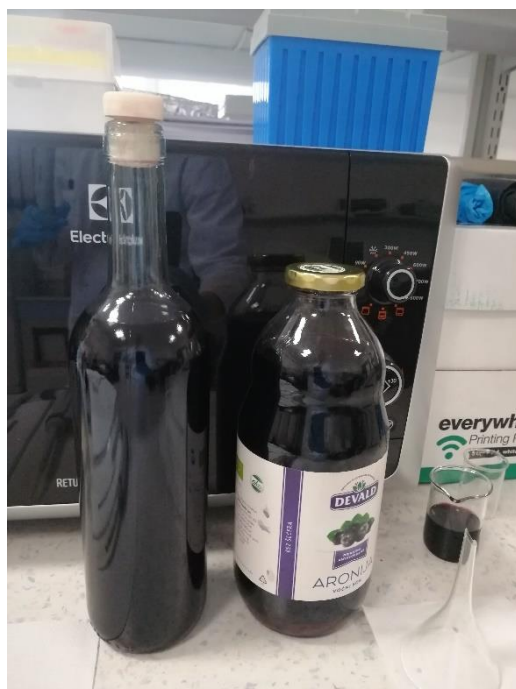
Sok aronije i crno vino su napitci dobiveni od plodova biljaka. Prepoznatljivi su po svojim sličnim pigmentacijama, antioksidansima te po svom djelovanju u istim organskim sustavima. Navedene činjenice, sličnosti, potvrđuju razlog moguće kombinacije ovih pića. Ukoliko se želi postići odgovarajući zdravstveni efekt ovakvom smjesom, potrebno je poznavati pravi omjer njezinih komponenti.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogući sinergizam antioksidanasa iz prirodnih uzoraka soka aronije i crnog vina. Znajući kako aronija posjeduje izrazito jaku antioksidativnu aktivnost, a vino slabiju, pokušalo se utvrditi kako dodatak soka aronije u crno vino utječe na antioksidativnu aktivnost smjese. Uz navedeno, u istraživanju se nastojala ispitati i kinetika reakcija između DPPH<sup>•</sup> i antioksidanasa prisutnih u soku aronije, crnom vinu kao i u njihovim smjesama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. UZORCI ARONIJE I CRNOG VINA

Tijekom analize korišten je 100%-tni cijeđeni sok aronije proizvođača „OPG DEVALD IGOR” Bilje, Hrvatska i domaće crno vino. Voćni sok kupljen je na tržnici grada Umaga, a pripremljen je bez dodanih šećera i konzervansa blagom pasterizacijom i filtracijom. Crno vino proizvedeno je od sorti grožđa terana, refoška s crvenom peteljkom i crnog vranca s lokaliteta Bujštine. Prilikom njegove alkoholne fermentacije, osim vinobrana, nije bilo ostalih dodataka.



**Slika 3.** Crno vino i sok aronije koji su korišteni u analizi (Fotografija: Ela Mijatović).

#### 3.2. KEMIKALIJE

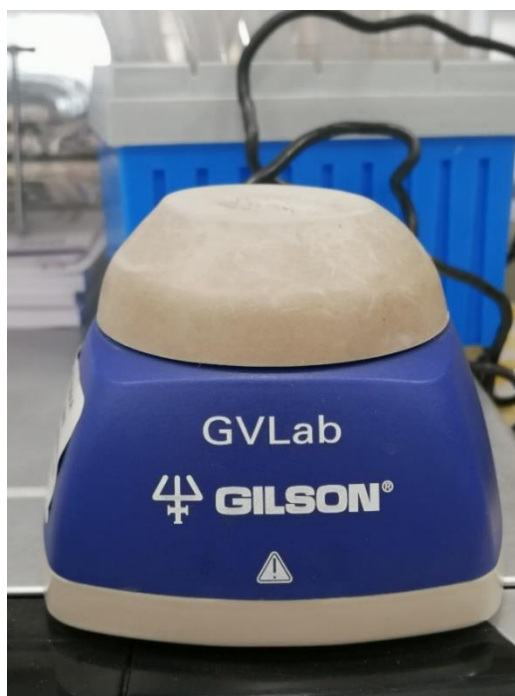
- 1) metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), J.T. Baker, HPLC Gradient Grade, Deventer, Nizozemska
- 2) 2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil (DPPH radikal), Sigma-Aldrich, Njemačka
- 3) ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic-acid (TROLOX), Sigma-Aldrich, Njemačka



### 3.3. INSTRUMENTI



**Slika 4.** UV-VIS Spectroquant® Pharo 100, Merck, Darmstadt, Njemačka (Fotografija: Ela Mijatović).



**Slika 5.** Vortex GVLab, Gilson, Villiers-le-Bel, Francuska (Fotografija: Ela Mijatović).



**Slika 6.** Analitička vaga, OHAUS Explorer, Nänikon, Švicarska (Fotografija: Ela Mijatović).

### **3.4. METODE RADA**

#### **3.4.1. PRIPREMA UZORAKA ZA DPPH<sup>•</sup> ANALIZU**

Za DPPH<sup>•</sup> analizu pripremljeno je pet uzoraka volumena od 10  $\mu$ L: ARONIJA (100%-tni aronijin sok), VINO (100%-tno crno vino), MIX 1 (50% soka aronije i 50% crnog vina), MIX 2 (75% soka aronije i 25% crnog vina), MIX 3 (25% soka aronije i 75% crnog vina). Navedeni volumen uzoraka otpipetiran je u odmjerne tikvice od 10 mL koje su do oznake nadopunjene metanolom te je takav uzorak korišten u analizi antioksidativne aktivnosti DPPH<sup>•</sup> testom. Prije ispitivanje antioksidativne aktivnosti, svaki uzorak je izvagan na analitičkoj vagi.

### 3.4.2. PRIMJENA DPPH<sup>•</sup> TESTA ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI UZORAKA

Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka korišten je DPPH<sup>•</sup> test prema metodi koju su uveli 1958. Brand-Williams i suradnici u kojoj se koristi DPPH<sup>•</sup> ili 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, stabilni dušikov radikal. Radikal se u smjesama reducira, primitkom jednog vodikovog atoma njegova boja prelazi iz tamno ljubičaste u žutu. [24] Ova se dekolorizacija, odnosno gubitak signala radikala, najčešće mjeri spektrofotometrijski na valnim duljinama najveće apsorbanције od 515 nm. S obzirom kako je riječ o brzim reakcijama, mjerenja je potrebno provoditi u intervalima od 60 s.

Ova osjetljiva metoda zahtjeva svakodnevnu pripremu svježe otopine DPPH<sup>•</sup> koncentracije 0,0001 M otapanjem u metanolu. Dobivena otopina se radi fotosenzibilnosti mora prekriti aluminijskom folijom i skloniti u zamračeni prostor. Prva slijepa proba dobiva se pripremom smjese otopine uzorka i metanola u omjeru 1:3 mL. Zatim, od dobivene otopine radikala priprema se druga slijepa proba koja se sastoji od mješavine DPPH<sup>•</sup> i metanola u jednakom omjeru. Nakon pripreme svake slijepe probe, smjese se homogeniziraju vortex mješalicom u trajanju od 10 s, prebacuju u kivetu od optičkog stakla te im se mjeri apsorbanција na valnoj duljini od 515 nm.

Nakon određivanja apsorbanција slijepih proba, slijedi analiza uzoraka koji se pripremaju miješanjem 1 mL otopine uzorka i 3 mL DPPH radikala. Provodi se postupak homogenizacije te se apsorbancije mjere pri istoj valnoj duljini u vremenskim intervalima od 1 minute. Mjerenje traje sve dok se vrijednosti apsorbancije ne prestanu mijenjati (postizanje „stabilnosti“).

Postotak gubitka DPPH<sup>•</sup> signala određuje se sljedećom jednadžbom:

$$\% \text{ gubitka signala DPPH radikala} = [(A_{SP2} + A_{SP1} - A_{UZ}) / (A_{SP2} + A_{SP1})] \times 100 \quad (1)$$

gdje su:

$A_{SP1}$  - apsorbanција slijepe probe otopine uzorka

$A_{SP2}$  - apsorbanција slijepe probe radikala,

$A_{UZ}$  - apsorbanција uzoraka.

### 3.4.3. PRIMJENA TEAC METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA UZORAKA

TEAC ili „Trolox equivalent antioxidant capacity“ je metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta složenih smjesa uz pomoću Trolox standarda. Trolox, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, je hidrosolubilni analog vitamina E koji se koristi u biologiji i biokemiji za redukciju oksidativnog stresa te staničnog oštećenja. Mjerna jedinica kojom se mjeri spomenuti kapacitet je mmol/kg uzorka te je znana još kao Trolox ekivalent (TE). [25]

Za izradu baždarnog pravca, prvo se pripremi metanolnu otopinu Trolox-a koncentracije 0,001 M. Potom se, dobivena ishodna otopina razrjeđuje na novih pet otopina raspona koncentracija od 0,00-0,00012 M. Nakon toga, ponovno se priprema otopina DPPH<sup>\*</sup> koncentracije 0,0001 M. Za svaku Trolox otopinu priprema se slijepa proba (omjer metanola i Trolox otopine 3:1 mL) čije se apsorbancije mjere u nultoj minuti. Za mjerenje antioksidativne aktivnosti otopina Trolox-a pripremaju se otopine od 1 mL Trolox otopine i 3 mL DPPH radikala u epruveti s čepom na navoj. Smjese se homogeniziraju 10 s vortex tresilicom te im se mjeri apsorbancija na 515 nm.



**Slika 7.** Priprema Trolox otopina u rasponu koncentracija od 0,00-0,12 mM (Fotografija: Ela Mijatović).

Na y ordinati baždarnog pravca je % gubitka signala DPPH radikala. Postotak gubitak signala dobiva se preko jednadžbe (2) u koju se uvrštavaju apsorbancije slijepih proba radikala i Trolox otopina te zadnje izmjerene apsorbancije uzoraka. Na x osi prikazane su koncentracije Trolox otopina.

$$\% \text{ gubitak signala DPPH radikala u Trolox otopinama} = [(A_{SP2} + A_{SP3} - A_{UZ}) / (A_{SP2} + A_{SP3})] \times 100$$

(2)

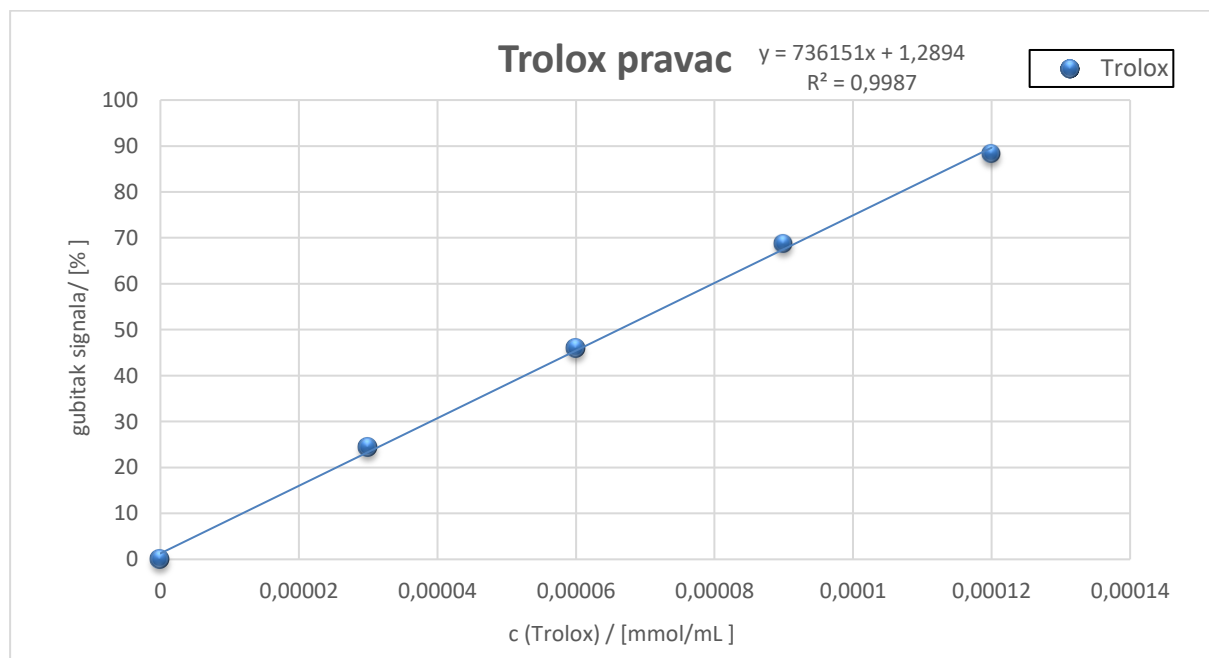
gdje su:

$A_{SP2}$  - apsorbancija slijepe probe radikala,

$A_{SP3}$  - apsorbancija slijepe probe Trolox otopina,

$A_{UZ}$  - apsorbancija smjese otopina Trolox-a i radikala.

Kako bi se provela kvantifikacija antioksidativne aktivnosti uzoraka u jednadžbu baždarnog pravca uvrštavaju se postoci inhibicije DPPH<sup>•</sup> signala u uzorcima dobiveni jednadžbom (1). Dobivenu vrijednost u mmol/mL treba podijeliti s odvagom masom uzorka i pomnožiti s 1000. Time se dobiva vrijednost izražena u mmol/kg.



**Slika 8.** Baždarni pravac za izračun antioksidativnog kapaciteta uzoraka.

### 3.4.4. ODREĐIVANJE KINETIKE NESTAJANJA DPPH RADIKALA POMOĆU MATEMATIČKIH MODELA

Kako bi se detaljnije proučio mehanizam nestajanja DPPH radikala u reakcijama, primijenjeni su matematički monofazni i bifazni modeli.

1) model nultog reda: brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji reaktanata, parametri su  $DPPH^*_0$  i  $k_0$ .

$$DPPH^*_t = DPPH^*_0 + k_0 \times t \quad (3)$$

2) model prvog reda: brzina reakcije ovisi o koncentraciji reaktanata, parametri su  $DPPH^*_0$  i  $k_1$ .

$$DPPH^*_t = DPPH^*_0 \times e^{-k_1 \times t} \quad (4)$$

3) logaritamski model: brzinu reakcije određuje početna koncentracija reaktanata, parametri su  $DPPH^*_0$ ,  $k_1$  i  $c$ .

$$DPPH^*_t = DPPH^*_0 \times e^{-k_1 \times t} + c \quad (5)$$

4) bifazni model prvog reda: dvije eksponencijalne jednačbe, brzina reakcije u dvije faze, parametri su:  $DPPH^*_1$ ,  $DPPH^*_2$ ,  $DPPH^*_r$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ .

$$DPPH^*_t = DPPH^*_0 \times e^{-k_1 \times t} + DPPH^*_2 \times e^{-k_2 \times t} + DPPH^*_r \quad (6)$$

U formulama su:

$DPPH^*_0$  – količina DPPH radikala na početku eksperimenta,

$DPPH^*_t$  – količina DPPH radikala u vremenu  $t$ ,

$DPPH^*_1$  – količina DPPH radikala u prvoj fazi reakcije u vremenu  $t=0$ ,

$DPPH^*_2$  – količina DPPH radikala u drugoj fazi reakcije u vremenu  $t=0$ ,

$DPPH^*_r$  – preostala količina DPPH radikala,

$t$  – vrijeme kemijske reakcije,

$k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  – konstante brzine kemijske reakcije.

### 3.4.5 STATISTIČKA ANALIZA

Svi dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (N=2). U statističkoj obradi rezultata koristio se program *Microsoft® Office Excel 2016*, dok su se matematički modeli kinetike analizirali u računalnom programu Wolfram Research *Matematica® 9* (WolframResearch Co, SAD). Za određivanje podudarnosti rezultata matematičkih modela i eksperimentalnih mjerenja koristili su se statistički parametri: koeficijent determinacije ( $R^2$ ), korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (SRMSE) i hi-kvadrat test ( $\chi^2$  test).

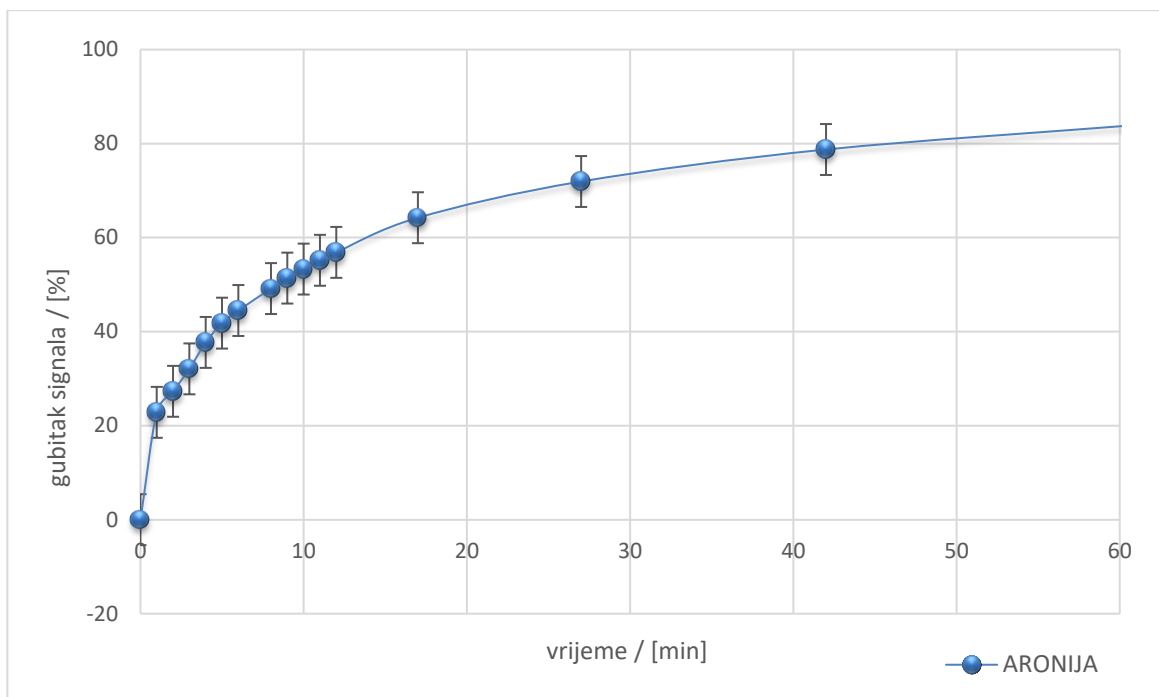
## **4. REZULTATI**

### **4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA (DPPH<sup>•</sup> TEST)**

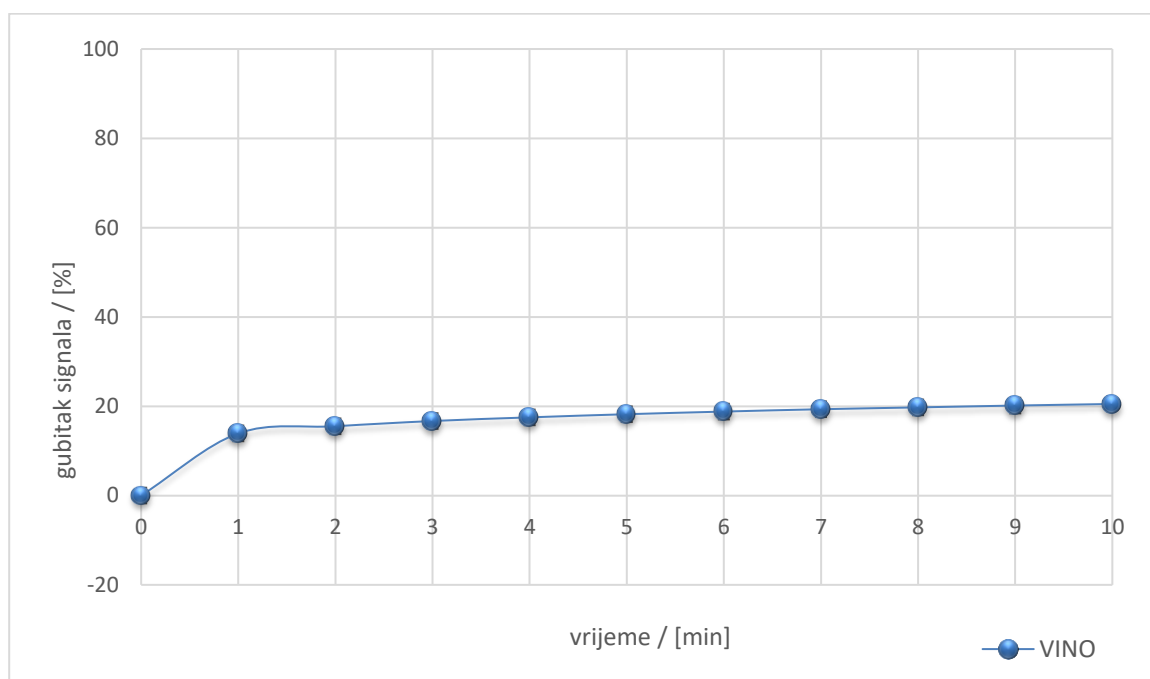
Antioksidativna aktivnost uzoraka DPPH<sup>•</sup> testom određena je spektrofotometrijski na 515 nm. Za svaki uzorak provedena su dva nezavisna mjerenja apsorbancija, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadnim standardnim pogreškama. Uz pomoć jednadžbe (1), izračunat je gubitak signala radikala koji je prikazan na ordinati grafova, dok je na apscisi prikazano vrijeme reakcija (Slike 9, 10, 11, 12).

Najjaču antioksidativnu aktivnost ima uzorak ARONIJA (Slika 9), a najslabiju uzorak VINO (Slika 10). U prvoj minuti gubitak signala radikala za ARONIJU iznosi 23%, dok u 60-toj minuti raste iznad 80%. Uzorak VINO u prvoj minuti pokazuje gubitak signala od 13%, a s obzirom na nepromijenjenu apsorbanciju poslije desete minute, gubitak iznosi 21%.



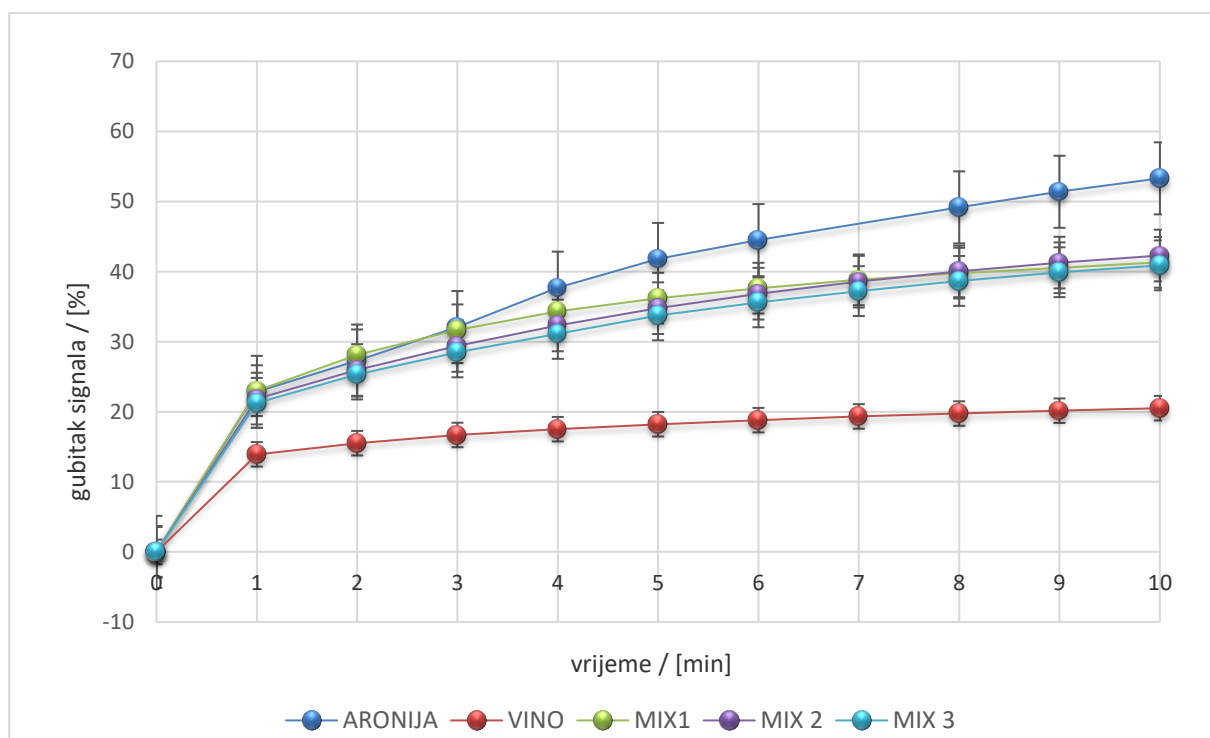


**Slika 9.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorkom ARONIJA.



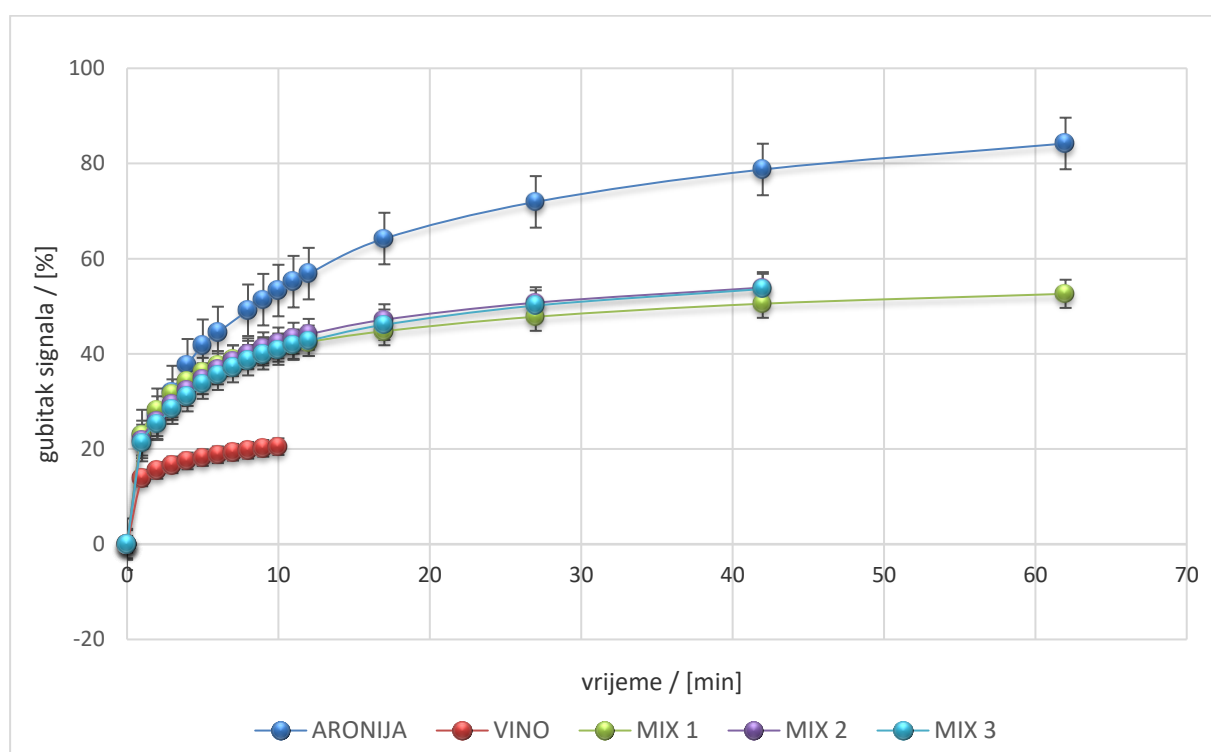
**Slika 10.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorkom VINO.

U izdvojenih deset minuta reakcije (Slika 11), svi uzorci u početku imaju pojačanu inhibiciju signala radikala. Osim maksimalne (ARONIJA) i minimalne inhibicije signala radikala (VINO), na grafičkom prikazu (Slika 11) nalaze se i preostala tri uzorka. U prvih šest minuta, drugu po redu najjaču antioksidativnu aktivnost pokazuje uzorak MIX 1, a slijede ga MIX 2 i MIX 3. Zanimljivo je kako se u prvoj minuti postoci gubitka signala ova tri uzorka gotovo preklapaju (23%, 22% i 21%), a do treće minute postepeno razdvajaju (32 %, 29 % i 28 %) sve dok ne dostignu vrijeme šeste minute (38%, 37% i 36%). Istaknuta je i druga minuta u kojoj nakratko MIX 1 premašuje ARONIJU s vrijednostima signala od 28%. U intervalu od sedme do devete minute MIX 1 i MIX 2 pokazuju iste postotke redukcije DPPH radikala (39%, 40% i 41%), dok u desetoj minuti dolazi do preokreta. MIX 2 u posljednjoj vremenskoj točki pokazuje najveći gubitak signala od 42%, a slijede ga MIX 1 i MIX 3 s 41%.



**Slika 11.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorcima ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2, MIX 3 tijekom prvih deset minuta reakcije.

Na grafičkom prikazu (Slika 12) koji obuhvaća cjelokupno vrijeme reakcije svakog uzorka s radikalom, još uvijek ne dolazi do mijenjanja maksimuma i minimuma antioksidativne aktivnosti. Najveće promjene i dalje su vidljive između različitih smjesa aronije i crnog vina. Naime, u 27-oj minuti MIX 2 premašuje MIX 3 (50%) s gubitkom signala radikala od 51%, a slijedi ih MIX 1 s 48%. Uzorci se ponovno susreću u 42-oj minuti, kada iznos gubitka signala za MIX 2 i MIX 3 iznosi 54%, a za MIX 1 51%. Treći uzorak, MIX 1, susiže ostale smjese uzoraka tek u 60-toj minuti u kojoj reducira signal DPPH radikala za vrijednosti od 53%.

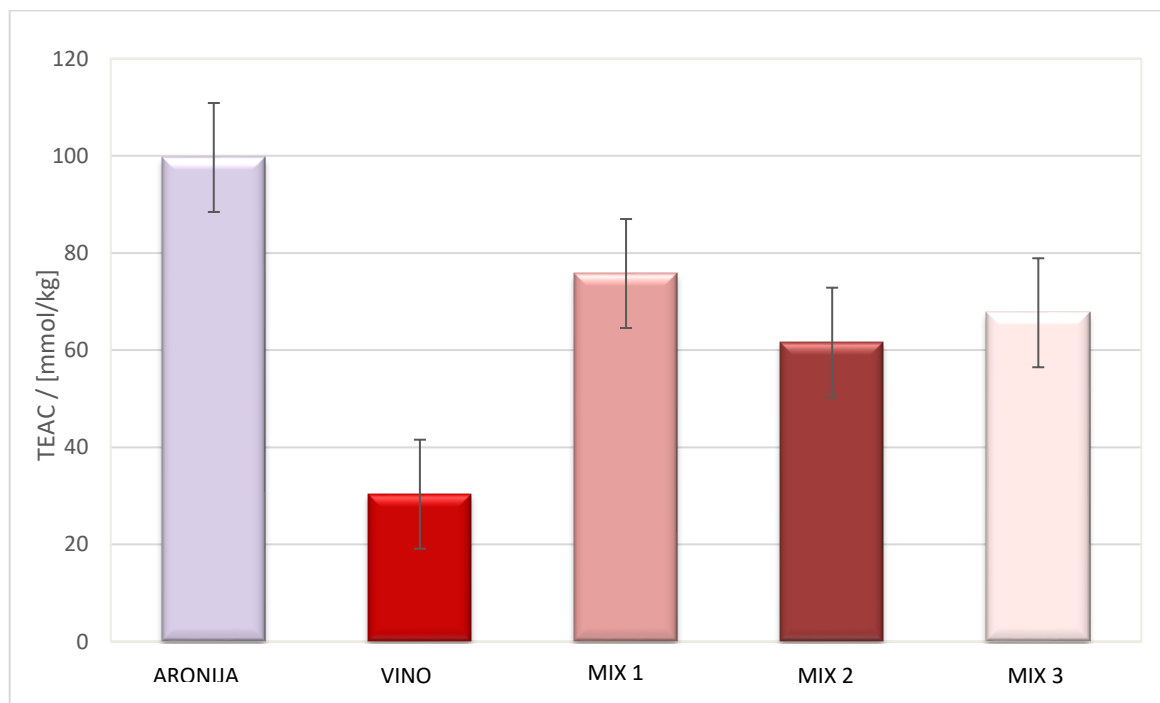


**Slika 12.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorcima ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2 i MIX 3 iz cijelog vremena reakcija.

## 4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA (TEAC TEST)

Stupčasti grafikon (Slika 13) prikazuje izračunati Trolox ekvivalent za analizirane uzorke, odnosno koncentracije TEAC izražene u mmol/kg uzorka. TEAC uzorka ARONIJA iznosi 100 mmol/kg, a za uzorak VINO 30 mmol/kg. Kao i kod DPPH<sup>•</sup> metode, spomenuti uzorci predstavljaju najveću i najmanju antioksidativnu aktivnost. Za MIX 1 TEAC iznosi 76 mmol/kg, a odmah nakon slijede MIX 3 s 68 mmol/kg i MIX 2 s 62 mmol/kg.

Redoslijed antioksidativne aktivnosti uzoraka smjesa nije u potpunosti jednak onima koji su dobiveni mjerenjima u DPPH<sup>•</sup> metodi. Kod inhibicije signala radikala, među smjesama aronije i crnog vina, dominiraju MIX 2 i MIX 3, zatim MIX 1. U primjeni TEAC metode najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je, poslije ARONIJE, MIX 1 pa potom MIX 3 i MIX 2. Potrebno je napomenuti kako su ispravniji rezultati dobiveni TEAC testom jer je to metoda kvantifikacije koja uzima u obzir masu uzorka.



**Slika 13.** Grafički prikaz koncentracije TEAC za svaki uzorak izražene u mmol/kg.

### **4.3. REZULTATI KINETIKE NESTAJANJA RADIKALA U REAKCIJI S ANTIOKSIDANSIMA UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA**

Za određivanje kinetike ponašanja DPPH<sup>•</sup> i antioksidanasa u uzorcima korištena su četiri matematička modela, a podudaranost rezultata eksperimenta i primijenjenih modela uspoređivana je statističkim pokazateljima: koeficijent determinacije ( $R^2$ ), korijen srednjeg kvadratnog odstupanja (SRMSE), hi-kvadrat test ( $\chi^2$  test). Kinetički parametri koji su dobiveni pomoću modela prikazani su zajedno sa statističkim pokazateljima u tablicama 3 i 4.

Na temelju usporedbe statističkih pokazatelja koji predstavljaju podudaranje eksperimentalnih i modelnih podataka, najbolji opis reakcija radikala i uzoraka ARONIJA, MIX 1, MIX 2 i MIX 3 (Slika 14, 16, 17 i 18) dobiven je bifaznim modelom kinetike prvog reda, a najlošiji prikazan je modelom kinetike nultog reda. Za uzorak VINO (Slika 15) najbolji opis kinetike dobiven je modelom nultog reda, a najlošiji bifaznim modelom kinetike prvog reda.

#### **4.3.1. USPOREĐIVANJE STATISTIČKIH POKAZATELJA NAJBOLJE I NAJLOŠIJE OPISANE KINETIKE UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA**

Bifazni model prvog reda za uzorak ARONIJA pokazuje najveći koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,9985$ ), a najmanje vrijednosti SRMSE (0,0188) i  $\chi^2$ - pogreške (1,70 %). Za uzorak MIX 1 isto prikazuje najveći koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,9994$ ), a najmanji SRMSE (0,0101) i najmanju  $\chi^2$ - pogrešku (0,91%). Kod preostala dva uzorka MIX 2 i MIX 3, bifazni model prvog reda pokazuje iste koeficijente determinacije ( $R^2 = 0,9999$ ) te niske rezultate SRMSE (0,0083 i 0,0078) i  $\chi^2$ - pogreške (0,75% i 0,70%).

Koeficijent determinacije  $R^2$  modela nultog reda za uzorak ARONIJA iznosi 0,9592, dok SRMSE i  $\chi^2$ - pogreška iznose 0,2155 i 17,71%. Za uzorak MIX 1 ovim modelom dobiven je koeficijent determinacije  $R^2$  od 0,9799, dok su SRMSE (0,1423) i  $\chi^2$ - pogreška (11,70%) dobiveni kao

najveće vrijednosti u odnosu na ostale modele. Za uzorke MIX 3 i MIX 2 prema modelu nultog reda koeficijenti determinacije  $R^2$  iznose 0,9820 i 0,9855, SRMSE 0,1340 i 0,1207, a  $\chi^2$ - pogreške 10,49% i 9,93%.

Logaritamski model za uzorak VINO pokazuje najveći koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,9983$ ), najmanje vrijednosti SRMSE (0,0237) i  $\chi^2$ - pogreške (2,01%). Bifazni model kinetike prvog reda uzorka VINO pokazuje najveće vrijednosti  $\chi^2$ - pogreške (3,88%), dok su dobiveni rezultati za koeficijent determinacije  $R^2$  i SRMSE u iznosu od 0,9981 i 0,0415. Kao najlošiji opis kinetike za ovaj uzorak izdvojio se bifazni model kinetike nultog reda, ali treba napomenuti kako se i dalje on smatra prihvatljivim s obzirom kako njegova  $\chi^2$ - pogreška ne prelazi vrijednosti od 5%.

#### **4.3.2. USPOREĐIVANJE KINETIČKIH PARAMETARA NAJBOLJE OPISANE KINETIKE UZORAKA SOKA ARONIJE, CRNOG VINA I NJIHOVIH MJEŠAVINA**

U bifaznom modelu prvog reda dobivene su vrijednosti dvaju konstanti kinetike ( $k_1$ ,  $k_2$ ) za prvu i drugu fazu kemijske reakcije DPPH radikala i antioksidanasa u uzorcima ARONIJA, MIX 1, MIX 2 i MIX 3. Konstante, odnosno brzine kemijskih reakcija, veće su u prvoj nego u drugoj fazi reakcija, što potvrđuje prisutnost „brzih“ i „sporih“ antioksidanasa. U prvom susretu radikala i antioksidanasa, vrijednosti konstante najveće su za uzorak ARONIJA (2,3794), zatim za MIX 3 (1,9507), MIX 2 (1,2499) i MIX 1 (0,7555). Dok u drugom dijelu kemijskih reakcija, rezultat konstante najveći je za uzorak MIX 2 (0,9888), a slijede ga MIX 1 (0,6074), ARONIJA (0,5091) i MIX 3 (0,0970).

Promatrajući  $r$  parametar bifaznog modela kinetike, uočeno je kako najveća količina neizreagiranog DPPH<sup>•</sup> zaostaje nakon reakcije radikala i uzorka MIX 3 (47,59%). Drugu po redu preostalu količina radikala od 47,91% pokazuje MIX 1, zatim MIX 2 i ARONIJA u iznosima od 46,83% i 19,88%. Napisani postoci vidljivi su kao krajnje točke eksperimentalnih podataka na grafičkim prikazima (Slika 14, 16, 17 i 18).

**Tablica 3.** Kinetički i statistički parametri dobiveni u analizi matematičkih modela kinetike nultog i prvog reda za uzorke ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2 i MIX 3.

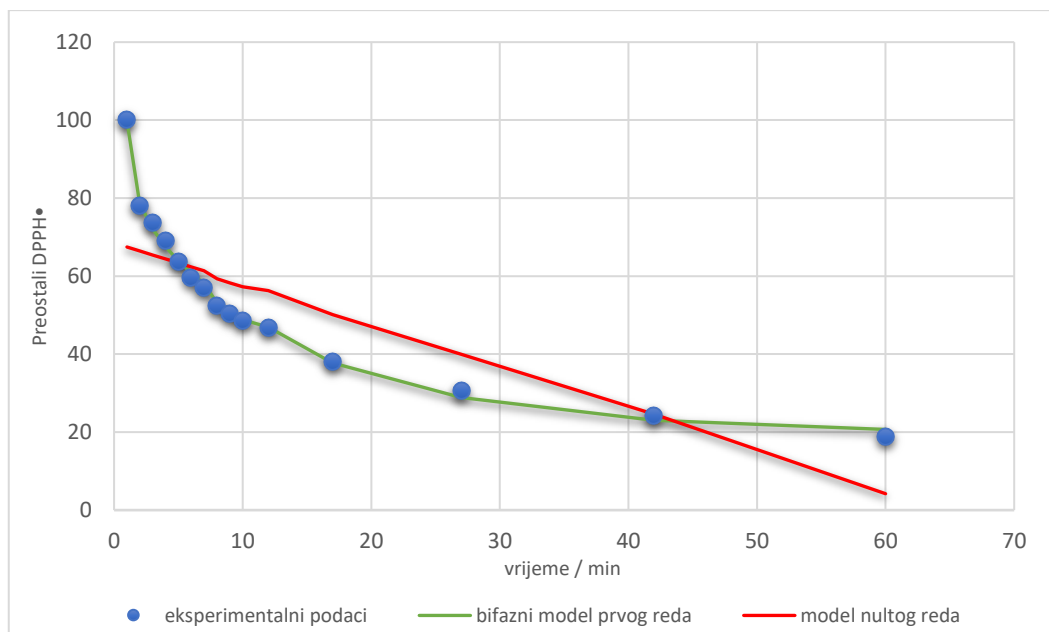
Model/parametar	Uzorci soka aronije, crnog vina i njihovih mješavina				
	ARONIJA	VINO	MIX 1	MIX 2	MIX 3
<b>Model kinetike nultog reda</b>					
a (%)	67,47	90,55	68,96	72,68	74,86
$k_0$	-1,0205	-1,3186	-0,4898	-0,8812	-0,8951
$R^2$	0,9592	0,9982	0,9799	0,9820	0,9855
SRMSE	0,2155	0,0415	0,1423	0,1340	0,1207
$\chi^2$ -pogreška (%)	17,71	3,35	11,70	10,49	9,93
<b>Model kinetike prvog reda</b>					
a (%)	80,27	90,91	70,76	76,09	78,03
$k_1$	0,0431	0,0164	0,0104	0,0195	0,0187
$R^2$	0,9836	0,9982	0,9818	0,9854	0,9883
SRMSE	0,1340	0,0406	0,1336	0,1206	0,1080
$\chi^2$ -pogreška (%)	11,01	3,27	10,98	9,91	8,87
<p><math>k_0</math>, <math>k_1</math>, - konstante brzine kemijske reakcije; <math>R^2</math> – koeficijent determinacije; SRMSE- korijen srednjeg kvadratnog odstupanja; <math>\chi^2</math> pogreška- hi-kvadrat test; a- količina DPPH radikala na početku eksperimenta.</p>					

**Tablica 4.** Kinetički i statistički parametri dobiveni u analizi matematičkog logaritamskog modela i bifaznog modela kinetike prvog reda za uzorke ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2 i MIX 3.

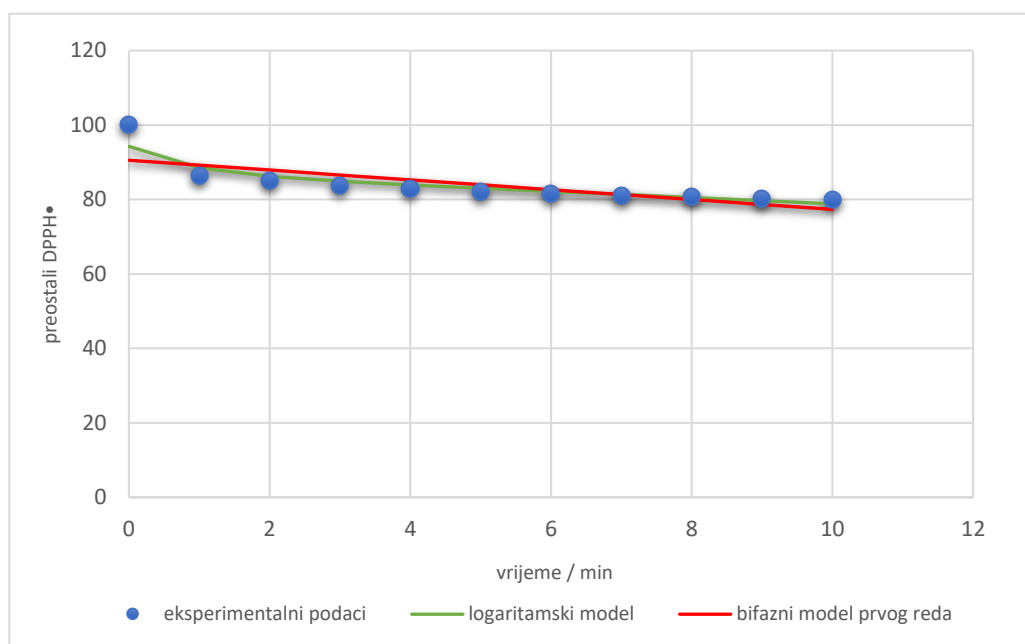
Model/parametar	Uzorci soka aronije, crnog vina i njihovih mješavina				
	ARONIJA	VINO	MIX 1	MIX 2	MIX 3
<b>Logaritamski model kinetike</b>					
a (%)	65,67	-3002,39	40,19	41,92	41,11
$k_1$	0,1061	0,5850	0,3194	0,2283	0,1928
c (%)	23,67	3096,68	53,81	51,22	51,78
$R^2$	0,9954	0,9983	0,9964	0,9974	0,9979
SRMSE	0,0715	0,0237	0,0509	0,0489	0,0450
$\chi^2$ -pogreška (%)	6,05	2,01	4,30	4,14	3,81
<b>Bifazni model kinetike prvog reda</b>					
a (%)	34,54	-40,07	26,86	29,69	19,25
b (%)	45,44	-40,22	25,09	23,47	33,15
$k_1$	2,3794	-0,0144	0,7555	1,2499	1,9507
$k_2$	0,5091	-0,0148	0,6074	0,9888	0,0970
r (%)	19,88	170,69	47,91	46,83	47,59
$R^2$	0,9985	0,9981	0,9994	0,9999	0,9999
SRMSE	0,0188	0,0415	0,0101	0,0083	0,0078
$\chi^2$ -pogreška (%)	1,70	3,88	0,91	0,75	0,70

$k_1$ ,  $k_2$ , - konstante brzine kemijske reakcije;  $R^2$  – koeficijent determinacije; SRMSE - korijen srednjeg kvadratnog odstupanja;  $\chi^2$  pogreška- hi-kvadrat test; a - količina DPPH radikala u prvoj fazi reakcije; b -količina DPPH radikala u drugoj fazi reakcije; c – neizregirani DPPH radikal logaritamskog modela kinetike; r – neizreagirani DPPH radikal bifaznog modela kinetike.

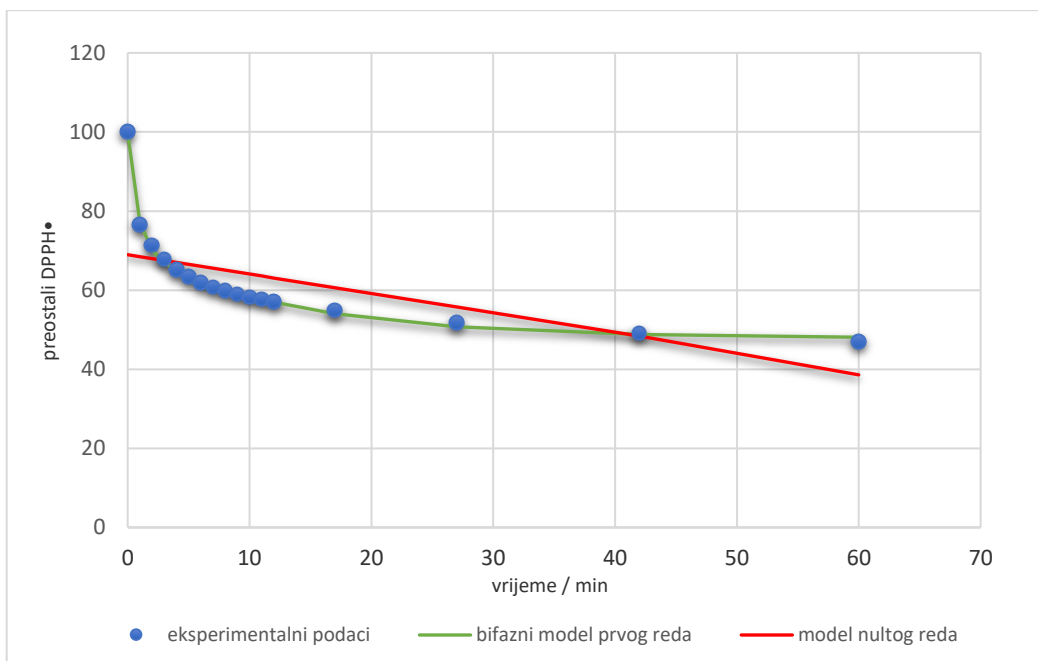




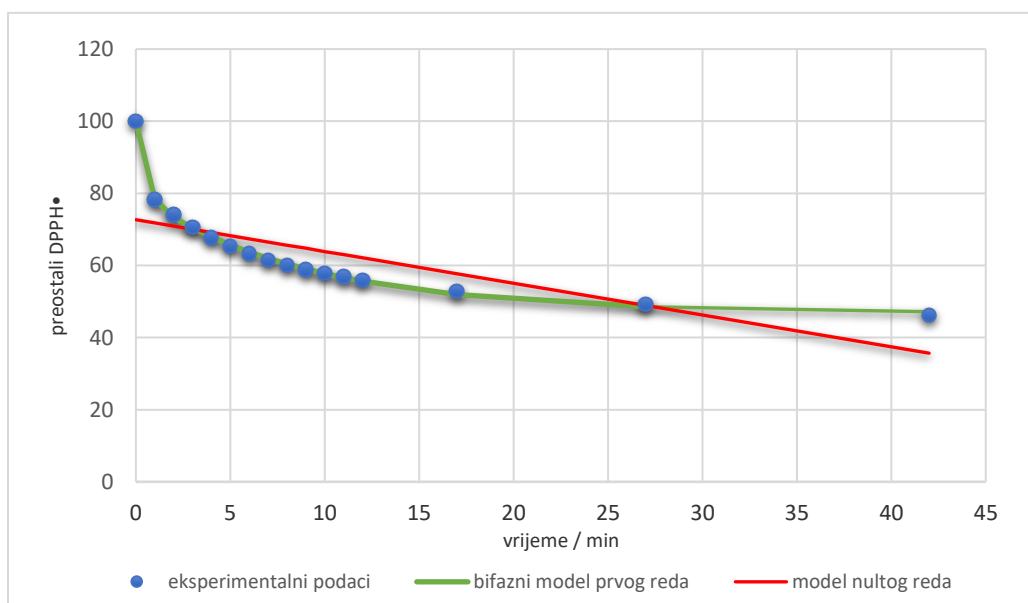
**Slika 14.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku ARONIJA.



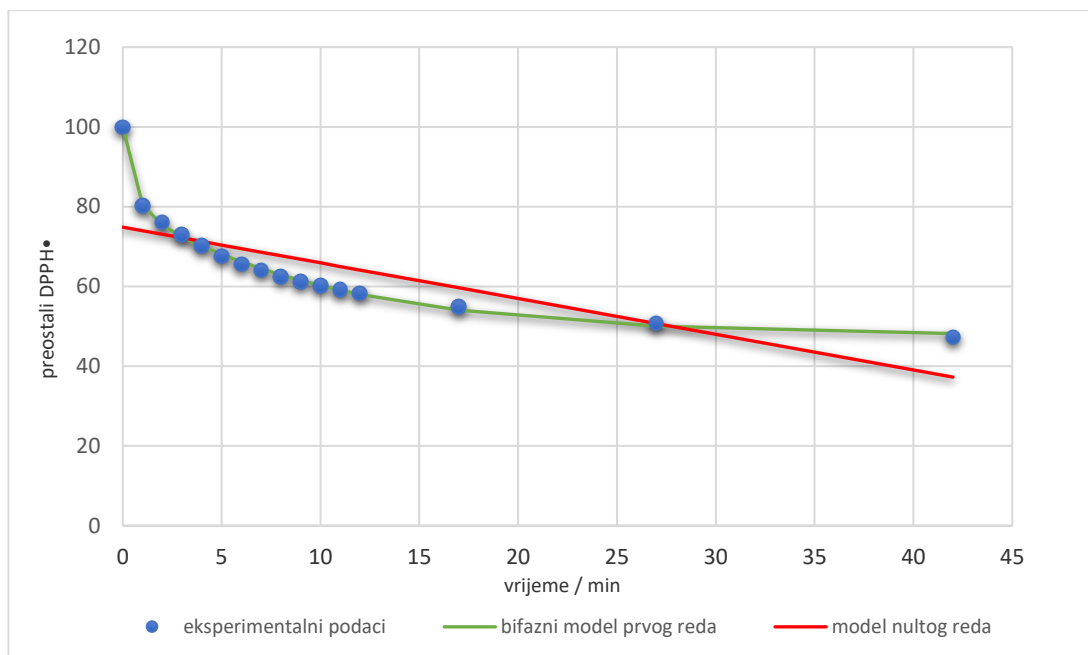
**Slika 15.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku VINO.



**Slika 16.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku MIX 1.



**Slika 17.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku MIX 2.



**Slika 18.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku MIX 3.

## 5. RASPRAVA

Na osnovi teorijskog znanja, analizirani uzorci soka aronije, crnog vina i njihovih mješavina sadrže visoke udjele polifenola u svom kemijskom sastavu. Interakcije između polifenola različitih te istovrsnih komponenti mogu dovesti do promjena u antioksidacijskom kapacitetu uzoraka. Upravo takvi odnosi uzrokuju sinergistički, antagonistički ili adicijski efekt. Pojedine studije pokazale su sinergistički porast antioksidativne aktivnosti u reakciji između soka aronije i  $\alpha$ -tokoferola, a za crno vino potvrdile su sinergističku ovisnost vlastitih polifenola te aditivni efekt u slučaju mješavina. [26] Prema istraživanju Pinela i suradnika, [27] dokazano je kako katehini, resveratrol i kvercetin pokazuju negativnu sinergističku interakciju (pad antioksidacijskog kapaciteta). Dok su Hidalgo i suradnici, [28] proučavali antioksidativnu aktivnost 11 flavonoidnih molekula, koristeći DPPH radikal za testiranje flavonoid-flavonoid interakcija te njihovih utjecaja na ukupnu antioksidativnu aktivnost. U istraživanju pronađene su različite kombinacije flavonoida koje pokazuju nisku inhibiciju DPPH radikala ili antagonistički efekt. Takve varijacije nazvali su i kopigmentacijskim reakcijama u kojima antocijanini mogu reagirati s ostalim molekulama (kopigmentima) flavonoida, metala, organskih kiselina uz stvaranje kompleksnijih molekula. Navedene formacije najčešće dovode do polimerizacijskih reakcija koje remete primarnu antioksidativnu aktivnost te mogućnost hidroksilnih skupina antioksidanasa u redukciji slobodnih radikala. Postoji mogućnost stvaranja i vodikovih veza između fenolnih komponenti koje jednako ometaju hidroksilnu skupinu i time uzrokuju pad antioksidativne aktivnosti. Ovakve pojave češće se javljaju u koncentriranijim smjesama, nego u jednostavnijima kod kojih se ne ometa učinkovitost pojedinačnih molekula antioksidanasa u reakciji sa slobodnim radikalom.

U ovom istraživanju uzorak s 100%-tnim aronijinim sokom pokazivao je najveći antioksidacijski kapacitet u oba testa (DPPH<sup>\*</sup> i TEAC). Međutim, različite smjese soka aronije i crnog vina pokazale su niže antioksidativne aktivnosti pri čemu se potvrđuje antagonizam aronije u mješavini s crnim vinom.

U istraživanju Tolić i suradnika [29] ispitivao se antioksidacijski kapacitet 11 sokova aronije različitog proizvođača, države podrijetla, ali istog udjela aronije u soku (100%). Rezultati, inhibicije signala DPPH radikala, izraženi su u mmol TE/kg prema kojima najveći antioksidacijski kapacitet pokazuje uzorak „Voelkel GmbH“, Njemačka s vrijednostima od 40,2 mmol TE/kg. Promatrajući rezultat najveće antioksidativne aktivnosti ovog istraživanja (100 mmol TE/kg za sok aronije), prethodno spomenuti rezultat ~ 2,5x je manjih vrijednosti. Razlog toga je vjerojatno različita priprema uzoraka, valna duljina mjerenja (517 nm), različito vrijeme analize i geografsko podrijetlo aronije kao i različiti klimatski uvjeti uzgoja te ekstrakcijske metode u dobivanju soka. Osim navedenog, u istraživanju je istaknuto kako pasterizacija i skladištenje imaju isto bitnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti sokova aronije. Najveći utjecaj posebno imaju reakcije oksidacije za vrijeme procesa pasterizacije i temperatura skladištenja.

Stratil i suradnici, [30] određivali su antioksidativnu aktivnost 29 vrsta vina spektrofotometrijskim metodama. Crna vina činila su 21 uzoraka, a proizvedena su u Češkoj Republici ili uvezena iz drugih država. Najveće Trolox vrijednosti crnih vina, odnosno antioksidacijski kapacitet, pokazali su jedno vino iz Italije i dva vina, Cabernet Sauvignon i Syrah, iz Argentine s vrijednostima TE od 34,3 do 34,7 mmol/kg. Dobiveni rezultati gotovo se podudaraju s rezultatom antioksidacijskog kapaciteta (30 mmol/kg) crnog vina ovog istraživanja. Za male varijacije u rezultatima odgovorne su različite sorte grožđa, izloženost suncu, berbe grožđa te procedure u proizvodnji vina.

Bifazna kinetika modela prvog reda uočena je i u prijašnjim studijama koje su uključivale uzorke aronije. Jakobek i suradnici [31] bavili su se utjecajem i interakcijom fenola u antiradikalnoj aktivnosti vrste *Aronia melanocarpa*. Na grafičkim prikazima ovoga istraživanja, primijećena su dva perioda kemijskih reakcija fenolnih komponenti različitih masa. U prvom periodu od 10-30 min uočena je brza redukcija signala DPPH radikala, dok nakon tog vremena gubitak signala sporije je reakcije. Ovakvi rezultati doveli su do pretpostavke o bifaznoj interakciji fenolnih komponenti aronije i DPPH u kojoj se javljaju „brzi“ i „spori“ antioksidansi. Van den Beg i suradnici [32] opisali su spori period bifazne reakcije kao vrijeme nastajanja produkta koji sporije reagira sa slobodnim radikalom.

To ujedno može označavati period u kojem se mijenja molekulska struktura fenolnih komponenti koje predstavljaju jake antioksidativne komponente aronije. U sličnom tipu istraživanja, Broznić i suradnici [33] opisali su bifaznu kinetiku u dva koraka, gdje u prvom dolazi do prijenosa vodikovog atoma s antioksidansa na slobodan radikal, a u drugom koraku manje reaktivni formirani radikal A\* može ponovno reagirati s ostalim molekulama DPPH\* ili A\* u reakcijama disproporcioniranja radikala. Espin i suradnici [34] iznijeli su slično objašnjenje, ali stavili su naglasak na kompleksnosti reakcija dvaju vrsta antioksidanasa koje koriste dva različita reakcijska puta. U takvoj interakciji javljaju se dvije konstante kemijske reakcije,  $k_1$  i  $k_2$ , koje predstavljaju dvije faze nestanka DPPH radikala.

Navedene činjenice opravdavaju postojanost „brzih“ i „sporih“ antioksidanasa, odnosno postojanost bifazne kinetike prvog reda u uzorcima soka aronije te mješavina soka aronije i crnog vina. Radi jače antioksidativne aktivnosti, u bifaznu kinetiku antioksidansi soka aronije uvode i antioksidanse crnog vina. Pod njihovim utjecajem, „brzi“ i „spori“ antioksidansi crnog vina raspodjeljuju se između „brzih“ i „sporih“ antioksidanasa soka aronije. Zbog takvog rasporeda, u susretu s radikalom pojavljuju se dvije faze, brzine kemijskih reakcija. U prvim fazama javljaju se veće vrijednosti konstanti kinetike, a time i brzina kemijskih reakcija. Dok u drugim fazama, opadaju vrijednosti konstanti kao i brzina kemijskih reakcija zbog pojave „sporih“ antioksidanasa.

Za uzorak MIX 1, od svih mješavina soka aronije i crnog vina, dobiven je najveći antioksidacijski kapacitet. To potvrđuje činjenicu kako je spomenuta smjesa pokazatelj najboljeg sinergizma između antioksidanasa ovih komponenti. Bifazni model kinetike, nakon primjene antiradikalnih testova, dodatno je potvrdio sinergističku vezu u uzorku MIX 1 pomoću konstanti čije vrijednosti nisu visoke, a niti se značajno ne mijenjaju. Takvi rezultati pokazuju kako se brzina djelovanja antioksidanasa previše ne razlikuje u prvoj i drugoj fazi reakcije. Što znači da iako postoje „brzi“ i „spori“ antioksidansi u mješavini, brzina njihovog djelovanja u inhibiranju slobodnog radikala gotovo je identična i bez promjena. Odnosno, isti efekt sinergizma antioksidanasa, uočava se kroz čitavu kemijsku reakciju. Upravo zbog toga bi se ovakva smjesa (50% soka aronije, 50% crnog

vina), preporučila za konzumaciju jer bi proces antioksidacije, bez izmjenjivanja perioda stagnacije i rasta brzina, jednako trajao u organizmu sve dok se ne potroše svi antioksidansi u krvi.

## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na odgovarajući sinergizam uzoraka soka aronije i crnog vina. Oslanjajući se na metodu kvantifikacije, utvrđeno je kako smjesa s 50%-tnim udjelom ovih komponenti pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet. Time je dokazano kako dodatak soka aronije u crno vino pospješuje njegovu antioksidativnu aktivnost. S obzirom kako je uzorak soka aronije pokazao u obje primijenjene metode najveći antioksidacijski kapacitet, preporučuje ga se koristiti pojedinačno.

Na temelju usporedbe eksperimentalnih i matematičkih modelnih podataka, dokazano je da bifazni model prvog reda najbolje opisuje kinetiku kemijskih reakcija između DPPH radikala i antioksidanasa uzoraka, dok je najlošije opisuje model nultog reda. Potvrđeno je kako se kinetika uzoraka ostvaruje dvjema fazama (brzinama) kemijskih reakcija, odnosno prisustvom „brzih“ i „sporih“ antioksidanasa.

Kako bi se mogle identificirati komponente uzoraka koje predstavljaju „brze“ i „spore“ antioksidanse, potrebna su dodatna istraživanja koja uključuju mehanizam kemijskih reakcija zbog kojeg dolazi do sinergizma antioksidanasa iz soka aronije i crnog vina. Na takav način mogao bi se predvidjeti odnos između konstanti brzina kemijskih reakcije, količina DPPH radikala u prvoj i drugoj fazi bifaznog modela, preostalih količina DPPH radikala te općenito kinetičkih parametara.



## 7. LITERATURA

1. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Snopek L, Orsavova J. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*. 2017 Jan; 22(6):1-24.
2. Denev P, Číž M, Kratchanova M, Blazheva D. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chem*. 2019 Jun; 30; 284: 108-117.
3. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. *Aronia* Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J Med Food*. 2010 Apr; 13(2): 255-69.
4. Bräunlich M, Økstad OA, Slimestad R, Wangensteen H, Malterud KE, Barsett H. Effects of *Aronia melanocarpa* Constituents on Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. *Molecules*. 2013; 5; 18(12): 14989-99.
5. Daskalova E i sur. *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot fruit juice reveals neuroprotective effect and improves cognitive and locomotor functions of aged rats. *Food Chem Toxicol*. 2019 Jul, 12; 132: 1-6.
6. Kędzierska M i sur. Chemotherapy modulates the biological activity of breast cancer patients plasma: the protective properties of black chokeberry extract. *Food Chem Toxicol*. 2013 Mar; 53: 126-32.
7. Ivandija T. Autohtone vinske sorte. *Glasnik Zaštite Bilja*. 2008; 31(6): 117-25.
8. Istra; Vinopedia - riznica znanja o lozi i vinu [Internet]; pristupljeno 11.7.2019. Dostupno na: <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=Istra>
9. Alpeza I. Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik Zaštite bilja*. 2008; 31(6): 143-50.
10. Snopek L i sur. Contribution of Red Wine Consumption to Human Health Protection. *Molecules*. 2018 Jul; 23(7): 1-16.

11. Toth A i sur. Moderate red wine consumption improves hemorheological parameters in healthy volunteers. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2014; 56: 13–23.
12. Da Luz P.L. i sur. Coronary artery plaque burden and calcium scores in healthy men adhering to long-term wine drinking or alcohol abstinence. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014; 47: 697–705.
13. Sánchez M.C. i sur. Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2019 Jun 21;19(1):145-57.
14. Fernandes I, Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules.* 2017 Feb; 22(2): 292-322.
15. Yadav A, Kumari R, Yadav A, Mishra J. P. Srivatva S, Prabha S. Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Res. Environ. Life Sci.* 2016; 9(11): 1328-31.
16. Majaz A. Qazi, Khurshid I. M. Free Radicals and their Management, *American Journal of Pharmacy and Health Research.* 2018; 6(04): 1-11.
17. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 1997; 30: 609–15.
18. Santos-Sánchez N. F., Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism [Internet]: IntechOpen (UK). 2019; pristupljeno 18.8.2019. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/online-first/antioxidant-compounds-and-their-antioxidant-mechanism>
19. Gospodaryov D, Lushchak V. Oxidative Stress and Diseases [Internet]: IntechOpen (UK). 2012; pristupljeno: 10.7.2019. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-diseases/oxidative-stress-as-a-cause-and-consequence-of-diseases>
20. Villegas Aguilar P. J. Chemical Kinetics: An Introduction to Rates and Mechanisms of Chemical Reactions, 2016 Jan; power point prezentacija [Internet]; pristupljeno: 1.8.2019. Dostupno na:

[https://www.researchgate.net/publication/289512847\\_Chemical\\_Kinetics\\_An\\_Introduction\\_to\\_Rates\\_and\\_Mechanisms\\_of\\_Chemical\\_Reactions](https://www.researchgate.net/publication/289512847_Chemical_Kinetics_An_Introduction_to_Rates_and_Mechanisms_of_Chemical_Reactions)

21. Sendra J. M., Sentandreu E, Navarro J. L. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur Food Res Technol.* 2006 Feb; 223: 615–24.

22. Magdić D. Uvod u matematičko modeliranje. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. Skripta [Internet]; pristupljeno 27.8.2019. Dostupno na: [http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20odeliranje.pdf](http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20modeliranje.pdf)

23. Maki D, Thompson M. The Mathematical Modeling Cycle. Indiana University. Skripta [Internet]; pristupljeno 27.8.2019. Dostupno na: [www.indiana.edu/~hmathmod/modelmodel.html](http://www.indiana.edu/~hmathmod/modelmodel.html)

24. Kedare Sagar B, Singh R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011 Aug; 48(4): 412–22.

25. Trolox. Pubchem [Internet]; pristupljeno: 15.7.2019. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>

26. Jakobek L, Šeruga Marijan, Krivak P. The influence of interactions among phenolic compounds on the antiradical activity of chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2011 Jun; 62(4): 345–7.

27. Pinelo M, Manzocco L, Nuñez M. J., Nicoli M. C. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2004 Mar; 52(5):1177-80.

28. Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual T. S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem,* 2010 Aug; 121(3): 691-6.

29. Tolić M.T., Landeka Jurčević I, Panjkota Krbavčić I, Marković K, Vahčić N. Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. *Food Technol. Biotechnol.* 2015 Jun; 53(2): 171–9.
30. Stratil P, Kubáň V, Fojtová J. Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech J. Food Sci.* 2008 Jan; 26(4): 242-53.
31. Jakobek L, Šeruga Marijan, Krivak P. The influence of interactions among phenolic compounds on the antiradical activity of chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2011 Jun; 62(4): 345–8.
32. Van den Berg R, Haenen GRMM, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999; 66 : 511–17.
33. Broznić D, Čanadi Jurešić G, Milin Č. Involvement of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Tocopherol Isomers from Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil or Oil Mixtures in the Biphasic DPPH' Disappearance Kinetics. *Food Technol. Biotechnol.* 2016 Jun; 54 (2): 200–10.
34. Espin J. C., Soler-Rivas C, Wichers H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 2000 Feb; 48 (3): 648-56.

## 8. POPIS SLIKA

**Slika 1.** Redukcija DPPH radikala antioksidansom ArOH.

**Slika 2.** Shematski prikaz matematičkog modeliranja u pet koraka.

**Slika 3.** Crno vino i sok aronije koji su korišteni u analizi.

**Slika 4.** UV-VIS Spectroquant® Pharo 100, Merck, Darmstadt, Njemačka.

**Slika 5.** Vortex GVLab, Gilson, Villiers-le-Bel, Francuska.

**Slika 6.** Analitička vaga, OHAUS Explorer, Nänikon, Švicarska.

**Slika 7.** Priprema Trolox otopina u rasponu koncentracija od 0,00-0,12 mM.

**Slika 8.** Baždarni pravac za izračun antioksidativnog kapaciteta uzoraka.

**Slika 9.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorkom ARONIJA.

**Slika 10.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorkom VINO.

**Slika 11.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorcima ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2, MIX 3 iz prvih deset minuta reakcija.

**Slika 12.** Gubitak signala DPPH radikala u reakciji s uzorcima ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2 i MIX 3 iz cijelog vremena reakcija.

**Slika 13.** Grafički prikaz koncentracije TEAC za svaki uzorak izražene u mmol/kg.

**Slika 14.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku ARONIJA.

**Slika 15.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku VINO.

**Slika 16.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku MIX 1.

**Slika 17.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku MIX 2.

**Slika 18.** Grafički prikaz matematičkih modela koji predstavljaju najbolji i najlošiji opis kinetike nestajanja DPPH radikala u uzorku MIX 3.

## 9. POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Egzogeni antioksidansi u različitim izvorima hrane.

**Tablica 2.** Endogeni antioksidansi u organizmu.

**Tablica 3.** Kinetički i statistički parametri dobiveni u analizi matematičkih modela kinetike nultog i prvog reda za uzorke ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2 i MIX 3.

**Tablica 4.** Kinetički i statistički parametri dobiveni u analizi matematičkog logaritamskog modela i bifaznog modela kinetike prvog reda za uzorke ARONIJA, VINO, MIX 1, MIX 2 i MIX 3.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNİ PODACI**

Ime i prezime: Ela Mijatović

Spol: Ž

Datum i mjesto rođenja: 26.10.1997., Stuttgart

Adresa: Sunčana ul. 65, Buje 52460

Državljanstvo: Hrvatsko

### **RADNO ISKUSTVO**

Lipanj – Rujan 2017.-2019. – konobarenje u kafiću, Grožnjan

### **OBRAZOVANJE**

2016.- 2019. – Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci – Preddiplomski sveučilišni studij  
Sanitarno inženjerstvo

2012. - 2016. – Opća gimnazija „Vladimir Gortan“ Buje

### **PROJEKTI**

Sudjelovanje u organizaciji kongresa za zaštitu zdravlja „Sanitas“