

# Antioksidacijski potencijal kupine

---

**Rašić, Tonka Mirjana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:912776>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-15**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KUPINE**

**DIPLOMSKI RAD**

**TONKA MIRJANA RAŠIĆ**

**Matični broj: 15**

**Split, listopad 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KUPINE**

**DIPLOMSKI RAD**

**TONKA MIRJANA RAŠIĆ**

**Matični broj: 15**

**Split, listopad 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
GRADUATE UNIVERSITY STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**ANTIOXIDANT POTENTIAL OF BLACKBERRIES**

**DIPLOMA THESIS**

**TONKA MIRJANA RAŠIĆ**

**Parent number: 15**

**Split, October 2021.**

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta održanoj 15. i 16. prosinca 2020. godine.

**Mentor:** Doc. dr. sc. Danijela Skroza

**Pomoć pri izradi:** Mag. ing. agr. Martina Čagalj, doktorand

### ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL KUPINE

Tonka Mirjana Rašić, 15

**Sažetak:** Slobodni radikali i druge reaktivne vrste mogu prouzročiti oksidaciju i biomolekularna oštećenja kada oksidacijske vrste dosegnu antioksidativnu obranu organizma, što rezultira oksidativnim stresom. To je povezano sa starenjem i razvojem patologija kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativni poremećaji, dijabetes i upale. Da bi se spriječio ili usporio oksidativni stres izazvan slobodnim radikalima, treba unositi dovoljne količine antioksidansa. Voće i povrće sadrži široku paletu antioksidativnih spojeva (fitokemikalija) koji mogu pomoći u zaštiti staničnih sustava od oksidacijskih oštećenja i smanjiti rizik od kroničnih bolesti. O antioksidativnim učincima bobičastog voća mogu se pronaći brojna istraživanja. Antioksidacijski učinak bobičastog voća u prvom se redu pripisuje fenolnim spojevima, uglavnom flavonoidima i antocijanima. U ovom radu ispitan je antioksidacijski potencijal soka te ekstrakata ploda kupine, lista kupine i nusproizvoda nastalog pri proizvodnji soka. Uz metodu određivanja ukupnog udjela fenola u testiranim uzorcima, korištene metode za određivanje antioksidacijskog djelovanja uključuju FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), DPPH (eng. *DPPH free radical scavenging*) te ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) metodu. Dobiveni rezultati ukazuju na dobra antioksidacijska svojstva svih testiranih ekstrakata kupine gdje se posebno ističe ekstrakt lista kupine s najvećom antioksidacijskim potencijalom.

**Ključne riječi:** kupina, fenoli, antioksidacijska aktivnost, nusproizvodi

**Rad sadrži:** 32 stranice, 13 slika, 4 tablice, 41 literaturni izvor

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc dr. sc. Miće Jakić - predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat - član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - član-mentor

**Datum obrane:** 13. listopada 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Graduate study of Food Technology**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6, December 15 and 16, 2020.

**Mentor:** Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

**Technical assistance:** PhD. Student, Martina Čagalj, MSc in Marine Fishery

### ANTIOXIDANT POTENTIAL OF BLACKBERRIES

Tonka Mirjana Rašić, 15

**Abstract:** Free radicals and other reactive species can cause oxidation and biomolecular damage when oxidative species exceed the body's antioxidant defenses, resulting in oxidative stress. This is associated with aging and the development of diseases/conditions such as cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, diabetes and inflammation. To prevent or slow down oxidative stress caused by free radicals, sufficient amounts of antioxidants should be ingested. Fruits and vegetables contain a wide range of antioxidant compounds (phytochemicals) that can help protect cellular systems from oxidative damage and reduce the risk of chronic diseases. Numerous studies that describe the antioxidant effects of berries could be found. This effect is primarily attributed to phenolic compounds, mainly flavonoids and anthocyanins. In this paper, the antioxidant potential of blackberry juice and extracts, as well as extracts of blackberry leaves and juice by-products was investigated. Besides the total phenol content, samples were tested via FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), DPPH (*DPPH free radical scavenging*) and ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) antioxidant assays. The obtained results indicate good antioxidant properties of all tested blackberry extracts, however the blackberry leaf extract stand out with the highest antioxidant potential.

**Keywords:** blackberry, phenols, antioxidant activity, by-products

**Thesis contains:** 32 pages, 13 figures, 4 tables, 41 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ph. D. Miće Jakić, Assistant Professor – chair person
2. Ph. D. Vida Simat, Associate Professor - member
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor - supervisor

**Defence date:** 13th October 2021

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Diplomski rad izrađen je u Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko- tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza, u razdoblju od travnja do rujna 2021. godine.*

*Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood (Reference Number:1467; 2019-SECTION2-4).*



## **ZAHVALA**

*Najveće hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na izuzetnoj susretljivosti, danim savjetima, idejama, i vremenu koje je pružila prilikom izrade ovog rada. Također zahvaljujem Martini Čagalj na pomoći pri provedbi eksperimentalnog djela rada. Veliko hvala i povjerenstvu koje je izdvojilo vrijeme za pregled rada i ukazalo na pogreške.*

*Od srca hvala mojoj obitelji, mami, tati i sestrama koji su me uvijek podržavali i upućivali na pravi put.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj mami Ani bez koje sve dosad postignuto ne bi bilo moguće.*

*Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama bez kojih cijeli ovaj period studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.*

*I na kraju, hvala mom Anti na razumijevanju, strpljenju i pomoći u trenutcima kad se sve činilo nemogućim.*

**HVALA SVIMA !**

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada bio je ispitati antioksidacijski potencijal soka te ekstrakata ploda, lista i nusproizvoda kupine korištenjem nekoliko spektrofotometrijskih metoda za određivanje antioksidacijskog potencijala koje uključuju FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), DPPH uklanjanje slobodnih radikala (eng. *DPPH free radical scavenging*) te ORAC metodu (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*). Nakon analize dobivenih rezultata i usporedbe analiziranih uzoraka donijeti zaključke o njenom antioksidacijskom potencijalu.

## SAŽETAK

Slobodni radikali i druge reaktivne vrste mogu prouzročiti oksidaciju i biomolekularna oštećenja kada oksidacijske vrste dosegnu antioksidativnu obranu organizma, što rezultira oksidativnim stresom. To je povezano sa starenjem i razvojem patologija kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativni poremećaji, dijabetes i upale. Da bi se spriječio ili usporio oksidativni stres izazvan slobodnim radikalima, treba unositi dovoljne količine antioksidansa. Voće i povrće sadrži široku paletu antioksidativnih spojeva (fitokemikalija) koji mogu pomoći u zaštiti staničnih sustava od oksidacijskih oštećenja i smanjiti rizik od kroničnih bolesti. O antioksidativnim učincima bobičastog voća mogu se pronaći brojna istraživanja. Antioksidacijski učinak bobičastog voća u prvom se redu pripisuje fenolnim spojevima, uglavnom flavonoidima i antocijanima. U ovom radu ispitan je antioksidacijski potencijal soka te ekstrakata ploda kupine, lista kupine i nusproizvoda nastalog pri proizvodnji soka. Uz metodu određivanja ukupnog udjela fenola u testiranim uzorcima, korištene metode za određivanje antioksidacijskog djelovanja uključuju FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power*), DPPH (eng. *DPPH free radical scavenging*) te ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) metodu. Dobiveni rezultati ukazuju na dobra antioksidacijska svojstva svih testiranih ekstrakata kupine gdje se posebno ističe ekstrakt lista kupine s najvećom antioksidacijskim potencijalom.

**Ključne riječi:** kupina, fenoli, antioksidacijska aktivnost, nusproizvodi

## **SUMMARY**

Free radicals and other reactive species can cause oxidation and biomolecular damage when oxidative species exceed the body's antioxidant defenses, resulting in oxidative stress. This is associated with aging and the development of diseases/conditions such as cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, diabetes and inflammation. To prevent or slow down oxidative stress caused by free radicals, sufficient amounts of antioxidants should be ingested. Fruits and vegetables contain a wide range of antioxidant compounds (phytochemicals) that can help protect cellular systems from oxidative damage and reduce the risk of chronic diseases. Numerous studies that describe the antioxidant effects of berries could be found. This effect is primarily attributed to phenolic compounds, mainly flavonoids and anthocyanins. In this paper, the antioxidant potential of blackberry juice and extracts, as well as extracts of blackberry leaves and juice by-products was investigated. Besides the total phenol content, samples were tested via FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), DPPH (*DPPH free radical scavenging*) and ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) antioxidant assays. The obtained results indicate good antioxidant properties of all tested blackberry extracts, however the blackberry leaf extract stand out with the highest antioxidant potential.

**Keywords:** blackberry, phenols, antioxidant activity, food-byproducts

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| UVOD.....   | 1  |
| 1. OPĆI DIO .....   | 2  |
| 1.1. Rod <i>Rubus</i> .....                                 | 2  |
| 1.1.1. <i>Rubus fruticosus</i> L. ....                      | 3  |
| 1.2. Kemijski sastav kupine .....                           | 4  |
| 1.2.1. Šećeri i organske kiseline .....                     | 6  |
| 1.2.2. Antocijani .....                                     | 7  |
| 1.2.3. Ne-antocijanidni fenolni monomeri .....              | 8  |
| 1.2.4. Fenolni polimeri .....                               | 8  |
| 1.2.5. Dodatne kvalitetne komponente .....                  | 9  |
| 1.3. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti .....    | 10 |
| 1.3.1. Kemijske metode .....                                | 10 |
| 1.3.1.1. Metode bazirane na HAT mehanizmu .....             | 13 |
| 1.3.1.1.1. ORAC metoda.....                                 | 13 |
| 1.3.1.2. Metode bazirane na ET mehanizmu .....              | 14 |
| 1.3.1.2.1. FRAP metoda.....                                 | 15 |
| 1.3.1.2.2. Ukupni fenoli Folin Ciocalteu.....               | 16 |
| 1.3.1.2.3. DPPH metoda.....                                 | 17 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO .....                                | 19 |
| 2.1. Biljni materijal .....                                 | 19 |
| 2.2. Reagensi i uređaji .....                               | 20 |
| 2.3. Metoda određivanja ukupnih fenola.....                 | 20 |
| 2.4. FRAP metoda .....                                      | 21 |
| 2.5. DPPH metoda.....                                       | 22 |
| 2.6. ORAC metoda.....                                       | 23 |
| 3. REZULTATI .....  | 24 |
| 3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola .....             | 24 |
| 3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti..... | 24 |
| 4. RASPRAVA .....   | 26 |
| 5. ZAKLJUČAK.....   | 28 |
| 6. LITERATURA .....   | 29 |

## UVOD

Hrana biljnog podrijetla (voće, bilje, začini, povrće, žitarice ...) zauzima važan položaj u ekonomskom, kulturnom i zdravstvenom sustavu razvijenih zemalja i zemalja u razvoju zbog dokazanih zdravstvenih tvrdnji i učinaka na imunitet. Redovita konzumacija voća, začina, orašastih plodova, mahunarki, povrća i žitarica od vitalnog je značaja za uravnoteženu prehranu i povezana je sa smanjenim rizikom od raznih bolesti poput upala, artritisa, raka, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti i starenja.

*Rubus fruticosus* L. (*Rosaceae*) grm je poznat po svom plodu, zvanom kupina, kojim se globalno trguje zbog ugodnog okusa i hranjive vrijednosti. Vjeruje se da grm potječe iz Armenije, a danas je distribuiran Europi, Aziji, Oceaniji te Sjevernoj i Južnoj Americi. Porodica Rosaceae 19. je najveća obitelj biljaka, a rod *Rubus* predstavlja najveći rod ove porodice.

Ovo se voće konzumira svježe ili prerađuje za proizvodnju prehrambenih proizvoda poput marmelade, vina, čaja, sladoleda, slastica, želea bez sjemenki i pekarskih proizvoda. Izolirani pigment iz voća koristi se kao prirodno bojilo u pečenim proizvodima, želeima, žvakaćim gumama, voćnim vinima i pićima. Kupine se smatraju neophodnim komponentama zdrave prehrane budući da pružajući širok spektar tvari poput prehrambenih vlakana, minerala, vitamina, drugih esencijalnih hranjivih tvari i fitokemikalija, posebno polifenola (uglavnom elagitanina i antocijana). Uzimajući u obzir da su bobice bogat izvor polifenolnih spojeva, ovo je voće prepoznato s potencijalnim blagodatima za ljudsko zdravlje, uglavnom zahvaljujući antioksidativnim i protuupalnim svojstvima tih spojeva.

Svrha ovog rada je ispitati antioksidacijski potencijal soka i ekstrakata ploda kupine te lišća i nusproizvoda koji ostaju nakon prešanja soka korištenjem različitih spektrofotometrijskih metoda za određivanje antioksidacijskog potencijala s ciljem određivanja dijela kupine koji nosi najveći antioksidacijski potencijal.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Rod *Rubus*

Rod *Rubus* obuhvaća nekoliko vrsta bobica i najveći je rod obitelji Rosaceae. Vrste ovog roda uzgajaju se stoljećima zbog njihovih plodova; međutim, pripitomljenih je vrsta malo.

Tablica 1. Klasifikacija roda *Rubus* [1,2]

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>Carstvo</b>     | Plantae (biljke)                                 |
| <b>Podcarstvo</b>  | Tracheophyta (vaskularne biljke)                 |
| <b>Odjeljak</b>    | Magnoliophyta (Spermatophyta - sjemenjače)       |
| <b>Pododjeljak</b> | Magnoliophytina (Angiospermae – kritosjemenjače) |
| <b>Razred</b>      | Magnoliopsida (Dycotyledonae - dvosupnice)       |
| <b>Podrazred</b>   | Rosidae  |
| <b>Red</b>         | Rosales  |
| <b>Porodica</b>    | Rosaceae   |
| <b>Potporodica</b> | Rosoideae  |
| <b>Rod</b>         | <i>Rubus</i>                                     |

Porodica Rosaceae obuhvaća oko 115 rodova i više od 3000 vrsta. Ona se dalje dijeli na potporodice gdje je najvažnija potporodica Rosoideae unutar koje spada rod *Rubus* koji obuhvaća oko 1550 različitih vrsta [2].

Neke od vrsta koje nalazimo u rodu *Rubus* su *Rubus aciodontus*, *Rubus acutipetalus*, *Rubus dunensis*, *Rubus ebudensis*, *Rubus echinosepalus*, *Rubus egregius*, *Rubus eifeliensis*, *Rubus fasciculatus*, *Rubus fruticosus*, *Rubus festivus*, *Rubus macrostachys*, *Rubus macrocalyx*, *Rubus macgregorii*, *Rubus megalococcus*, *Rubus pseudopsis*, *Rubus pulcher*, *Rubus putnei*, *Rubus rosellus*, *Rubus rubriflorus*, *Rubus rudis*, *Rubus supinus*, *Rubus subvillosus*, *Rubus tarnensis*, *Rubus vitifolius* i druge [2].

Za potrebe ovog rada odabrana je vrsta *Rubus fruticosus* odnosno obična ili europska kupina.

### 1.1.1. *Rubus fruticosus* L.

*Rubus fruticosus* L. je poluprostrani do gotovo uspravni, višegodišnji listopadni bodljikavi grm sa stabljikom koja brzo raste do 3 m. Ova grmolika biljka je trnovita, ali neke uzgajane sorte nemaju trnje. *R. fruticosus* je grm poznat po plodu koji se naziva kupina. Plod ima ljekovitu, kozmetičku i hranjivu vrijednost. Koncentriran je izvor vrijednih hranjivih tvari, kao i bioaktivnih sastojaka čime se ističe njegova važnost kao funkcionalne hrane. *R. fruticosus* sadrži vitamine, steroide i lipide u sjemenskom ulju te minerale, flavonoide, glikozide, terpene, kiseline i tanine koji posjeduju različita farmakološka djelovanja kao što su antioksidacijsko, antikancerogeno, protuupalno, antimikrobno i antivirusno. Razni agrogeoklimatski čimbenici poput sorte, okolišnih uvjeta na tom području, primijenjene agronomske prakse, vremena berbe, skladištenja i tehnike prerade nakon berbe utječu na nutritivni sastav ploda kupine [3].

Kupine su višegodišnje (traju tri ili više sezona) biljke [4]. Razlikuju se od neravnih do gotovo uspravnih, raširenih grmova s trnjem i lišćem. Svakog proljeća pupoljci drvenastog korijena proizvode mlade trske koje rastu brzim tempom od gotovo 50–80 mm dnevno [4]. Kategorizirani su u dvije skupine u pogledu granske građe: generativni trs (*floricane*) i vegetativni trs (*primocane*). Vegetativni trsci nastali tijekom prve godine pretvaraju se u generativne trske tijekom druge godine [5]. Biljka cvjeta krajem proljeća i početkom ljeta. Promjer cvijeta je oko 2-3 cm s blijedo ružičastim ili bijelim laticama. Cvijet ima više prašnika. Nakon opadanja latica, plod razvija nakupinu zasebnih jedinica koje su u početku zelene, a kasnije sazrijevanjem postaju crvene do crne boje.

Boja voća i voćnog soka važan je parametar s komercijalne točke gledišta jer potrošači ocjenjuju proizvod ovisno o njegovom vizualnom izgledu. Boja ploda kupine i njenog soka ovisi o prirodnim pigmentima koji su u njemu prisutni, što pak ovisi o mnogim čimbenicima kao što su sorta koja se analizira, agronomski postupci korišteni u uzgoju, geološki i klimatski uvjeti područja s kojeg se sakuplja voće, primijenjeni uvjeti skladištenja nakon berbe te enzimsko aktivnost i mikrobiološka kontaminacija [3].





Slika 1. Izgled *Rubus fruticosus* L. [2]

## 1.2. Kemijski sastav kupine

Kvaliteta bobičastog voća usko je povezana s njegovom proizvodnjom primarnih i sekundarnih metabolita. Metaboliti kupine nastavljaju se podvrgavati anabolizmu i/ili katabolizmu u plodu do berbe, a one komponente koje ostaju i ne razgrađuju se do trenutka kada voće (ili voćni proizvod) dođu do potrošača, određuju kvalitetu plodova kupine. Primarni i sekundarni sastav metabolita kupine definira njezin karakterističan izgled, okus i teksturu. Mnoge potencijalne zdravstvene koristi od konzumiranja kupine ili proizvoda od kupine pripisuju se njihovim metabolitima. Metaboliti također izravno i neizravno utječu na režime prerade, rok trajanja i dopadljivost potrošača. Kupine sadrže prehrambena vlakna, vitamin C (askorbinsku kiselinu), vitamin A, vitamin E, kalij i kalcij, zajedno s fenolnim metabolitima koji su izvor mogućih zdravstvenih koristi [6]. Plod kupine bogat je fenolnim spojevima kao što su fenolne kiseline (elaginska kiselina i tanini koji se mogu hidrolizirati - derivati elaginske kiseline), flavonoidi (flavan-3 oli i njihovi oligomeri - uglavnom dimeri, kvercetin) i antocijani (cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonil glukozid). Elagitanini i cijanidin-3-glukozid glavni su fenolni spojevi

u kupini. Hidroksicinaminske kiseline sporedni su spojevi i nalaze se kao esteri ferulne, kava i *p*-kumarinske kiseline [7].

Antocijanin koji prevladava u mnogim vrstama kupine je pelargonidin-glukozid [8]. Prisustvo navedenog antocijanina dokazali su u nekoliko sorti: *Black Satin*, *Čačanska Bestrna*, *Chester Thornless*, *Thornless Evergreen*, *Loch Ness* i *Thornfree* [8], dok u istraživanju koje su proveli Wrolstad i sur. (2010.) nije pronađen pelargonidin-glukozid kod identičnih sorti [9]. Koncentracija antocijana u kupini raste sa zrelošću ploda [10,11]. Iako je tamnije voće pokazatelj zrelosti, očekuju se izmjene izgleda nakon obrade. Zamrzavanje, odmrzavanje ili skladištenje uzrokuju vizualne promijene boje od crne do nijansi crvene, žute ili plave što je posljedica neznatnih promjena pH i razgradnje askorbinske kiseline, antocijana i slično [8,12]. Na boju koja potječe od antocijana utječu i fizički oblik vode (tekućina naspram leda) te kemijsko stanje samog voća [8].

Zbog dokazanih dobrobiti redovite konzumacije voća i povrća na ljudsko zdravlje te borbi protiv metaboličkih poremećaja i kroničnih bolesti konzumacija voća povećala se na globalnoj razini. Zdravstvene prednosti voća i voćnih proizvoda posljedica su niskog sadržaja kalorija i masti, te većeg unosa vitamina, minerala, vlakana i jednostavnih šećera kao i prisutnosti različitih bioaktivnih sastojaka. Prehrambeni profil kupine prikazan je u tablici 2. [13]

Tablica 2. Nutritivna vrijednost kupine na 100 grama [14]

| KOMPONENTE           | NUTRITIVNA VRIJEDNOST | POSTOTAK PDU (%) |
|----------------------|-----------------------|------------------|
| Energija             | 43 Kcal               | 2                |
| Ugljikohidrati       | 9,61 g                | 7                |
| Ukupne masti         | 0,49 g                | 2                |
| Proteini             | 1,39 g                | 2                |
| Kolesterol           | 0 mg                  | 0                |
| Folati               | 25 µg                 | 6                |
| Piridoksin           | 0,030 mg              | 2                |
| Niacin               | 0,646 mg              | 4                |
| Pantotenska kiselina | 0,276 mg              | 5,5              |
| Tiamin               | 0,020 IU              | 2                |
| Vitamin C            | 21 mg                 | 35               |

|                    |          |      |
|--------------------|----------|------|
| Vitamin A          | 214 IU   | 7    |
| Vitamin K          | 19,8 µg  | 16,5 |
| Vitamin E          | 1,17 mg  | 8    |
| Kalij              | 162 mg   | 3    |
| Kalcij             | 29 mg    | 3    |
| Natrij             | 1 mg     | 0    |
| Magnezij           | 20 mg    | 5    |
| Bakar              | 165 µg   | 18   |
| Željezo            | 0,62 mg  | 8    |
| Cink               | 0,53 mg  | 5    |
| Mangan             | 0,646 mg | 3    |
| Selen              | 0,4 µg   | 1    |
| α- karoten         | 0 µg     | 0    |
| β-karoten          | 128 µg   | --   |
| Lutein- zeaksantin | 118 µg   | --   |

PDU- preporučeni dnevni unos; IU- *International unit*- međunarodno prihvaćena količina tvari

### 1.2.1. Šećeri i organske kiseline

Dvije jednostavne mjere kvalitete kupine i njenih hibrida podrazumijevaju sadržaj šećera i organskih kiselina. Šećeri prisutni u plodovima kupine su fruktoza, glukoza, saharoza i povremeno izuzetno niske razine sorbitola [9,15,16]. Minimalne koncentracije sorbitola (šećernog alkohola) u prerađenim proizvodima od kupine (npr. sok) vjerojatno potječu od prerađivačkih enzima ili nezrelog voća [9,15]. Budući da se sorbitol rijetko nalazi u zrelim kupinama, dokazivanje šećernog alkohola može biti pokazatelj slučajnog ili namjernog miješanja proizvoda s jeftinijim sokovima ili voćnim koncentratima (od jabuka, krušaka i sl.) [15].

Trpkost kupine nastaje zbog nehlapljivih organskih kiselina, uključujući askorbinsku kiselinu (vitamin C), limunsku kiselinu, izolimunsku kiselinu, laktoizolimunsku kiselinu, jabučnu kiselinu, šikiminsku kiselinu, fumarnu kiselinu i jantarnu kiselinu [16,17]. Laktoizolimunska kiselina može biti koristan marker organskih kiselina za kupine, uz upozorenje da količine u hibridima kupine mogu biti preniske da bi djelovale kao

učinkovit pokazatelj kupine. Famiani i Walker (2009.) istraživali su promjene u primarnim metabolitima kupine tijekom sazrijevanja plodova, gdje su otkrili da se udio suhe tvari povećava, dok se ukupna titrabilna kiselost smanjila u posljednjoj fazi prije berbe [10].

### 1.2.2. Antocijani

Fenole ploda kupine temeljito su istražili i opisali Lee i sur. (2012.) i Kaume i sur. (2012.). Za razliku od drugog tamno obojenog voća iz roda *Rubus*, pigmenti kupine uglavnom su antocijani na bazi cijanidina [18,19]. Karakteristična crna boja netaknutog svježeg ploda kupine rezultat je koncentracije i vrste antocijana (prirodnih crvenih pigmenta). Budući da boja antocijana ovisi o pH, i najmanja promjena pH pretvara crveni antocijanin unutar kupina u tamnoljubičastu do crnu boju. Međutim, postoje neke rijetke kupine kojima nedostaju antocijani, uključujući *Snowbank* (*Rubus allegheniensis*) i *Clark Gold* (*Rubus trivialis*). Iako su ovi neobični plodovi bijeli do žuti, potrošači gravitiraju komercijalno dostupnim tamnim kupinama za koje se smatra da imaju visoke koncentracije pigmenta [19]. Razine antocijana kupine (28–366 mg/100 g) zapravo su u nižim granicama onoga što se može naći u crnim malinama (39-996 mg/100 g) ili borovnicama (101-400 mg/100 g), ali više od crvenih malina (6-98 mg/100 g) [20,21].

Kupine sadrže acilirane i ne-acilirane antocijane, ali većina je ne-aciliranog oblika. Glavni antocijani koji su pronađeni su cijanidin-glukozid, cijanidin-rutinozid, cijanidin-ksilozid, cijanidin-malonilglukozid i cijanidin-dioksalilglukozid [22]. Iako je u kupinama najzastupljeniji pigment cijanidin-glukozid (44–95% od ukupnog broja), omjeri drugih prisutnih antocijana variraju ovisno o sorti i genotipu. Hibridi kupine sadrže različite antocijaninske profile u odnosu na nehibride. Na primjer, hibridi maline i kupine sadrže cijanidin-soforozid, kakav se nalazi u crvenoj malini, ali ne i u nehibridnim kupinama [9,18].

Profili antocijana, kao i ranije spomenuta prisutnost sorbitola, mogu ukazivati na prijevare u proizvodima na bazi kupine i ne-kupine [15,18,23]. Primjerice, utvrđeno je da liofilizirani prah crne maline, koji se prodaje kao dodatak prehrani, zapravo sadrži prah kupine. Lee [15] je to potvrdio analizom proizvoda u prahu od kupine i crne maline od istog anonimnog dobavljača. Iako su voćni prahovi vizualno slični, oni imaju različite antocijaninske profile.

### 1.2.3. Ne-antocijanidni fenolni monomeri

Ne-antocijanidni fenolni monomeri pronađeni u plodu kupine uključuju fenolne kiseline: elaginska kiselina, galna kiselina, esteri *p*-kumarinske kiseline, kava kiselina, esteri kava kiseline (poput neoklorogenske kiseline), ferulinska kiselina, ferulna kiselina, esteri ferulne kiseline; flavanoli: katehin i epikatehin; i flavonol glikozidi: kvercetin-, kempferol-, izorhamnetin- i miricetin-glikozidi [24] Acilirani flavonol glikozidi također su pronađeni u kupini [8].

Iako je elaginska kiselina glavna fenolna kiselina koja se viđa u kupinama, ona predstavlja jako zahtjevan spoj za analizu, budući da je slabo topljiva u vodi. Njena topljivost se povećava u alkoholu, dok povećanjem pH otopine znatno iznad onoga što se obično nalazi u hrani topljivost je najveća [25].

### 1.2.4. Fenolni polimeri

Kupine i drugo voće iz roda *Rubus* (npr. maline, borovnice) bogat su izvor elagitanina (poznatih i kao hidrolizirani tanini, a razlikuju se od opsežnije proučenih kondenziranih tanina). Glavni nehidrolizirani elagitanini u kupini prepoznati su kao lambertianin C i sanguin H-6 [26]. Kool i sur. (2010.) nisu pronašli lambertianin C u testiranim uzorcima *Boysenberry*, ali su pronašli sanguin H-6 kao primarni elagitanin, zajedno s još tri dodatna elagitanina [27]. Elagitanini su skupina spojeva koju je teško ekstrahirati, odvojiti i identificirati. Pored konvencionalnih izazova u istraživanju prirodno složenih spojeva, rad s njima dodatno je otežan nedostatkom dostupnih čistih komercijalnih standarda te problemima s držanjem ovih spojeva u njihovim prirodnim stanjima [18,26] Pojedini istraživači su prije analize proveli hidrolizu (razgradnju) elagitanina kako bi dobili podjedinice elagitanina (metil galat, derivat elaginske kiseline, elaginsku kiselinu i metil sanguisorboat) sa srednjim stupnjem polimerizacije i na taj način olakšali njihovu identifikaciju [28].

Elagitanini se nalaze u svim frakcijama ploda kupine, ali najviše koncentracije su u frakcijama sjemena [28]. Razine elagitanina mogu se smanjiti tijekom razdoblja sazrijevanja plodova [11]. Također se smanjuju tijekom prerade hrane primjenom visokih temperatura (npr. pasterizacijom), taloženjem otopine i hidrolizom u elaginsku kiselinu [26]. Neka istraživanja su vjerojatno podcijenila elagitanine obzirom da se uočava

nepotpuna ekstrakcija zbog neprikladnih otapala i neoptimiziranih tehnika ekstrakcije. Elagitanini imaju nekoliko uloga unutar biljaka, uključujući zaštitu od patogena i inhibiranje preranog klijanja sjemena. Za ljude su to spojevi na koje se tijekom obrade vina i sokova gleda kao na sedimente i oni mogu doprinijeti zamućenju prehrambenih proizvoda koje nije poželjno [18]. Međutim, ti isti sedimenti (tj. elaginska kiselina i elagitanin) iz otpada nakon prerade predstavljaju potencijalne buduće sastojke za proizvode s dodanom vrijednošću. Iako je doprinos elagitanina kupine još uvijek slabo istražen rad na drvenim taninima (ista fenolna klasa koja se nalazi u kupinama, ali različite vrste elagitanina) pokazuje da njihov doprinos varira od neuočljivog okusa do dodane gorčine i trpkosti, s pragom koncentracije ovisno o svakom ispitivanom spoju [28]. Potrebna su dodatna istraživanja za identifikaciju, kvantifikaciju i senzornu procjenu ove fenolne klase spojeva.

#### **1.2.5. Dodatne kvalitetne komponente**

Ostali kvalitetni sastojci kupine uključuju karotenoide, vitamine, minerale, proteine, vlakna te spojeve arome. Spojevi arome dokazani u kupinama su esteri (etilacetat), alifatski alkoholi (heptanol, heksenol, heksanol i oktanol), terpeni (karveol), aldehidi (heksanal, heksenal i benzaldehid) i ketoni (heptanon). Karotenoidi ploda kupine su lutein,  $\beta$ -karoten, zeaksantin i  $\beta$ -kriptoksantin. Potrebno je provesti dodatna istraživanja s ciljem povećanja kvalitete komponenata navedenih u ovom radu. Trenutno dostupne informacije o iskorištenju nusproizvoda kupine koji se prerađuju u hranu uključuju proizvode poput pogačica od soka kupine i ulje sjemenki kupine te čine dobar izvor vitamina E [29].

### **1.3. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti**

Antioksidans je molekula koja inhibira oksidaciju ostalih molekula. Oksidacija je kemijska reakcija koja prenosi elektron ili vodik iz tvari u oksidirajuće sredstvo. Reakcije oksidacije mogu proizvesti slobodne radikale. Nastali radikali mogu započeti lančane reakcije, a kada se lančane reakcije pojave u stanici, mogu prouzročiti oštećenje ili smrt stanice. Antioksidansi prekidaju ove lančane reakcije uklanjanjem međuprodukata slobodnih radikala i inhibiraju druge oksidacijske reakcije. To čine tako što se oksidiraju. Antioksidansi su često reducirajući agensi poput tiola, askorbinske kiseline ili polifenola [31].

#### **1.3.1. Kemijske metode**

Kemijske metode određivanja antioksidacijske aktivnosti su brze, jednostavne i široko rasprostranjene u procjeni novih antioksidacijskih sastavnica. Na temelju načina djelovanja, metode određivanja antioksidacijske aktivnosti mogu se klasificirati u dvije glavne skupine, metode bazirane na prijenosu atoma vodika (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i metode bazirane na prijenosu jednog elektrona (*Electron Transfer*, ET). Tablica 3 prikazuje HAT i ET metode, dok su u tablici 4 navedene kategorije metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 3. HAT i ET metode koje se koriste za procjenu antioksidacijske aktivnosti [31]

| <b>Metode bazirane na HAT mehanizmu</b>   | <b>Metode bazirane na ET mehanizmu</b>  |
|---|---|
| Kapacitet absorpcije radikala kisika ( <i>Oxygen radical absorbance capacity, ORAC</i> )                                  | Antioksidacijski kapacitet redukcije bakra ( <i>Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC</i> )                                    |
| Kapacitet inhibicije peroksidacije lipida ( <i>Lipid peroxidation inhibition capacity, LPIC</i> )                         | Antioksidacijski kapacitet dekolorizacije troloks ekvivalenta ( <i>Trolox equivalent antioxidant capacity Decolourization, TEAC</i> ) |
| Ukupni parametar antioksidacijskog „zarobljavanja“ radikala ( <i>Total radical trapping antioxidant parameter, TRAP</i> ) | Antioksidacijska moć redukcije feri-iona ( <i>Ferric reducing antioxidant power, FRAP</i> )   |
| Inhibiran unos kisika ( <i>Inhibited oxygen uptake, IOC</i> )   | DPPH uklanjanje slobodnih radikala ( <i>DPPH free radical scavenging</i> )  |
| Metoda izbjeljivanja krocina ( <i>Crocin bleaching nitric oxide radical inhibition Activity</i> )                         | Ukupni fenoli po Folin-Ciocalteu  |
| ABTS radikalno uklanjanje ( <i>ABTS radical scavenging</i> )  | N, N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD)   |

\*HAT (eng. *Hydrogen Atom Transfer*)- metode bazirane na prijenosu atoma vodika

\*ET (eng. *Electron Transfer*)- metode bazirane na prijenosu jednog elektrona

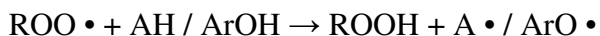


Tablica 4. Kategorije metoda mjerenja antioksidativne aktivnosti [32]

| Vrsta metode                  | Princip rada   | Određivanje završne točke   |
|-------------------------------|--|---|
| <b>Spektrometrija</b>         |  |   |
| DPPH                          | Reakcija antioksidansa s organskim radikalom   | Kolorimetrija   |
| ABTS                          | Reakcija antioksidansa s organskim kationskim radikalom  | Kolorimetrija   |
| CUPRAC                        | Redukcija Cu(II) u Cu(I) pomoću antioksidansa  | Kolorimetrija   |
| FRAP                          | Reakcija antioksidansa s Fe(III) kompleksom  | Kolorimetrija   |
| PFRAP                         | Reakcija kalijeva fericijanida s antioksidastom i Fe <sup>2+</sup>   | Kolorimetrija   |
| ORAC                          | Reakcija antioksidansa s peroksidnim radikalom   | Gubitak fluorescencije fluorescina  |
| HORAC                         | Vežanje antioksidansa na OH radikale dobivene iz Co(II) (Fenton reakcija)  | Gubitak fluorescencije fluorescina  |
| TRAP                          | Izbacivanje luminol-derivirane radikale pomoću antioksidansa   | Kemiluminiscencijski signal   |
| <b>Elektrokemijske metode</b> |  |   |
| Ciklička voltometrija         | Potencijal radne elektrode pokazuje linearnost od početne do konačne vrijednosti, zabilježen je trenutni intenzitet struje | Mjerenje intenziteta katodnog/anodnog pika  |
| Amperometrija                 | Potencijal radne elektrode je na fiksnoj vrijednosti u odnosu na referentnu elektrodu                                      | Mjerenje intenziteta struje   |
| Biamperometrija               | Reakcija analita s oksidiranim oblikom redoks para   | Mjerenje struje između dvije identične radne elektrode                                |
| <b>Kromatografija</b>         |  |   |
| GC                            | Odvajanje spojeva iz smjese između stacionarne faze i plinovite mobilne faze   | Detekcija toplinske vodljivosti   |
| HPLC                          | Odvajanje spojeva iz smjese između čvrste stacionarne i mobilne faze pri visokoj brzini protoka i tlaku mobilne faze       | UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska detekcija |

### 1.3.1.1. Metode bazirane na HAT mehanizmu

Metode temeljene na HAT mehanizmu mjere sposobnost antioksidansa da se veže na slobodne radikale (općenito, peroksidne radikale koji se smatraju biološki relevantnijima) darivanjem H-atoma. HAT mehanizmi antioksidativnog djelovanja u kojima se atom vodika (H) fenola (Ar – OH) prenosi u ROO • radikal mogu se sažeti reakcijom

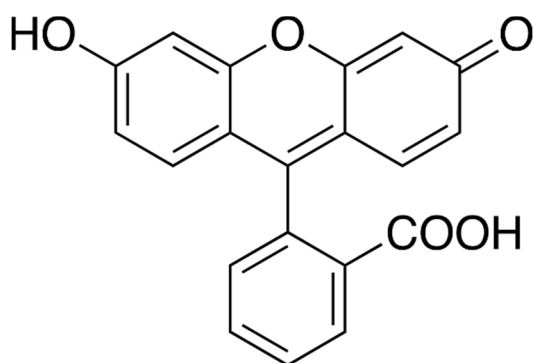


Pri čemu je ariloksi radikal (ArO •) nastao reakcijom antioksidativnog fenola s peroksidnim radikalom rezonancijski stabilan. Vrste AH i ArOH označavaju zaštićene biomolekule, odnosno molekule koje sadrže fenolne antioksidanse i doniraju vodik u reakciji s peroksidnim radikalom. Učinkoviti fenolni antioksidansi trebaju brže reagirati od biomolekula sa slobodnim radikalima kako bi ih zaštitili od oksidacije. Budući da u metodama baziranim na HAT mehanizmu fluorescentna proba i antioksidansi reagiraju s ROO •, antioksidativno djelovanje može se odrediti mjerenjem fluorescencijskog raspada krivulje uzorka u odsutnosti i prisutnosti antioksidansa, što se mjeri spektrofluorometrijski.

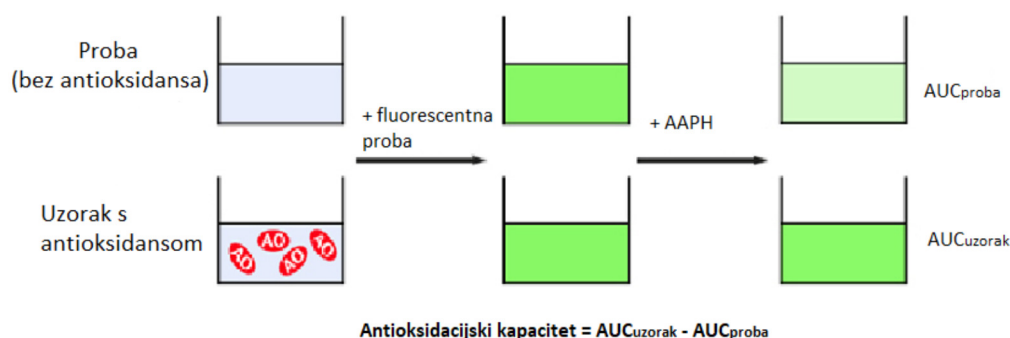
#### 1.3.1.1.1. ORAC metoda

ORAC metoda je nedvojbeno najprihvaćeniji i najtočniji pokazatelj antioksidacijskog statusa, uglavnom zato što se temelji na mjerenjima fluorescencije, a ne apsorpcije. To povećava osjetljivost i tako omogućuje znatno niži molarni omjer uzorka antioksidansa i reagensa, čime se smanjuje vjerojatnost križnih reakcija između uzorka i reagensa. ORAC metoda temelji se na inhibiciji oksidacije izazvane peroksilnim radikalima pokrenutom toplinskom razgradnjom azo spojeva kao što je AAPH. Analizom se mjeri gubitak fluorescencije fluoresceina (slika 2. prikazuje strukturu fluoresceina) tijekom vremena zbog stvaranja peroksil-radikala razgradnjom inicijatora bis azida, AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid, dihidroklorid ) na 37 °C. Smanjenje fluorescencije prati se optički, a antioksidativna aktivnost određuje se usporavanjem gubitka fluorescencije u prisutnosti antioksidansa. Trolox [6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina], analog vitamina E topiv u vodi, služi kao pozitivna kontrola koja inhibira propadanje fluoresceina ovisno o dozi. Peroksilni radikal može oksidirati fluorescein (3', 6'- dihidroksi-spiro [izobenzofuran-1 [3H], 9' [9H] - ksanten] -3-on) dajući proizvod

bez fluorescencije. Antioksidansi potiskuju ovu reakciju mehanizmom prijenosa vodikovih atoma, inhibirajući oksidativnu razgradnju fluoresceinskog signala. Signal fluorescencije mjeri se tijekom određenog vremena pobuđivanjem na valnoj duljini od 485 nm te emisijom na 538 nm. Koncentracija antioksidansa u ispitivanom uzorku proporcionalna je intenzitetu fluorescencije tijekom ispitivanja i procjenjuje se usporedbom površine ispod krivulje uzorka s površinom ispod baždarne krivulje poznatog antioksidansa, troloksa. [33]



Slika 2. Struktura fluoresceina [34]



Slika 3. Shematski prikaz ORAC metode [35]

### 1.3.1.2. Metode bazirane na ET mehanizmu

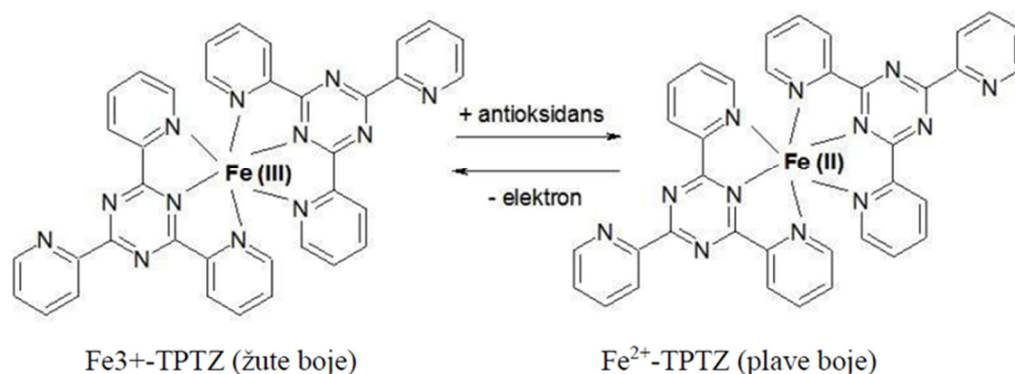
U većini metoda temeljenih na ET mehanizmu, antioksidativno djelovanje simulira se odgovarajućim uzorkom s redoks-potencijalom, odnosno, antioksidansi reagiraju s fluorescentnim ili obojenim uzorkom (oksidacijskim sredstvom) umjesto peroksilnih radikala. Spektrofotometrijske analize na bazi ET mjere sposobnost antioksidansa da

reduciraju oksidans, koji mijenja boju kada se reducira. Stupanj promjene boje (bilo povećanje ili smanjenje apsorbancije na određenoj valnoj duljini) povezan je s koncentracijom antioksidansa u uzorku [30].

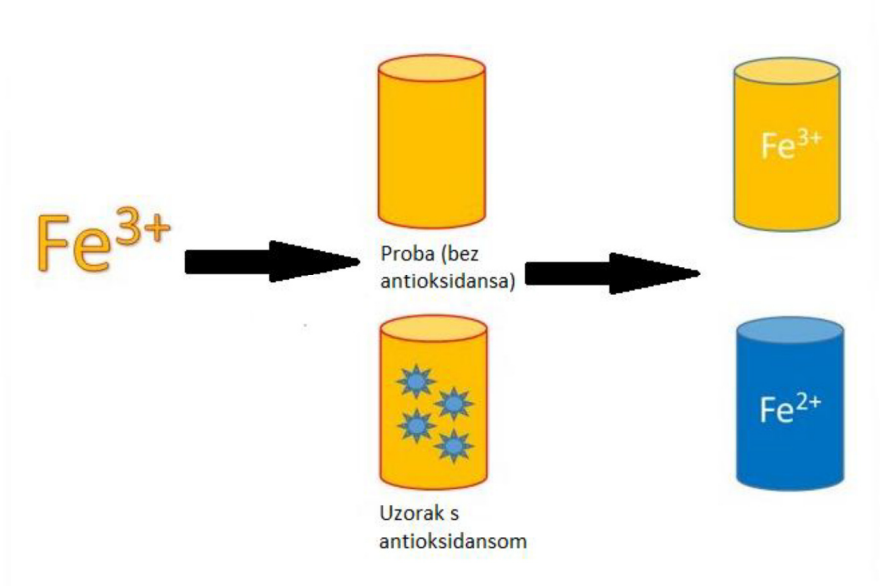
### 1.3.1.2.1. FRAP metoda

FRAP metoda koristi antioksidanse kao reduktore u redoks-kolorimetrijskoj metodi, koristeći lako reducirajući oksidacijski sustav prisutan u stehiometrijskom suvišku. Pri niskom pH (3,6), redukcija kompleksa željezovog tripiridil triazina (željezo2,4,6-tripiridil-s-triazin, TPTZ) u željezni oblik (koji ima intenzivnu plavu boju) može se pratiti mjerenjem promjene apsorpcije na 593 nm kako je prikazano na slici 3.

Reakcija je nespecifična, tako da svaki spoj s odgovarajućim redoks potencijalom može dovesti do redukcije Fe III-TPTZ kompleksa. Promjena apsorpcije je stoga izravno povezana s "ukupnom" redukcijskom snagom antioksidansa prisutnih u reakcijskoj smjesi koji doniraju elektrone. Kao referentna otopina koristi se standardna otopina željezovog sulfata, željezovog klorida i/ili troloksa [33].



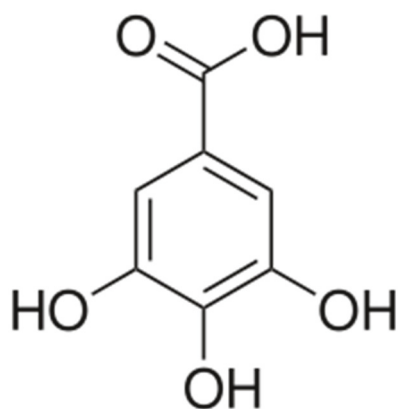
Slika 4. FRAP reakcija



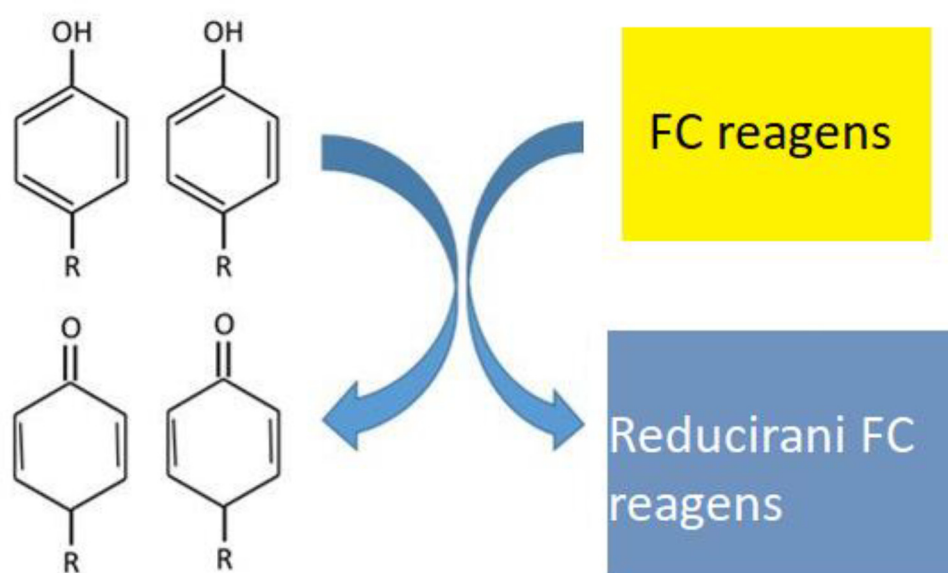
Slika 5. Shematski prikaz FRAP metode [35]

#### 1.3.1.2.2. Ukupni fenoli po Folin Ciocalteu

Kolorimetrijske reakcije naširoko se koriste u UV VIS spektrofotometrijskoj metodi, koja je jednostavna za izvođenje, brza i primjenjiva u rutinskoj laboratorijskoj upotrebi te jeftina. Međutim, važno je da kolorimetrijski test koristi referentnu tvar, tada se ovom metodom mjeri ukupna koncentracija fenolnih hidroksilnih skupina u biljnom ekstraktu. Polifenoli u biljnim ekstraktima reagiraju sa određenim redoks reagensima (Folin-Ciocalteuov reagens) tvoreći plavi kompleks koji se može kvantificirati spektrofotometrom pri 765 nm [36]. Metoda Folin-Ciocalteu daje točne i specifične podatke za nekoliko skupina fenolnih spojeva, jer mnogi spojevi različito mijenjaju boju zbog razlika u jediničnoj masi i kinetici reakcije. Raspravlja se o upotrebi Folin-Ciocalteu reagensa za određivanje polifenola i općenitoj ili specifičnoj vrijednosti metode, jer se neki specifični detalji mogu modificirati [33]. Rezultati Folin-Ciocalteu metode mogu se u različitim istraživanjima izražavati preko različitih standarda, međutim najčešće korišteni standard kod ove metode je galna kiselina.



Slika 6. Galna kiselina [36]



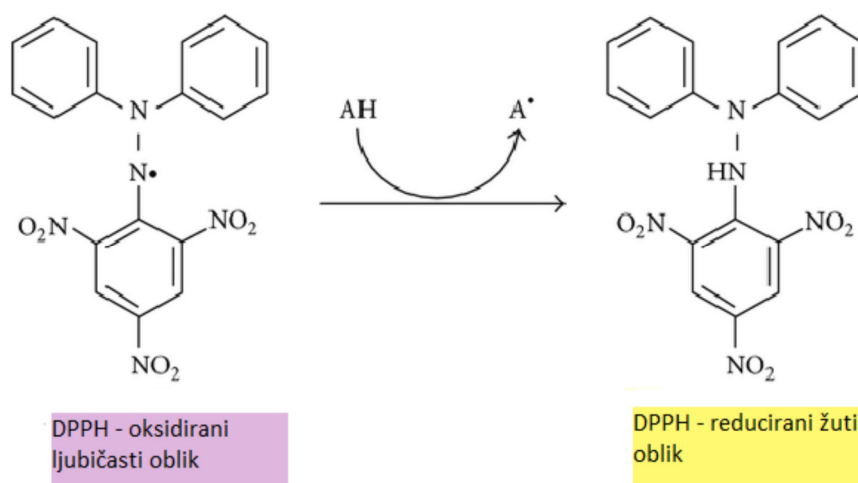
Slika 7. Prikaz redukcije Folin-Ciocalteu reagensa [35]

### 1.3.1.2.3. DPPH metoda

Analiza DPPH popularna je u istraživanjima antioksidansa prirodnih proizvoda. Jedan od razloga je taj što je ova metoda jednostavna i osjetljiva. Metoda se temelji na teoriji da je donor vodika antioksidans. DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) je karakteriziran kao stabilan slobodni radikal zahvaljujući delokalizaciji rezervnog elektrona nad molekulom u cjelini. Delokalizacija daje ljubičastu boju, koja se mjeri na oko 517 nm.

Kad se otopina DPPH pomiješa s otopinom tvari koja može donirati atom vodika, tada nastaje reducirani oblik s gubitkom ljubičaste boje (očekuje se prisutnost blijedo žute boje iz skupine pikrila). Ako se DPPH radikal označi kao  $Z \cdot$  i molekulu donora kao AH, primarna reakcija je  $Z \cdot + AH = ZH + A \cdot$

gdje je ZH reducirani oblik, a  $A \cdot$  je slobodni radikal koji se stvara prvom koraku reakcije. Ovaj slobodni radikal zatim sudjeluje u reakcijama kojima se kontrolira ukupna stehiometrija, odnosno broj molekula DPPH reduciran (dekoloriran) za jednu molekulu reduktanta [38]. Slika 8 prikazuje mehanizam kojim DPPH  $\cdot$  prihvaća vodik iz antioksidansa. DPPH  $\cdot$  jedan je od rijetkih stabilnih i komercijalno dostupnih organskih dušičnih radikala.



Slika 8. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom [35]

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su sok, plod, list te nusproizvod kupine *Rubus fruticosus* L. Plodovi i lišće kupine sakupljeni su u kolovozu 2020 g. na području Mosora. Od jednog dijela plodova pripremljen je sok korištenjem hladne preše a zaostali ostatak pri proizvodnji soka koristio se kao nusproizvod u daljnjoj analizi. Prije samog postupka ekstrakcije lišće, plodovi i nusproizvod su liofilizirani i homogenizirani korištenjem električnog mlinca do finog praha. Potom je 50 g biljnog materijala ekstrahirano s 250 mL 50%- tnog etanola (EtOH). Ekstrakcija je provedena metodom mikrovalne ekstrakcije. Kao optimalni uvjeti za provedbu ekstrakcije određeni su: vrijeme ekstrakcije 5 minuta te snaga mikrovalova od 600W. Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani preko naboranog filter papira i liofizirani.

Masa od 40 mg liofiliziranog ekstrakta otopljena je u 2 mL 50% EtOH i tako pripremljeni uzorci koristili su se za daljnje ispitivanje. Sok kupine analiziran je bez dodatne obrade.



Slika 9. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju [39]



## **2.2. Reagensi i uređaji**

### Reagensi

Sve korištene kemikalije bile su odgovarajuće analitičke čistoće, a proizvođači su im Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka), Fluke (Buchs, Švicarska), Kemika (Zagreb, Hrvatska), Mercka (Darmstadt, Njemačka) i Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska).

### Uređaji

Hladna preša, Hurom H-AA classic, SAD

Mlinac za kavu, Joy Delimano, Hrvatska

Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, Ethos X, Milestone Srl, Italy

Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Kingston, UK

Liofilizator, FreeZone 2,5L, Labconco, Kansas City, SAD

Spektrofotometar: SPECORD 200 Plus, Edition 2010; Analytik Jena AG, Jena, Njemačka

Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise, Tecan Group Ltd, Mannedorf, Švicarska

Tecan BioTek, model: Synergy HTX, Inc., Winooski, VT

Mikrotitarske pločice, nesterilne, Sarsted, Njemačka

## **2.3. Metoda određivanja ukupnih fenola**

Ukupni fenoli u uzorcima soka određeni su spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu.

### Kemikalije:

- Folin-Ciocalteu reagens;
- 20%-tna otopina natrijeva karbonata;
- otopine standarda za određivanje fenola (galna kiselina)

### Postupak:

U kivete je otpipetirano 25  $\mu$ L uzorka, potom dodano 1,5 mL destilirane vode i 125  $\mu$ L reagens Folin-Ciocalteu. Otopina je promiješana i dodano je 375  $\mu$ L 20%-tne otopine natrij karbonata. Na kraju je dodano još 475  $\mu$ L destilirane vode i kivete su ostavljene na sobnoj temperaturi 2 sata u mraku. Nakon toga očitana je vrijednost apsorbancije. Sva

mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Dobiveni rezultati su izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline u litri ekstrakta (mg GAE/L) budući je standardizacija izvršena s galnom kiselinom.

## 2.4. FRAP metoda

### Kemikalije:

- acetatni pufer,  $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$ , pH 3,6
- otopina klorovodične kiseline,  $c(\text{HCl}) = 40 \text{ mmol/L}$
- otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl,  $c(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6) = 10 \text{ mmol/L}$
- otopina  $\text{FeCl}_3$ ,  $c(\text{Fe}^{3+}) = 20 \text{ mmol/L}$
- FRAP reagens se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ i 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3$

### Postupak:

FRAP radna otopina pripremljena je svježe svaki put: 0,3 M acetatni pufer (pH = 3,6), 0,01 M TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) u 0,04 M HCl i 0,02 M  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  pomiješani su u 10: 1: 1 i čuva se dalje od svjetlosti. Nakon pripreme otopine, u jažice mikrotitarskih pločica otpipetira se 300  $\mu\text{L}$  pripremljene FRAP radne otopine i očitava se apsorbancija pri 593 nm. Zatim se doda 10  $\mu\text{L}$  uzorka koji uzrokuje pojavu plavog obojenja te se očitava apsorbancija nakon četiri minute. Razlika između vrijednosti apsorbancije očitane nakon dodatka uzorka i vrijednosti apsorbancije očitane prije dodatka uzorka predstavlja promjenu apsorbancije pomoću koje se računa FRAP vrijednost uzorka. FRAP radna otopina s destiliranom vodom umjesto uzorka korištena je kao slijepa proba. Sva određivanja provedena su u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD u milimolima troloks ekvivalenta (mM TE) budući je standardizacija izvršena s troloksom.

## 2.5. DPPH metoda

### Kemikalije:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)
- 96 %-tni etanol

### Postupak:

Otopina DPPH radikala priprema se otapanjem 4 mg DPPH radikala u 100 mL etanola pri čemu se dobije intenzivno obojena ljubičasta otopina. Radni DPPH pripravlja se razrjeđivanjem otopine DPPH radikala etanolom, sve dok se ne postigne absorbancija otopine  $1,2 \pm 0,05$  pri 492 nm i to neposredno prije mjerenja.

U mikrotitarske pločice se doda 290  $\mu$ L otopine DPPH reagensa nakon čega se očita absorbancija otopine pri 517 nm (AC(0)). Nakon toga se u pločicu doda 10  $\mu$ L uzorka. Nakon jednog sata ponovno se mjeri absorbancija uzorka (AA(t)), a postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema sljedećem izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(AC(0) - AA(t))/AC(0)] \times 100$$

pri čemu je,

**AC(0)** - absorbancija otopine DPPH radikala kod vremena t=0 minuta

**AA(t)** - absorbancija reakcijske smjese nakon nekog vremena t.

Sva mjerenja su urađena u tri ponavljanja, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Dobiveni rezultati su izraženi kao % inhibicije DPPH radikala.

## 2.6. ORAC metoda

### Kemikalije:

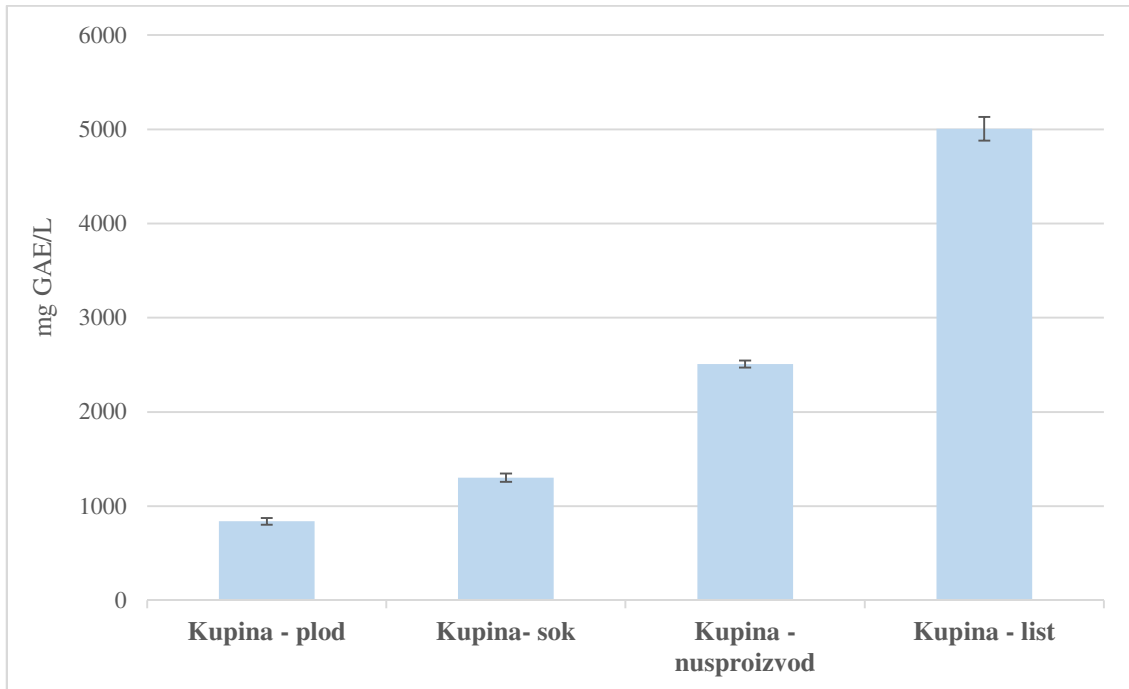
- Fosfatni pufer, pH 7, c = 0,2 M
- Fosfatni pufer, pH 7, c = 0,075 M
- Fluorescein: Stock otopina
- Radna otopina fluoresceina, c=0,08  $\mu$ M
- AAPH
- Otopina standarda - Troloksa

### Postupak:

Mjerenja se provode spektrofluorimetom pri  $\lambda_{\text{eks}} = 485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ . Prije mjerenja uređaj se termostatira na temperaturu od  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  da bi brzina stvaranja radikala bila konstantna. Postupak se provodi tako da se u svaku jažicu mikrotitarske pločice doda 150  $\mu\text{L}$  fluoresceina i 25  $\mu\text{L}$  uzorka (0,075 M fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda Troloksa za izradu baždarnog pravca). Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon pola sata u sve pore mikrotitarske pločice dodaje se 25  $\mu\text{L}$  AAPH te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije. Sva mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Dobiveni rezultati su izraženi u  $\mu\text{M TE}$  budući je standardizacija izvršena s troloksom.

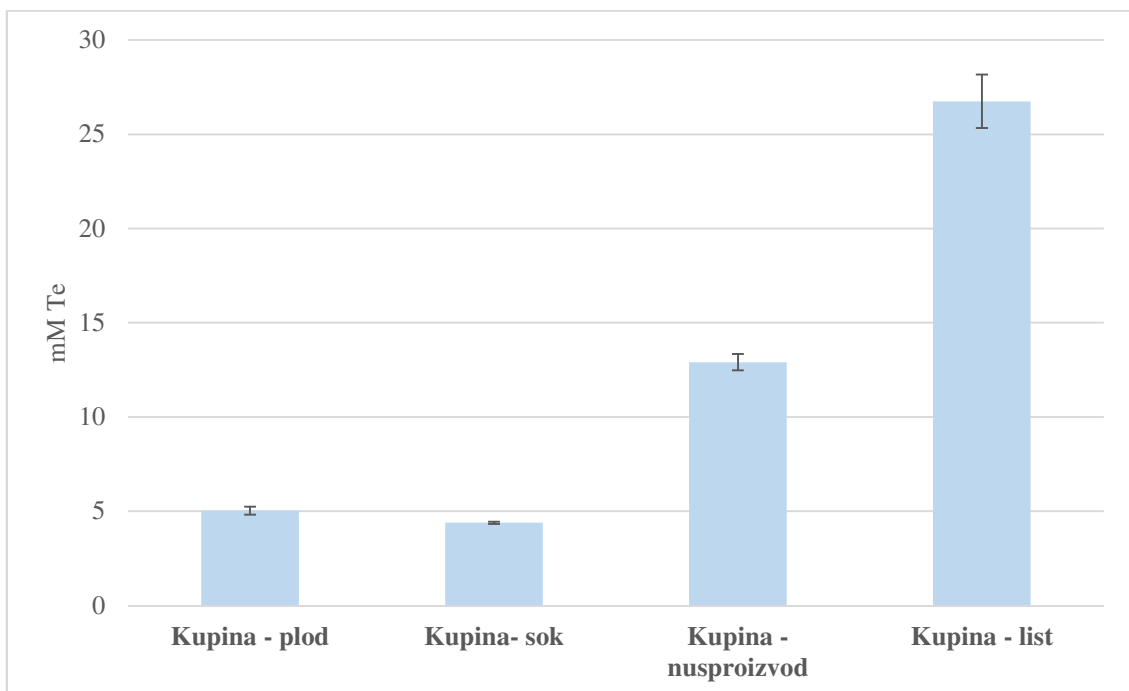
### 3. REZULTATI

#### 3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

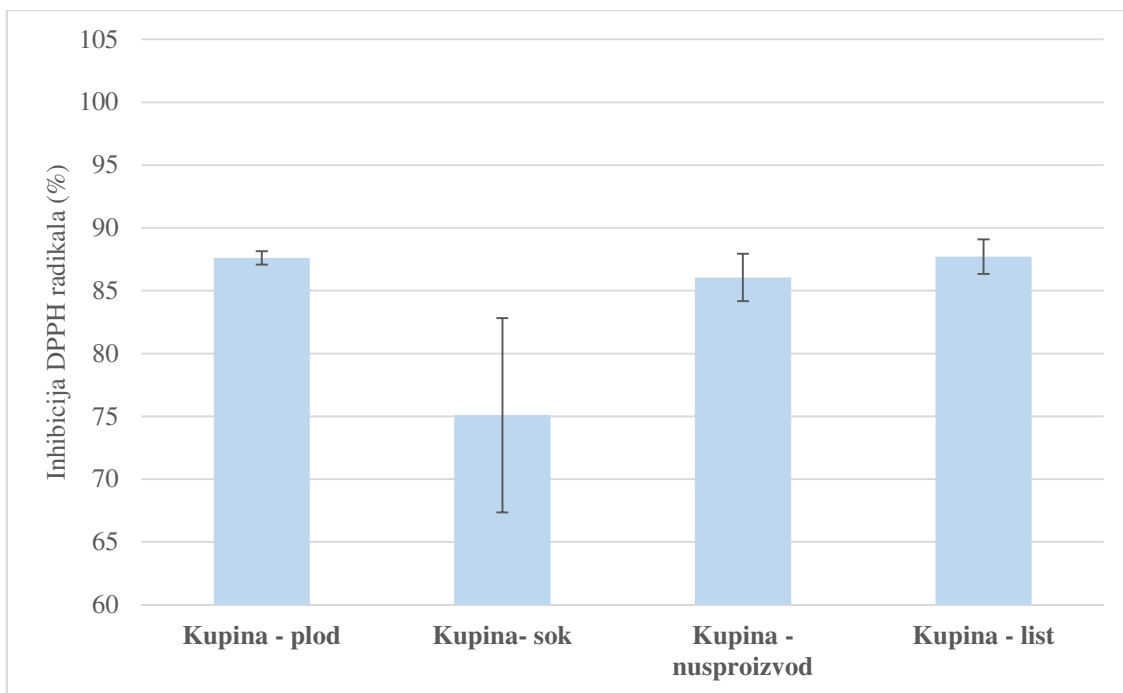


Slika 10. Usporedni prikaz udjela ukupnih fenola u testiranim uzorcima

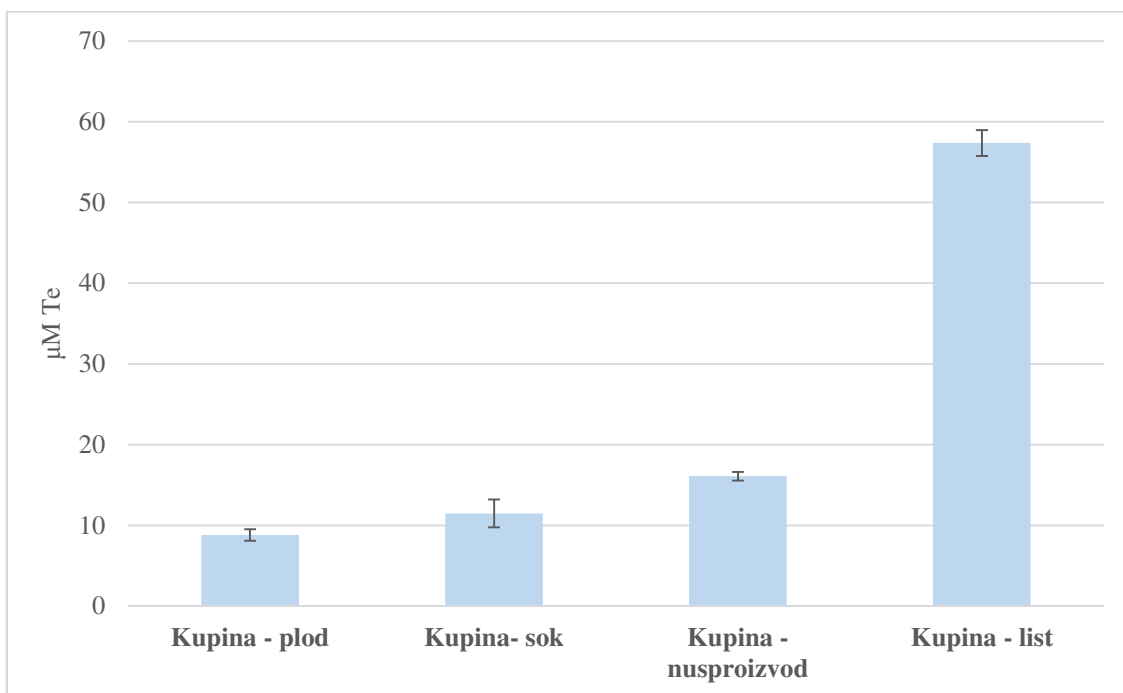
#### 3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti



Slika 11. Rezultati određivanja antioksidacijske sposobnosti određeni FRAP metodom



Slika 12. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta određeni DPPH metodom



Slika 13. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti određeni ORAC metodom

## 4. RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti sadržaj ukupnih fenola te antioksidacijski potencijal soka, ploda, lista i nusproizvoda obične kupine *R. fruticosus* L. koristeći FRAP, DPPH i ORAC metode. Plod *R. fruticosus* prepun je brojnih hranjivih tvari kao što su vitamini, minerali, antioksidansi i prehrambena vlakna koja su važna za ljudsko zdravlje. Potrebno je više rada na identifikaciji i kvantificiranju bioaktivnih sastojaka voća, sjemenki, pulpe i pokožice ovih bobica te je potrebno istražiti njihov utjecaj na ljudsko zdravlje. Iako su različite vrste kemijskih spojeva izolirane i karakterizirane, podaci o bioaktivnosti i mehanizmu djelovanja izoliranih spojeva u *in vivo* uvjetima još uvijek su ograničeni.

Iz grafičkog prikaza sadržaja ukupnih fenola (Slika 10) u testiranim uzorcima možemo uočiti relativno nizak udio ukupnih fenola u plodu kupine (838,89 mg GAE/L) te soku kupine (1302,78 mg GAE/L) u odnosu na list i nusproizvod kupine. Nešto veći sadržaj fenola bio je u nusproizvodu (tri puta veći u usporedbi s plodom) dok je list kupine imao najveći sadržaj fenola. Udio fenola u listu kupine iznosio je 5005,56 mg GAE/L što je približno 6 puta veća vrijednost u odnosu na udio ukupnih fenola u plodu kupine.

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom prikazani su na slici 11 te se uočava povezanost aktivnosti sa sadržajem fenola. Redukcijska sposobnost ploda i soka kupine bila je minimalna i iznosila je 4,38 mM TE za sok te 5,03 mM TE za plod kupine. FRAP vrijednosti nusproizvoda kupine iznosile su 12,91 mM TE dok je list kupine pokazao najjaču redukcijsku sposobnost (26,75 mM TE). Ponovo uočavamo skoro 5,5 puta bolju antioksidacijsku aktivnost lista kupine u odnosu na plod.

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom prikazani su na slici 12, a izraženi su u vidu postotka inhibicije DPPH radikala. Najmanju vrijednost antioksidacijske aktivnosti pokazao je sok kupine gdje je postotak inhibicije DPPH radikala iznosio 75,09%. Eksperimentalno dobivene vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za plod, nusprodukt te list kupine skoro se i ne razlikuju što ukazuje na izuzetno dobar oksidacijski kapacitet ispitivanih uzoraka. Postotak inhibicije DPPH radikala za plod kupine iznosio je 87,60%, za nusprodukt 86,05% te za list 87,72. Iako minimalna razlika, list i dalje pokazuje najbolju antioksidacijsku aktivnost.

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ORAC metodom korišteni su ekstrakti razrijeđeni 1000 puta, a rezultati određivanja prikazani su na slici 13. Rezultati su izraženi u vidu  $\mu\text{M TE}$  te iznose kako slijedi; plod kupine 8,8  $\mu\text{M TE}$ , sok kupine 11,5  $\mu\text{M TE}$ ,

nusprodukt 16,1  $\mu\text{M}$  TE te list kupine 57,4  $\mu\text{M}$  TE. Nedvojbeno je da list kupine i ORAC metodom pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost, u ovom slučaju čak 3,5 puta veću u odnosu na plod kupine.

Bogat kemijski i nutritivnim sastav ovog bobičastog voća ukazuje na brojna pozitivna biološka svojstva i vrlo važnu ulogu u prehrambenoj industriji. Zasižno najvažniji spojevi su antioksidansi čija je uloga zaštita od utjecaja slobodnih radikala. Pregledom znanstvene literature pronađena su brojna istraživanja i radovi kojima je cilj dokazati prisutnost pojedinih spojeva u kupini te njihovo djelovanje i primjenu u prehrambenoj industriji. Kao primjer može se uzeti istraživanje Souzu i sur. (2015) koji su zaključili da svjetlost, kisik, pH, sadržaj šećera te utjecaj metala imaju značajnu ulogu u destabilizaciji antocijana [40]. Kaume i sur. (2012) su objavili rezultate istraživanja o zaštitnom učinku antocijana na krvožilni sustav dijabetičara. Kao posljedica dijabetesa ubrzava se generiranje reaktivnih vrsta kisika i slobodnih radikala. Upravo zbog toga, sposobnost polifenola iz kupine da inhibira slobodne radikale može biti od velike važnosti za minimaliziranje posljedica izazvanih dijabetesom [19]. Još jedno istraživanje na kupini i njenim ekstraktima utvrdilo je antioksidacijsku aktivnost koristeći ORAC metodu pomoću koje je dokazan visok stupanj povezanosti između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenola, antocijana i ukupne kiselosti [41]. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da ekstrakt kupine ima snažno antioksidacijsko, antitumorsko i protuupalno djelovanje te da proizvodi sa dodatkom ekstrakta kupine mogu imati veliki potencijal za liječenje i prevenciju raka te drugih upalnih bolesti.

Nadalje, prema rezultatima istraživanja prikazanim u ovom radu, ekstrakti nusproizvoda kupine su pokazali bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda i soka kupine. Smatra se da nusproizvodi kupine mogu predstavljati bogat izvor biološki aktivnih spojeva. Primjena nusproizvoda prehrambene industrije posljednjih godina postala je iznimno zanimljiva brojnim znanstvenicima i na tu temu svakim danom raste broj istraživanja.

Konačno, može se zaključiti da postoji izražena povezanost između antioksidacijske aktivnosti i fenolnog sadržaja ispitivanih ekstrakata kupine.



## 5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave možemo izvesti slijedeće zaključke:

- Udio ukupnih fenola u testiranim uzorcima kretao se od 838,89 mg GAE/L do 5005,56 mg GAE/L.
- Od ispitivanih uzoraka ploda, soka, nusprodukta te lista kupine, najveći udio ukupnih fenola imao je ekstrakt lista kupine.
- Ekstrakti nusproizvoda kupine su pokazali bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda i soka.
- Najveću antioksidacijsku aktivnost među testiranim uzorcima pokazao je ekstrakt lista kupine.
- Potrebna su dodatna istraživanja o mogućnosti primjene nusproizvoda kupine za dobivanje bioaktivnih komponenti.

## 6. LITERATURA

1. Miličić I. Značaj porodice Rosaceae u poljoprivrednoj proizvodnji Republike Hrvatske. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, 2014.
2. European Environment Agency, <https://eunis.eea.europa.eu/species/180807>
3. Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De Feo V, Jaafar ZE, Moga M. *Rubus Fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules* 2014;19(8):10998-11029.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/molecules190810998>
4. Hummer KE, Janick J. *Rubus* iconography: Antiquity to the renaissance. *Acta Horti* 2007;759:89–105.
5. Eyduran SP, Eyduran E, Khawar KM, Agaoglu YS. Adaptation of eight American blackberry (*Rubus fruticosus* L.) cultivars for Central Anatolia. *Afr. J. Biotech.* 2008;7:2600–2604.
6. Lee J. Blackberry Fruit Quality Components, Composition, and Potential Health Benefits. USDA-ARS-HCRU Worksite, USA, 2017.
7. Vrhovsek U, Giongo L, Mattivi F, Viola R. A survey of ellagitannin content in raspberry and blackberry cultivars grown in Trentino (Italy). *European Food Research and Technology* 2008;226:817–824.
8. Veberic R, Stampar F, Schmitzer V, Cunja V, Zupan A, Koron D, Mikulic-Petkovsek M. Changes in the contents of anthocyanins and other compounds in blackberry fruits due to freezing and long-term frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014;62(29):6926–6935.
9. Fan-Chiang H, Wrolstad RE. Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. *Journal of AOAC International* 2010;93(3):956–965.
10. Famiani F, Walker RP. Changes in abundance of enzymes involved in organic acid, amino acid and sugar metabolism, and photosynthesis during the ripening of blackberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2009;134(2):167–175.
11. Acosta-Montoya A, Vaillant F, Cozzano S, Mertz C, Perez AM, Castro MV. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schldl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry* 2010;119(4):1497–1501.

12. Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(21):6172–6181.
13. Milosevic T, Mratinic E, Milosevic N, Glisic I, Mladenovic J. Segregation of blackberry cultivars based on the fruit physico-Chemical attributes. *Tar. Bil. Der.* 2012;18:100–109.
14. USDA National Nutrient Data Base.  
Dostupno na: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2180>  
Pristupljeno: 16.8.2021.
15. Lee J. Sorbitol, *Rubus* fruit, and misconception. *Food Chemistry* 2015;166:616–622.
16. Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science* 2012;77(10):C1064–C1070.
17. Wrolstad RE, Culbertson JD, Nagaki DA, Madero CF. Sugars and Nonvolatile acids of blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1980;28:553–558.
18. Lee J, Dossett M, Finn CE. *Rubus* fruit phenolic research: the good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry* 2012;130(4):785–796.
19. Kaume L, Howard LR, Devareddy L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012;60(23):5716–5727.
20. Dossett M, Lee J, Finn CE. Anthocyanin content of wild black raspberry germplasm. *Acta Horticulturae* 2012;946:43–47.
21. Scalzo J, Currie A, Stephens J, McGhie T, Alspach P. The anthocyanin composition of difference *Vaccinium*, *Ribes* and *Rubus* genotypes. *Biofactors* 2008;34(1):13–21.
22. Conner AM, Finn CE, McGhie TK, Alspach PA. Genetic and environmental variation in anthocyanins and their relationship to antioxidant activity in blackberry and hybridberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2005;130(5):680–687.
23. Wrolstad RE, Cornwell CJ, Culbertson JD, Reyes FGR. Establishing Criteria for determining the authenticity of fruit juice concentrates. In: Teranishi, R. and Barrera-Benitez, H. (eds.) *Quality of Selected Fruits and Vegetables of North America*, Chapter 7. ACS symposium series 1981;170:77–93.

24. Bilyk A, Sapers GM. Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986;34(4):585–588.
25. Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Ravi Kumar MNV. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;40(1):206–210.
26. Gasperotti M, Masuero D, Vrhovsek U, Guella G, Mattivi F. Profiling and accurate quantification of *Rubus* ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58(8):4602–4616
27. Kool MM, Comeskey DJ, Cooney JM, McGhie TK. Structural identification of the main ellagitannins of a Boysenberry (*Rubus loganbaccus* x *baileyanus* Britt.) extract by LC-ESI-MS/MS, MALDI-TOF-MS and NMR spectroscopy. *Food Chemistry* 2010;119(4):1535–1543.
28. Hager TJ, Howard LR, Liyanage R, Lay JO, Prior RL. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOP-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(3):661–669.
29. Schulz M, Seraglio SKT, Betta FD, Nehring P, Valse AC, Daguer H, Fett R. Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food Research International* 2019.
30. Moharram HA, Youssef MM. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review, *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* 2014;11(1):31-42.
31. Frankel EN, Finley JW. How to standardized the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:4901-4908.
32. Pregiban K. Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, 2017.
33. Gupta D. Methods for Determination of Antioxidant Capacity: A Review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2015;6(2):546-566.
34. <https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>  
Pristupljeno: 17.8.2021.
35. Galušić S. Određivanje antioksidacijske aktivnosti – metode u kojima se primjenjuju kulture stanica. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2020.

36. Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 2013; 18(6):6852-6865.  
Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
37. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Galna\\_kiselina](https://hr.wikipedia.org/wiki/Galna_kiselina)  
Pristupljeno: 17.8.2021.
38. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhy  
diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakar J. *Sci. Technol.* 2004;26(2):211-219
39. Ethos X application reports. Microwave Green Extraction of Natural Products 2017;1-4.
40. Souza VR, Pereira PAP, Teixeira TR, Silva TLT, Pio R, Queiroz F. Influence of processing on the antioxidant capacity and bioactive compounds in jellies from different blackberry cultivars. *International Journal of Food Science and Technology.* 2015; 50(7):1658-1665.
41. Reyes-Carmona J, Yousef GG, Martinez-Peniche RA, Lila MA. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in the different climatic regions. *Journal of Food Science.* 2005; 70: 497-503.