

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Sabina S. Šaćirović

**POLIFENOLNI SASTAV I  
ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET VINA OD  
SORTI VINOVE LOZE MERLOT I  
CABERNET SAUVIGNON IZ RAZLIČITIH  
GEOGRAFSKIH PODRUČJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Sabina S. Šaćirović

**POLYPHENOLIC COMPOSITION AND  
ANTIOXIDANT CAPACITY OF WINES FROM  
THE MERLOT AND CABERNET SAUVIGNON  
GRAPE VARIETIES FROM DIFFERENT  
GEOGRAPHICAL REGIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.

## **Mentor 1**

**Dr Mališa Antić, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

## **Mentor 2**

**Dr Aleksandar Petrović, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

## **Članovi komisije**

**Dr Saša Matijašijević, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

**Dr Zoran Marković, naučni savetnik**  
Univerzitet u Kragujevcu, Institut za informacione tehnologije

**Dr Ivana Sredović Ignjatović, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

**Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_**

## **Zahvalnica**

*Najveću zahvalnost na iskrenoj i nesebičnoj pomoći pri izradi ove doktorske disertacije dugujem poštovanom mentoru i profesoru, dr Mališi Antiću za značajnu podršku tokom realizacije kako eksperimentalnog, tako i teorijskog dela istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, korisnim savetima i prenetom znanju dugujem dr Zoranu Markoviću, naučnom savetniku Univerziteta u Kragujevcu Instituta za informacione tehnologije, kao i svim članovima njegove istraživačke grupe, koji su mi omogućili realizaciju eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije u laboratorijama Hemijskog fakulteta.*

*Zahvaljujem se dr Aleksandru Petroviću, vanrednom profesoru na angažovanju i značajnoj pomoći u realizaciji važnog dela ove doktorske disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i Saši Šorgiću na saradnji, savetima i podršci u istraživačkom radu.*

*Dr Ivani Sredović Ignjatović, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upućujem zahvalnost na uloženom trudu i korisnim, nesebičnim sugestijama koje su doprinele jasnijem i kvalitetnijem prikazu ovog istraživanja.*

*Dr Saši Matijaševiću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, izražavam zahvalnost na saradnji, kontinuiranoj podršci i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost upućujem i kolegama iz Laboratorije za konzervisanje i vrenje Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pruženoj podršci, saradnji i korisnim savetima tokom rada na ovoj disertaciji..*

*Zahvaljujem se prijateljima na stalnom dobrom raspoloženju, ohrabrenju, razumevanju, ljubavi i podršci tokom ovog puta ka ostvarenju još jednog cilja.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici-roditeljima, bratu, snaji i bratancu Kerimu čija su ljubav, podrška i oslonac činili da i ovaj zahtevni put bude lakši i smisleniji. Beskrajno hvala!*

*Sabina Šaćirović*

# **POLIFENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET VINA OD SORTI VINOVE LOZE MERLOT I CABERNET SAUVIGNON IZ RAZLIČITIH GEOGRAFSKIH PODRUČJA**

## **SAŽETAK**

Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najznačajnijih grupa bioaktivnih supstanci u crvenim vinima, jer u velikoj meri utiču kako na njihova senzorna svojstva, tako i na izraženost antioksidativnog delovanja. Predmet ove doktorske disertacije obuhvatio je detaljnu analizu fenolnog profila, antioksidativnog kapaciteta i volatilnih komponenti crvenih vina proizvedenih od sorti Cabernet Sauvignon i Merlot iz različitih vinogradarskih područja Srbije i Slovenije, sa posebnim osvrtom na uticaj sorte, geografskog porekla i godine berbe na ispitivane karakteristike vina.

U istraživanju su primenjene savremene instrumentalne i analitičke metode, uključujući HPLC-DAD, LC-MS/MS i GC-FID/GC-MS tehnike, kao i spektrofotometrijske procedure zasnovane na DPPH, FRAP i ABTS testovima. Pored eksperimentalnog dela, korišćeni su i teorijski modeli QSAR i DFT, čime je omogućeno sveobuhvatno sagledavanje mehanizama odgovornih za antioksidativna svojstva vina i porekla identifikovanih jedinjenja.

Statistička obrada eksperimentalnih podataka sprovedena je upotrebom korelacione i multivarijantne analize, uključujući PCA pristup, što je omogućilo jasnije povezivanje i interpretaciju dobijenih rezultata.

Rezultati prikazani u disertaciji odnose se na crvena vina proizvedena u vinogradarskim oblastima Balkana, prvenstveno Srbije i Slovenije. Analizirani uzorci potiču od različitih proizvođača, a obuhvataju vina nastala tokom berbi 2015. i 2016. godine.

Utvrđeno je da vina sorte Cabernet Sauvignon u proseku poseduju izraženiji fenolni potencijal u odnosu na vina sorte Merlot. Takođe, potvrđeno je da godina berbe i vinogradarski region značajno utiču ne samo na ukupnu količinu fenolnih jedinjenja, već i na njihov međusobni odnos i kvalitativni sastav. Pokazano je da antioksidativni kapacitet vina nije uslovljen samo ukupnim sadržajem fenola, već i prisustvom pojedinih strukturno značajnih komponenti, među kojima se izdvajaju galna kiselina, flavan-3-oli i flavonoli.

Korelaciona analiza ukazala je na izraženu povezanost između pojedinih fenolnih markera i antioksidativne aktivnosti, dok je primena PCA metode omogućila diferenciranje uzoraka prema sorti, poreklu i godini proizvodnje. Posebno značajan rezultat odnosi se na potvrdu uticaja godine berbe, čime je naglašena važnost fenolne zrelosti grožđa u formiranju funkcionalnih svojstava vina.

Dobijeni nalazi pružaju značajan doprinos boljem razumevanju veze između hemijskog sastava crvenih vina i njihovog antioksidativnog potencijala, te imaju naučni i praktični značaj u oblasti enologije, analitičke hemije i hemije hrane.

Cilj ove doktorske disertacije bio je detaljno proučavanje polifenolnog sastava,

antioksidativnih svojstava i volatilnog profila crvenih vina proizvedenih od sorti Cabernet Sauvignon i Merlot poreklom iz različitih vinogradarskih područja Srbije i Slovenije. U okviru istraživanja korišćen je kombinovani pristup koji je obuhvatio instrumentalne analitičke tehnike (HPLC-DAD, LC-MS/MS, GC-FID/GC-MS), spektrofotometrijske metode određivanja antioksidativne aktivnosti (DPPH, FRAP i ABTS), kao i teorijske modele QSAR i DFT, što je omogućilo integrisano sagledavanje hemijskog sastava i mehanizama antioksidativnog delovanja vina.

Analitičkim ispitivanjima identifikovano je jedanaest fenolnih kiselina, među kojima su galna, vanilinska, siringinska, hlorogenska, elaginska, trans-kaftarna, trans-kutarna, trans-kafena, p-kumarna i ferulna kiselina. Njihovo određivanje izvršeno je DAD detektorom pri talasnim dužinama od 280 i 320 nm, dok je trans-resveratrol registrovan na 320 nm. Pored toga, identifikovano je dvadeset devet flavonoidnih jedinjenja, uključujući (+)-katehin, procijanidin B2, (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehingalat, kvercetin-3-glikozid, rutin, miricetin, morin, kvercetin, kemferol, luteolin, apigenin i naringin. Ova jedinjenja određivana su pri 360 nm, odnosno pomoću fluorescentnog detektora na 275/322 nm. Značajnu grupu analiziranih flavonoida činili su antocijani, među kojima su identifikovani malvidin-3-glikozid, peonidin-3-glikozid, delphinidin-3-glikozid, cijanidin-3-glikozid i petunidin-3-glikozid, zajedno sa njihovim acetilglikozidnim i p-kumaroilglikozidnim derivatima, kao i jedinjenja Vitisin A i malvidin-3-vinilfenolglikozid. Njihova detekcija izvršena je na 520 nm.

Analiza svih ispitivanih uzoraka pokazala je da sadržaj fenolnih jedinjenja zavisi od većeg broja faktora, uključujući sortu grožđa, geografski položaj vinograda, agroekološke uslove, godinu i vreme berbe, primenjenu tehnologiju proizvodnje, kao i način čuvanja i procesa starenja vina. HPLC rezultati ukazali su da galna kiselina predstavlja dominantnu fenolnu kiselinu, sa udelom od 65,06 do 88,75% u ukupnom sadržaju fenolnih kiselina. Među flavonoidima najzastupljeniji su bili (+)-katehin, koji je činio 55,30–83,13% ukupnih flavan-3-ola, zatim kvercetin-3-glikozid sa učešćem od 57,58–60% u ukupnim flavonolima, dok su među antocijanima dominantni bili malvidin-3-glikozid i njegovi acetilni i p-kumaroil derivati, sa zastupljenošću od 86,47 do 100%.

Ispitivana vina pokazala su izraženu sposobnost neutralizacije DPPH radikala, pri čemu su EC50 vrednosti bile u rasponu od 47,17 do 145,83 mL/g, odnosno od 69,55 do 91,83% inhibicije. Korelaciona analiza ukazala je na značajnu povezanost između antioksidativne aktivnosti vina i koncentracija određenih fenolnih jedinjenja detektovanih spektrofotometrijski i HPLC metodom, naročito galne kiseline, (+)-katehina, kvercetin-3-glikozida i trans-resveratrola, pri čemu su vrednosti koeficijenata korelacije iznosile od 0,6912 do 0,8595.

Antioksidativna svojstva vina dodatno su procenjivana primenom nove redoks metode zasnovane na upotrebi bakar(II)-1,10-fenantrolina kao oksidacionog sredstva. Dobijeni rezultati pokazali su veoma visok stepen saglasnosti sa rezultatima DPPH metode, sa koeficijentima korelacije u opsegu 0,9775–0,9776. Takođe je potvrđeno da je antioksidativni kapacitet vina u najvećoj meri povezan sa ukupnim sadržajem flavonoida, što ukazuje da biološka aktivnost crvenih vina nastaje kao rezultat sinergijskog delovanja većeg broja bioaktivnih komponenti.

Rezultati sprovedenog istraživanja ukazuju na mogućnost proizvodnje crvenih vina unapređenog fenolnog sastava i izraženih funkcionalnih svojstava, koja bi uz odgovarajuću marketinšku strategiju mogla ostvariti značajnu konkurentnost na međunarodnom tržištu vina.

**Ključne reči:** crvena vina, fenolni sastav, antioksidativne aktivnost, visokoperformansna tečna hromatografija sa diodnim detektorom (HPLC-DAD), Cabernet Sauvignon, Merlot.

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Hemija hrane

**UDK:** 547.56+543.61]:663.21/.22(043.3)

# **POLYPHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF WINES FROM THE MERLOT AND CABERNET SAUVIGNON GRAPE VARIETIES FROM DIFFERENT GEOGRAPHICAL REGIONS**

## **SUMMARY**

Phenolic compounds represent one of the most important groups of bioactive constituents in red wines, as they significantly influence both their sensory characteristics and antioxidant properties. The subject of this doctoral dissertation included a comprehensive investigation of the phenolic profile, antioxidant capacity, and volatile composition of red wines produced from Cabernet Sauvignon and Merlot grape varieties originating from different viticultural regions of Serbia and Slovenia, with particular emphasis on the influence of grape variety, geographical origin, and vintage year on the investigated wine characteristics.

The study employed modern instrumental and analytical techniques, including HPLC-DAD, LC-MS/MS, and GC-FID/GC-MS methods, as well as spectrophotometric assays based on DPPH, FRAP, and ABTS tests. In addition to the experimental approach, theoretical QSAR and DFT models were applied, enabling a comprehensive understanding of the mechanisms responsible for the antioxidant properties of wines and the origin of the identified compounds.

Statistical processing of the experimental data was performed using correlation and multivariate analyses, including PCA methodology, which enabled a clearer interpretation and correlation of the obtained results.

The results presented in this dissertation refer to red wines produced in viticultural regions of the Balkans, primarily Serbia and Slovenia. The analyzed wine samples originated from different producers and included wines produced during the 2015 and 2016 vintages.

The findings demonstrated that Cabernet Sauvignon wines generally exhibited a higher phenolic potential compared to Merlot wines. Furthermore, it was confirmed that both the vintage year and the viticultural region significantly affected not only the total amount of phenolic compounds but also their qualitative composition and relative distribution. The results indicated that the antioxidant capacity of wines does not depend solely on the total phenolic content, but also on the presence of structurally important compounds such as gallic acid, flavan-3-ols, and flavonols.

Correlation analysis revealed a strong relationship between specific phenolic markers and antioxidant activity, while PCA analysis enabled a clear differentiation of wine samples according to grape variety, geographical origin, and vintage year. A particularly important finding was related to the influence of the vintage year, confirming the central role of grape phenolic maturity in the formation of the functional profile of wines.

The obtained findings contribute to a better understanding of the relationship between the chemical composition of red wines and their antioxidant potential, representing a significant scientific and practical contribution to the fields of enology, analytical chemistry, and food chemistry.

The aim of this doctoral dissertation was a detailed investigation of the polyphenolic composition, antioxidant properties, and volatile profile of red wines produced from Cabernet Sauvignon and Merlot grape varieties originating from different viticultural regions of Serbia and Slovenia. The research combined instrumental analytical techniques (HPLC-DAD, LC-MS/MS,

GC-FID/GC-MS), spectrophotometric methods for antioxidant activity determination (DPPH, FRAP, and ABTS assays), as well as QSAR and DFT theoretical approaches, thereby providing an integrated insight into the chemical composition and mechanisms of antioxidant activity in wines.

Analytical investigations identified eleven phenolic acids, including gallic, vanillic, syringic, chlorogenic, ellagic, trans-caftaric, trans-coutaric, trans-caffeic, p-coumaric, and ferulic acids. Their determination was performed using a DAD detector at wavelengths of 280 and 320 nm, whereas trans-resveratrol was detected at 320 nm. In addition, twenty-nine flavonoid compounds were identified, including (+)-catechin, procyanidin B2, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin gallate, quercetin-3-glucoside, rutin, myricetin, morin, quercetin, kaempferol, luteolin, apigenin, and naringin. These compounds were determined at 360 nm and by fluorescence detection at 275/322 nm. A particularly important group of flavonoids consisted of anthocyanins, including malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, and petunidin-3-glucoside, together with their acetylglucoside and p-coumaroylglucoside derivatives, as well as Vitisin A and malvidin-3-vinylphenolglucoside. Their detection was carried out at 520 nm.

The analysis of all investigated wine samples demonstrated that the phenolic content depends on numerous factors, including grape variety, vineyard location, agroecological conditions, harvest year and time, applied production technology, as well as wine storage and aging conditions. HPLC results indicated that gallic acid was the dominant phenolic acid, accounting for 65.06–88.75% of the total phenolic acids. Among flavonoids, (+)-catechin was the predominant compound, representing 55.30–83.13% of total flavan-3-ols, while quercetin-3-glucoside accounted for 57.58–60% of total flavonols. Among anthocyanins, malvidin-3-glucoside and its acetyl and p-coumaroyl derivatives were dominant, representing 86.47–100% of total anthocyanins.

The investigated wines exhibited pronounced DPPH radical scavenging activity, with EC<sub>50</sub> values ranging from 47.17 to 145.83 mL/g, corresponding to inhibition percentages between 69.55 and 91.83%. Correlation analysis demonstrated a significant relationship between wine antioxidant activity and the concentrations of certain phenolic compounds determined spectrophotometrically and by HPLC analysis, particularly gallic acid, (+)-catechin, quercetin-3-glucoside, and trans-resveratrol, with correlation coefficients ranging from 0.6912 to 0.8595.

The antioxidant properties of wines were additionally evaluated using a novel redox method based on copper(II)-1,10-phenanthroline as the oxidizing agent. The obtained results showed a very high level of agreement with those obtained by the DPPH method, with correlation coefficients ranging from 0.9775 to 0.9776. Furthermore, it was confirmed that the antioxidant capacity of wines is strongly associated with the total flavonoid content, indicating that the biological activity of red wines results from the synergistic action of numerous bioactive compounds.

The results of this study indicate the possibility of producing red wines with an enhanced phenolic profile and pronounced functional properties, which, supported by appropriate marketing strategies, could achieve significant competitiveness on the international wine market.

**Key words:** red wines, phenolic composition, antioxidant activity, high performance liquid chromatography with diode detector (HPLC-DAD), Cabernet Sauvignon, Merlot.

**Scientific field:** Biotechnical sciences

**Narrow scientific field:** Food chemistry

**UDK:** 547.56+543.61]:663.21/.22(043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>3</b>
2.1. Vino kao namirnica sa funkcionalnim svojstvima .....	5
2.2. Istorijski razvoj proučavanja polifenolnih komponenti u vinskim proizvodima .....	6
2.2.1. <i>Razlozi izbora sorti Cabernet Sauvignon i Merlot i vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije</i> ...	8
2.3. Fenolna jedinjenja u vinu i faktori koji utiču na sadržaj i kvalitet .....	8
2.3.1. <i>Uticaj klimatskih i agroekoloških uslova na koncentraciju fenolnih jedinjenja u vinu</i> .....	10
2.3.2. <i>Povezanost pedoloških karakteristika na fenolnim sastavom vina</i> .....	13
2.3.3. <i>Uticaj tehnološkog postupka vinifikacije</i> .....	13
2.3.4. <i>Uticaj sorte, regiona, agroekoloških uslova i tehnologije na profil polifenolnih jedinjenja u vinu</i> .....	15
2.3.5. <i>Uticaj godine berbe, osunčanosti i UV zračenja</i> .....	16
2.3.6. <i>Uticaj mikrobioloških faktora i fermentacije</i> .....	16
2.3.7. <i>Interakcija sortnih, regionalnih i tehnoloških faktora</i> .....	17
2.3.8. <i>Fenolni metabolizam</i> .....	17
2.4. Glavne grupe fenolnih jedinjenja prisutne u bobici vinove loze i njenim proizvodima .....	18
2.4.1. <i>Flavonoidna jedinjenja</i> .....	18
2.4.2. <i>Antocijani</i> .....	21
2.4.3. <i>Flavonoli</i> .....	22
2.4.4. <i>Tanini</i> .....	24
2.4.5. <i>Ne-flavonoidni fenoli</i> .....	25
2.4.6. <i>Fenolne kiseline</i> .....	27
2.4.7. <i>Stilbeni i resveratrol</i> .....	28
2.5. Antioksidanti i antioksidaciona aktivnost vina .....	29
2.6. Reaktivne vrste i oksidativni procesi u biološkim sistemima .....	36
2.6.1. <i>Neutralizacija slobodnih radikala (HAT mehanizam)</i> .....	40
2.6.2. <i>Mehanizam sekvencijalnog prenosa elektrona i protona (SET-PT)</i> .....	40
2.6.3. <i>Mehanizam sekvencijalnog gubitka protona uz prenos elektrona (SPLET mehanizam)</i> .....	41
2.6.4. <i>Prooksidativni potencijal fenolnih jedinjenja</i> .....	42
<b>3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>43</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>44</b>
4.1. Uzorci vina i eksperimentalni dizajn .....	44
4.2. Merlot .....	45
4.3. Cabernet sauvignon .....	46
4.4. Hemikalije, reagensi i standardi .....	48
4.5. Aparatura .....	50
4.6. Mikrovinifikacija .....	52
4.7. Kvasci i enzimski preparati .....	52
4.8. Priprema uzoraka za analizu .....	53
4.9. Savremene metode za određivanje antioksidativne aktivnosti bioaktivnih jedinjenja .....	53
4.9.1. <i>Određivanje antioksidativnog potencijala uzorka korišćenjem DPPH radikala</i> .....	55
4.9.2. <i>Određivanja antioksidativnog kapaciteta ABTS (TEAC) testa</i> .....	59
4.9.3. <i>FRAP metoda</i> .....	61
4.9.4. <i>Procena ukupnih fenola u uzorcima primenom Folin-Ciocalteu reagensa</i> .....	63
4.9.5. <i>Jodometrijsko određivanje ukupnog i slobodnog sumpor-dioksida u vinu (Ripper metoda)</i> .....	64
4.9.6. <i>Analitičko određivanje slobodnog SO<sub>2</sub></i> .....	65
4.9.7. <i>Analitičko određivanje ukupnog SO<sub>2</sub></i> .....	66
4.9.8. <i>HPLC–DAD analiza fenolnih jedinjenja</i> .....	66
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>70</b>
5.1. Slobodni SO <sub>2</sub> (Metoda po Ripperu) .....	70
5.2. Ukupni SO <sub>2</sub> .....	72
5.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti vina .....	74
5.3.1. <i>DPPH</i> .....	74
5.3.2. <i>ABTS/TEAC metoda određivanja</i> .....	79

5.3.3. <i>Određivanje redukcionog antioksidativnog kapaciteta primenom Frap metode</i> .....	86
5.4. Kombinovana HPLC-DAD i LC-MS/MS karakterizacija fenolnih jedinjenja .....	89
5.4.1. <i>Hromatografski uslovi</i> .....	96
5.4.2. <i>Identifikacija i kvantifikacija jedinjenja</i> .....	96
5.4.3. <i>Validacija HPLC-DAD metode</i> .....	97
5.5. Analitička karakterizacija Cabernet Sauvignon vina iz vinogradarskih oblasti Srbije i Slovenije.....	97
5.5.1. <i>Ukupni sadržaj fenola – kvantitativna analiza</i> .....	98
5.5.2. <i>Fenolne kiseline – HPLC analiza</i> .....	100
5.5.3. <i>Zastupljenost flavan-3-oli i flavonola u fenolnom profilu</i> .....	100
5.5.4. <i>Antocijani i boja vina</i> .....	101
5.5.5. <i>Antioksidativna aktivnost vina</i> .....	103
5.5.6. <i>Volatilna jedinjenja i aromatski profil vina</i> .....	105
5.5.7. <i>Teorijska interpretacija – QSAR i DFT</i> .....	106
5.5.8. <i>Ukupni sadržaj fenola u vinima Cabernet Sauvignon i Merlot</i> .....	107
5.6. Antioksidativna aktivnost vina – analiza po metodi .....	108
5.7. HPLC profili pojedinačnih fenolnih jedinjenja .....	110
5.7.1. <i>Interpretacija HPLC profila po klasama jedinjenja</i> .....	112
5.7.2. <i>Multivarijantna analiza – PCA</i> .....	112
5.7.3. <i>Procena sadržaja fenolnih jedinjenja u Cabernet Sauvignon vinima spektroskopskim metodama</i> .....	114
5.7.4. <i>HPLC karakterizacija neflavonoidnih fenolnih komponenti u uzorcima vina sorte Cabernet Sauvignon</i> .....	116
5.7.5. <i>Karakterizacija fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon vinima primenom HPLC metode</i> .....	117
5.7.6. <i>Ispitivanje koncentracije trans-resveratrola u vinima sorte Cabernet Sauvignon metodom tečne hromatografije visokih performansi</i> .....	122
5.7.7. <i>Primena tečne hromatografije visokih performansi u određivanju flavonoidnih jedinjenja u Cabernet Sauvignon vinima</i> .....	123
5.7.8. <i>Zastupljenost flavan-3-oli u analiziranim vinima sorte Cabernet Sauvignon</i> .....	123
5.7.9. <i>Zastupljenost flavonola, flavona i flavanona u analiziranim Cabernet Sauvignon vinima</i> ..	125
5.7.10. <i>Karakterizacija antocijana u uzorcima vina Cabernet Sauvignon korišćenjem HPLC tehnike</i> .....	131
5.8. POREĐENJE ANALIZIRANIH VINA IZ VINOGRADARSKO-VINARSKIH PODRUČJA SRBIJE I SLOVENIJE .....	135
5.8.1. <i>Komparativna analiza Merlot vina iz Srbije i Slovenije</i> .....	135
5.8.2. <i>Karakterizacija fenolnog profila jednosortnih crvenih vina spektroskopskim pristupom</i> .....	135
5.8.3. <i>HPLC karakterizacija neflavonoidnog fenolnog sastava u jednosortnim crvenim vinima</i> .....	138
5.8.4. <i>HPLC karakterizacija fenolnih kiselina u jednosortnim crvenim vinima</i> .....	138
5.8.5. <i>HPLC karakterizacija sadržaja trans-resveratrola u jednosortnim crvenim vinima</i> .....	142
5.8.6. <i>Karakterizacija flavonoidnog sastava jednosortnih crvenih vina primenom HPLC metode</i> ....	143
5.8.7. <i>Karakterizacija antocijanskog profila odabranih jednosortnih vina primenom HPLC metode</i> .....	150
5.9. ANTIOKSIDACIONA AKTIVNOST I NJENA KORELACIJA SA SADRŽAJEM FENOLNIH JEDINJENJA U IZABRANIM UZORCIMA CRVENIH VINA SRBIJE I SLOVENIJE.....	154
5.9.1. <i>Korelaciona analiza DPPH antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih jedinjenja u odabranim crvenim vinima</i> .....	154
<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>165</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>169</b>
<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	<b>181</b>

## 1. UVOD

Vino predstavlja jedan od najstarijih fermentisanih prehrambenih proizvoda u ljudskoj istoriji, čija se upotreba kroz vekove razvijala od ritualnog i kulturnog simbola do predmeta savremenih naučnih istraživanja. Posebna pažnja savremene nauke usmerena je ka crvenim vinima, čiji se biohemijski sastav odlikuje visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, jedinjenja koja imaju ključnu ulogu u formiranju senzornih svojstava vina, ali i u ispoljavanju potencijalno povoljnih bioloških efekata na ljudsko zdravlje zbog njihove izražene antioksidativne, antiinflamatorne i kardioprotektivne aktivnosti.

Fenolna jedinjenja vina predstavljaju heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita, koji obuhvataju fenolne kiseline, flavonoide (flavan-3-ole, flavonole, flavone, flavanone), stilbene i tanine. Njihova koncentracija i međusobni odnos zavise od brojnih faktora, uključujući sortu vinove loze, klimatske i pedološke uslove, tehnološki proces proizvodnje vina, kao i godine berbe. Zbog toga se fenolni profil vina smatra jednim od najpouzdanijih pokazatelja sorte i regionalne autentičnosti.

U poslednjim decenijama, interesovanje naučne zajednice za vino značajno je poraslo usled sve većeg broja istraživanja koja ukazuju na povezanost umerenog konzumiranja crvenog vina i smanjenog rizika od kardiovaskularnih i degenerativnih oboljenja. Ovi efekti se dominantno pripisuju antioksidativnom potencijalu fenolnih jedinjenja, koja deluju putem mehanizama neutralizacije slobodnih radikala, heliranja metalnih jona i modulacije oksidativnog stresa na ćelijskom nivou.

Cabernet Sauvignon i Merlot spadaju među najrasprostranjenije i najistraživanije crvene sorte vinove loze u svetu. Njihova popularnost proizilazi iz stabilnog kvaliteta, prilagodljivosti različitim agroekološkim uslovima i bogatog fenolnog sastava. Uprkos velikom broju dostupnih naučnih studija, i dalje nedostaje dovoljno sistematizovanih podataka koji se odnose na vina ovih sorti poreklom sa Balkanskog poluostrva, naročito kada je reč o komparativnoj analizi vina proizvedenih u Srbiji i Sloveniji.

Balkanski region predstavlja izuzetno interesantno područje za ovakva istraživanja, jer se odlikuje prelaznim klimatskim karakteristikama između kontinentalne i mediteranske klime, kao i značajnom heterogenošću zemljišta. Ovi faktori mogu značajno uticati na biosintetičke procese i nakupljanje fenolnih jedinjenja u grožđu, što se zatim odražava i na njihov sadržaj u vinu.

Crvena vina sadrže, u poređenju sa belim vinima, znatno više polifenolnih jedinjenja, što proizilazi iz specifičnih tehnoloških postupaka u vinifikaciji, posebno usled maceracije pokožice i semenki grožđa. Sastav fenolnih jedinjenja u vinu zavisi od sorte grožđa, agroekoloških uslova gajenja, stepena zrelosti ploda, kao i od primenjenih enoloških procedura tokom fermentacije i procesa odležavanja.

Epidemiološka i eksperimentalna istraživanja ukazuju na moguće povoljne efekte crvenih vina na ljudsko zdravlje. Jedna značajna studija, sprovedena u okviru Svetske zdravstvene organizacije, obuhvatila je više od 1.000.000 ispitanika iz 18 ekonomski razvijenih država. Anketiranje je bilo zasnovano na 16 različitih parametara relevantnih za zdravstveno stanje

populacije. Analizom dobijenih podataka utvrđeno je da su zemlje sa većom potrošnjom vina imale 3–5 puta nižu stopu mortaliteta usled kardiovaskularnih bolesti u poređenju sa državama u kojima je konzumacija vina niska. Takođe, učestalost različitih oboljenja, naročito kardiovaskularnih, značajno je manja u regionima gde je vino deo svakodnevne ishrane, u odnosu na sredine gde dominira upotreba jakih alkoholnih pića. Brojne studije, uključujući i navedenu, ukazuju na potrebu identifikacije komponenti vina koje doprinose njegovom povoljnom delovanju, zbog čega ga je i Luj Paster opisivao kao „najhigijenskije piće“. Savremena naučna istraživanja pripisuju ovakve efekte prvenstveno fenolnim jedinjenjima. In vitro i in vivo ispitivanja pokazala su da ova jedinjenja imaju zaštitno dejstvo na kardiovaskularni sistem, potencijalno smanjuju štetne efekte UV i radioaktivnog zračenja, te ispoljavaju antikancerogena, antiinflamatorna, antivirusna i antioksidativna svojstva. Fenolna jedinjenja predstavljaju heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita široko rasprostranjenih u prirodi. Posebnu pažnju naučne javnosti privukli su proantocijanidoli (proantocijanidini, kondenzovani tanini), koji su najzastupljeniji u lignoceluloznim tkivima biljaka. U grožđu se ove materije nalaze pretežno u čvrstim delovima bobice, dok su u pulpi prisutne samo u tragovima. Posmatrano na nivou celog grozda, oko 70–80% proantocijanidola lokalizovano je u semenkama, dok se preostali deo, u približno sličnom odnosu, nalazi u pokožici i peteljkovini. Na efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja presudno utiču tehnološki uslovi proizvodnje, uključujući pH vrednost, prisustvo sumpor-dioksida, koncentraciju etanola, temperaturne režime, kao i odnos čvrste i tečne faze u kljuku.

## 2. PREGLED LITERATURE

Jedan od osnovnih uslova za dobijanje vina vrhunskog kvaliteta jeste upotreba kvalitetnog grožđa kao sirovine. Kvalitet grožđa, odnosno njegova sposobnost da obezbedi proizvodnju vina visokih senzorskih i tehnoloških karakteristika, može se procenjivati subjektivnim metodama, kao što su ocena ukusa, mirisa i spoljašnjeg izgleda bobica, ali i objektivnim analizama hemijskog sastava grožđa (Krstić et al., 2003). Rezultati ovih procena predstavljaju značajnu osnovu za donošenje odluka koje se odnose na određivanje optimalnog momenta berbe, formiranje tržišne vrednosti grožđa, razdvajanje sirovine prema kvalitetu, kao i izbor odgovarajućih uslova prerade.

Sazrevanje grožđa je povezano sa akumulacijom šećera u soku i smanjenjem kiselosti. Dakle, ukupne rastvorljive čvrste materije i kiselost grožđa tradicionalno se koristi za ocenjivanje zrelosti grožđa, kako u pogledu određivanja vremena berbe tako i u pogledu odlučivanja o ceni grožđa. Međutim, sadržaj šećera u grožđu ima mali uticaj na konačni kvalitet grožđa vina i u toplijim krajevima često je lako dostići željeni nivo šećera grožđa (Gishen et al. 2002). Poznavanje drugih komponenti koje su povezane direktnije sa parametrima kvaliteta vina bilo bi korisno u ocenjivanju kvaliteta grožđa. Osim toga, odnos između grožđa i vina se može modelovati i trebalo bi da bude moguće predviđanje važnih parametara kvaliteta vina iz merenja grožđa. Takvo predviđanje bi moglo biti dragoceno za odluke koje se tiču vremena berbe, plaćanja, obrade uslova i segregaciju.

Fenolna jedinjenja se već dugo smatraju značajnim komponentama koje utiču na organoleptičke karakteristike vina, uključujući boju, senzorna svojstva, trpkost i gorčinu (Kennedi et al. 2006b; Vidal et al. 2004; Gavel 1998; Preis et al. 2006). Brojna istraživanja pokazala su da postoji direktna povezanost između intenziteta boje i subjektivne procene kvaliteta crvenih vina (Somers i Evans 1974; Jackson et al. 1978). Novija ispitivanja dodatno ukazuju na povezanost intenziteta boje sa izraženošću ukusa i ukupnom senzornom ocenom vina (Gishen et al. 2002).

Fenolni profil predstavlja jedan od ključnih faktora koji određuju boju crvenih vina, pri čemu posebno značajnu ulogu imaju antocijanini, polimerni pigmenti, kao i pigmentna jedinjenja nastala transformacijom antocijanina (Somers 1971; Fulcrand et al. 2006; Cheynier et al. 2006). Tako procena fenolnog sastava grožđa omogućava direktniju procenu kvaliteta grožđa. Iako fenolna jedinjenja u vinu potiču iz grožđa, veza između fenola grožđa i vina je komplikovana zbog nekoliko faktora. Ekstrakcija fenola iz grožđa za fermentaciju je proces koji retko izdvaja više od 50% fenola iz grožđa. Boja vina je takođe određena pH vrednošću i nivoima sulfita, ali i prisustvom nebojenih jedinjenja, posebno drugi fenoli, koji mogu poboljšati boju molekularnim asocijacijama sa pigmentima. Pošto se boja vina ne odnosi samo na nivo antocijana u grožđu, uspostavljanje i korišćenje multivarijantne relacije između detaljnog fenolnog sastava grožđa i boje vina mogli bi da poboljšaju razumevanje odnosa između fenolnog sastava grožđa i boje vina. Znanje o fenolnom sastavu grožđa bi takođe moglo da omogući predviđanje fenolnog sastava vina, i time ukaže na određene karakteristike vina. FOSS proizvodi su namenski napravljeni srednji infracrveni instrumenti (Vinescan TM) u industriji vina. Vinescan omogućava brzu analizu hemijskog sastava soka vina. Nekoliko važnih parametara grožđa (uključujući šećere, organske kiseline, kalijum i indeks čvrstoće grožđa) mogu se istovremeno odrediti pomoću infracrvenih spektara. Međutim, instrument trenutno ne uključuje analizu fenolnog sastava grožđa.

Jedna specifična prepreka za analizu fenolnog sastava grožđa infracrvenom spektroskopijom

je da se fenolna jedinjenja nalaze u čvrstim delovima grožđa i stoga ga treba ekstrahovati pre analize. Tipični protokoli za ekstrakciju fenola iz grožđa su dugotrajni i intenzivni, pa stoga nisu kompatibilni sa rutinskom analizom u vinariji. Razvoj brzog protokola za ekstrakciju fenola iz grožđa bio bi važan korak ka korišćenju infracrvene spektroskopije za merenje fenolnog sastava grožđa. Još jedan kritičan korak je koliko dobro može infracrvena spektroskopija zapravo da meri fenole, koji su prisutni u prilično niskim koncentracijama u Cabernet i Merlot vinima (obično ispod 5 g/L).

U brojnim vinogradarskim zemljama sveta zakonskim regulativama definisani su kriterijumi za klasifikaciju i promet vina. U okviru Evropske unije klasifikacija se najčešće zasniva na geografskom poreklu i vinskim regionima, kao što su Rioja ili Bordeaux, dok se u zemljama van EU vina često označavaju prema dominantnoj sorti grožđa, na primer Cabernet Sauvignon ili Merlot. Tokom poslednjih decenija razvoj vinskog marketinga značajno je doprineo prepoznatljivosti i tržišnoj afirmaciji pojedinih vinskih regiona na globalnom nivou.

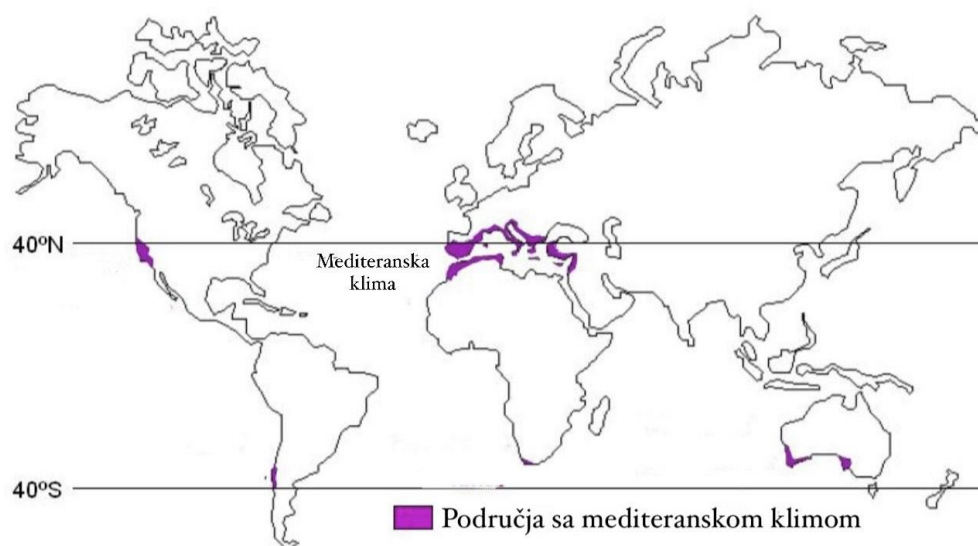
Vinski regioni se uglavnom razvrstavaju prema klimatskim karakteristikama koje vladaju tokom vegetacionog perioda vinove loze. Najveći deo svetske proizvodnje visokokvalitetnih vina potiče iz mediteranskih, primorskih i kontinentalnih klimatskih područja, među kojima se izdvajaju regioni kao što su Tuscany, Bordeaux i Columbia Valley. Ovi regioni smešteni su uglavnom između 30° i 50° geografske širine severne i južne hemisfere, pri čemu se i Srbija nalazi unutar tog pojasa, između 41° i 46° severne geografske širine.

Kvalitet grožđa i vina rezultat je međusobnog delovanja brojnih faktora, uključujući klimatske prilike, karakteristike zemljišta, sortiment, kao i antropogene uticaje. Zbog toga se u savremenoj vinogradarskoj literaturi poseban značaj pridaje konceptu terroir-a, koji predstavlja specifičan interaktivni ekosistem određenog lokaliteta (Jones, 2006; Deloire i sar., 2002). Povezanost terroir-a sa kvalitetom vina može se sagledati poređenjem različitih vinogradarskih područja širom sveta (Daynes i Williams, 2012).

Proces sazrevanja grožđa u velikoj meri zavisi od temperaturnih uslova i raspoložive vlage u zemljištu. Poznato je da se pri temperaturama oko 27 °C intenziviraju fiziološki procesi u vinovoj lozi, što pogoduje sazrevanju bobica. Jedna od važnih razlika među vinskim regionima odnosi se na trajanje perioda potrebnog za dostizanje optimalnih temperaturnih uslova tokom vegetacije. Pored temperature, značajan uticaj imaju količina padavina i potreba za navodnjavanjem, dok dodatni klimatski faktori, poput vetra, atmosferskog pritiska i dnevnih temperaturnih oscilacija, takođe mogu značajno uticati na dinamiku zrenja grožđa (Jackson i Lombard, 1993).

Vinogradarski regioni Balkanskog poluostrva karakterišu se pretežno kontinentalnim klimatskim uslovima, sa toplim i suvim letima i hladnim, vlažnim zimskim periodom. Takvi heliotermički uslovi omogućavaju uspešno sazrevanje velikog broja sorti vinove loze na nadmorskim visinama od približno 80 do 500 m. Klimatske osobine ovih područja pokazuju određene sličnosti sa regionima Côtes du Rhône u Francuskoj, Barolo i Chianti u Italiji, kao i Porto i Vinho Verde u Portugaliji (Jones i sar., 2005). Crvena vina balkanskih zemalja najčešće se proizvode od jedne ili više sorti vrste *Vitis vinifera*, među kojima su Cabernet Sauvignon, Merlot, Frankovka, Pinot Noir i Gamay, ali značajno mesto zauzimaju i autohtone sorte, poput Vranca, Prokupca i Kratošije. Prema zakonskoj regulativi Republike Srbije („Službeni glasnik RS“, br. 41/2009 i 93/2012), vinogradarski region predstavlja područje koje se odlikuje sličnim ekološkim

uslovima, odgovarajućim izborom preporučenih sorti i drugim faktorima značajnim za uspešno gajenje vinove loze, čime se omogućava proizvodnja grožđa i vina specifičnih kvalitativnih i senzorskih karakteristika. Prema dostupnim statističkim podacima, Srbija je 2011. godine raspolagala sa 56.434 ha vinograda i ostvarila proizvodnju od približno 1.353.632 hL vina. U istom periodu Hrvatska je sa oko 58.000 ha vinograda proizvela približno 1.270.000 hL vina, dok je Severna Makedonija na površini od oko 21.000 ha ostvarila proizvodnju od približno 900.000 hL. Bosna i Hercegovina je 2010. godine proizvela 134.130 hL vina, dok je Bugarska sa oko 265.000 ha pod vinogradima tokom 2009. godine proizvela približno 2.000.000 hL vina.



**Slika 1.** Vinogradarski reoni sa mediteranskom klimom

## **2.1. Vino kao namirnica sa funkcionalnim svojstvima**

Vino predstavlja jedan od najstarijih fermentisanih prehrambenih proizvoda u ljudskoj istoriji i zauzima posebno mesto u ishrani, kulturi i ekonomiji brojnih civilizacija. Njegova uloga se kroz vekove menjala – od ritualnog napitka i osnovne prehrambene namirnice, do savremenog proizvoda visoke dodate vrednosti, čiji se kvalitet ne ocenjuje isključivo na osnovu senzornih karakteristika, već i kroz potencijalne zdravstvene efekte.

Savremena nauka o hrani sve više prepoznaje vino, naročito crvena vina, kao funkcionalnu namirnicu, odnosno proizvod koji pored nutritivne vrednosti poseduje i biološki aktivne komponente sa povoljnim efektima na zdravlje čoveka. Ova funkcionalna svojstva vina najvećim delom povezuju se sa fenolnim jedinjenjima, koja pripadaju značajnoj grupi sekundarnih biljnih metabolita prisutnih u bobicama vinove loze i proizvodima dobijenim njihovom preradom.

Polifenolne komponente prisutne u vinu imaju višestruki značaj. Ona utiču na boju, ukus, miris i stabilnost vina, ali istovremeno poseduju izraženu antioksidativnu aktivnost, sposobnost

heliranja metalnih jona i modulacije oksidativnih procesa. Upravo ova dualna uloga – tehnološka i biološka – čini fenolna jedinjenja centralnom tačkom savremenih enoloških i nutricionističkih istraživanja.

U kontekstu sve veće zastupljenosti oksidativnog stresa kao faktora rizika za razvoj brojnih hroničnih oboljenja, interesovanje za prirodne antioksidanse, uključujući one prisutne u vinu, značajno je poraslo. Međutim, savremeni pristup ne podrazumeva generalizaciju vina kao „zdravog proizvoda“, već insistira na naučno utemeljenom razumevanju sastava vina, mehanizama delovanja njegovih bioaktivnih komponenti i faktora koji utiču na njihovu koncentraciju i raspodelu.

Koncept funkcionalne hrane podrazumeva prehrambene proizvode koji, pored osnovne nutritivne vrednosti, ispoljavaju dodatne fiziološke ili zdravstveno povoljne efekte. U tom kontekstu, crveno vino zauzima specifično mesto zbog prisustva širokog spektrabioaktivnih jedinjenja, prvenstveno fenolnih komponenti, koje pokazuju izraženu antioksidativnu aktivnost.

Brojna epidemiološka istraživanja ukazuju na povezanost umerenog konzumiranja crvenog vina sa smanjenom učestalošću kardiovaskularnih oboljenja, što je u literature poznato kao „francuski paradoks“. Ovaj fenomen se ne može objasniti isključivo sadržajem etanola, već se dominantno pripisuje prisustvu fenolnih jedinjenja, naročito flavonoida i stilbena, koji deluju kao snažni antioksidansi i modulatori oksidativnog stresa.

Fenolna jedinjenja vina doprinose neutralizaciji reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, smanjuju oksidaciju lipoproteina male gustine (LDL), utiču na vaskularnu funkciju i pokazuju potencijalno antiinflamatorno delovanje. Zbog ovih svojstava, crveno vino se u savremenoj naučnoj literature sve češće razmatra u okviru funkcionalne hrane, uz jasno naglašavanje značaja umerenosti u konzumiranju.

## **2.2. Istorijski razvoj proučavanja polifenolnih komponenti u vinskim proizvodima**

Povezanost konzumacije vina i očuvanja zdravlja prepoznata je još u antičkom periodu. U civilizacijama stare Grčke i Rimskog carstva vino nije imalo isključivo ulogu napitka, već se koristilo i za dezinfekciju, očuvanje namirnica, kao i u terapijske svrhe pri tretiranju različitih zdravstvenih tegoba. Hipokrat je vino opisivao kao „lek koji treba primenjivati s merom“, naglašavajući značaj umerenosti u konzumaciji.

Tokom srednjeg veka, vino je predstavljalo osnovni izvor tečnosti u mnogim delovima Evrope, pre svega zbog svoje mikrobiološke stabilnosti u poređenju sa vodom. Ipak, tek sa razvojem savremene hemije i biohemije u 19. i 20. veku započinju sistematska istraživanja hemijskog sastava vina i njegovih potencijalnih bioloških efekata, kada su istraživači prepoznali njihovu ulogu u boji, ukusu i stabilnosti vina. Međutim, tek razvojem savremenih analitičkih tehnika, poput tečne hromatografije visoke efikasnosti (HPLC), omogućena je detaljna karakterizacija pojedinačnih fenolnih komponenti.

U početnim istraživanjima, fokus je bio usmeren na ukupni sadržaj fenola, meren spektrofotometrijskim metodama. Kasnije studije omogućile su identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih kiselina, flavonoida i stilbena, čime je značajno unapređeno razumevanje

složenosti fenolnog profila vina.

Savremeni pristupi u istraživanju fenolnih jedinjenja vina podrazumevaju integraciju hemijskih analiza, antioksidativnih testova i multivarijantnih statističkih metoda, što omogućava sveobuhvatnu interpretaciju dobijenih rezultata i identifikaciju ključnih faktora koji utiču na kvalitet vina.

Poseban preokret u shvatanju zdravstvene uloge vina dogodio se krajem 20. veka pojavom tzv. „francuskog paradoksa“, koji je ukazao na relativno nizak stepen kardiovaskularnih oboljenja u populaciji sa visokim unosom zasićenih masti, ali i redovnom, umerenom konzumacijom crvenog vina. Ovaj fenomen je inicirao intenzivna istraživanja uloge fenolnih jedinjenja vina u prevenciji oksidativnog oštećenja lipida, lipoproteina i ćelijskih struktura.

Savremena istraživanja su pokazala da se potencijalni zdravstveni efekti vina ne mogu pripisati etanolu, već pre svega fenolnim komponentama. Ova saznanja su doprinela razvoju koncepta vina kao kompleksne biološke matrice, čiji se efekti ne mogu posmatrati izolovano, već kroz interakciju brojnih jedinjenja.

Zbog svoje složenosti i osetljivosti na sortne, regionalne i tehnološke faktore, fenolni sastav vina se sve češće koristi kao indikator kvaliteta i autentičnosti. Profil fenolnih jedinjenja može poslužiti kao hemijski „otisak prsta“ vina, koji omogućava njegovu diferencijaciju prema poreklu i stilu.

Primena multivarijantnih statističkih metoda, poput analize glavnih komponenti (PCA), omogućava identifikaciju obrazaca u fenolnom profilu vina i njihovo povezivanje sa specifičnim sortnim i regionalnim karakteristikama. Ovakav pristup predstavlja važan alat u savremenim istraživanjima kvaliteta vina.

Detaljna analiza uticaja sorte, regiona i tehnologije na fenolni sastav vina predstavlja teorijsku osnovu za eksperimentalni deo ove disertacije. Rezultati dobijeni u okviru spektrofotometrijskih i HPLC analiza interpretirani su u svetlu ovih faktora, čime se obezbeđuje koherentnost između teorijskog i eksperimentalnog dela rada.

Ovakav pristup omogućava ne samo deskriptivnu analizu podataka, već i dublje razumevanje mehanizama koji stoje u osnovi uočenih razlika u fenolnom sastavu i antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih vina.

Uprkos velikom broju dostupnih studija, i dalje postoji nedostatak sistematskih istraživanja koja istovremeno obuhvataju detaljnu analizu fenolnog sastava vina, poređenje različitih antioksidativnih metoda, uticaj sortnih i regionalnih faktora, kao i integraciju rezultata kroz multivarijantnu statistiku.

Posebno je izražen nedostatak komparativnih studija koje obuhvataju vina od sorti Cabernet Sauvignon i Merlot proizvedena na teritoriji Srbije i Slovenije. Većina dostupnih radova fokusirana je na vina zapadne Evrope, dok su vina Balkanskog regiona znatno manje zastupljena u međunarodnoj literaturi, uprkos dugoj tradiciji vinogradarstva i raznovrsnim agroekološkim uslovima.

### **2.2.1. Razlozi izbora sorti Cabernet Sauvignon i Merlot i vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije**

Cabernet Sauvignon i Merlot odabrane su kao predmet istraživanja zbog njihove globalne rasprostranjenosti, ali i zbog specifičnih razlika u fenolnom profilu. Cabernet Sauvignon se odlikuje višim sadržajem tanina i fenolnih kiselina, dok Merlot karakteriše mekši senzorski profil i drugačiji odnos flavonoidnih jedinjenja.

Proučavanje ovih sorti omogućava sagledavanje uticaja sortnih karakteristika na fenolni sastav i antioksidativnu aktivnost vina, kao i identifikaciju potencijalnih markera sortne autentičnosti.

Srbija i Slovenija predstavljaju vinogradarske regione sa izraženom klimatskom i pedološkom raznovrsnošću. Slovenija, naročito područje Primorske, ima izražene mediteranske uticaje, dok vinogradarski regioni Srbije pretežno pripadaju kontinentalnom klimatskom pojasu.

Ova razlika u klimatskim uslovima omogućava ispitivanje uticaja terroir-a na biosintezu i akumulaciju fenolnih jedinjenja u grožđu i vinu. Komparativna analiza vina iz ovih regiona pruža osnovu za razumevanje regionalnih specifičnosti i doprinosi valorizaciji vina Balkanskog poluostrva na međunarodnom nivou.

### **2.3. Fenolna jedinjenja u vinu i faktori koji utiču na sadržaj i kvalitet**

Na sadržaj fenolnih jedinjenja u grožđu utiče više različitih faktora (Singleton i sar., 1969; Ribereau-Gayon, 1982; Macheix i sar., 1990).

- sorte,
- regiona,
- agroekoloških uslova i
- stepena zrelosti.

Istraživanja Revilla i saradnika (1997) pokazala su da se sadržaj fenolnih jedinjenja u grožđu značajno razlikuje u zavisnosti od sorte vinove loze, kao i od agroekoloških uslova, klimatskih karakteristika i godine proizvodnje. Tokom razvoja bobice, u fazi sazrevanja dolazi do intenzivnog porasta koncentracije fenolnih jedinjenja, što je povezano sa metaboličkim promenama i intenzivnim fiziološkim aktivnostima ploda.

Biosinteza fenolnih jedinjenja odvija se kroz više povezanih metaboličkih puteva. Aromatični prekursori nastaju iz centralnih metabolita biljke, pri čemu se ključni intermedijeri formiraju kroz reakcije između jedinjenja iz pentozofosfatnog ciklusa i fosfoenol-pirogroždane kiseline. Šikimatni biosintetski put ima centralnu ulogu u formiranju aromatičnih struktura, jer dovodi do nastanka aromatičnih kiselina, kao i aminokiselina fenilalanina i tirozina, koje predstavljaju važne polazne supstrate za dalje reakcije. Formiranje aromatičnih prstenova može biti povezano i sa metabolizmom acetyl-CoA, kroz kondenzacione reakcije više molekula poreklom iz Krebsovog ciklusa. U regulaciji ovih metaboličkih tokova ključnu ulogu ima enzim fenilalanin-

amonijum liaza (PAL), koji preusmerava metabolizam fenilalanina iz proteinske sinteze ka sintezi fenilpropanoidnih jedinjenja, uključujući različite derivate cimetne kiseline. Tokom procesa sazrevanja, koncentracija antocijana se postepeno povećava do faze pune zrelosti, nakon čega u fazi prezrelosti dolazi do njihovog smanjenja. Ovaj obrazac je karakterističan za većinu sorti, ali maksimalne vrednosti variraju u zavisnosti od genetskih i ekoloških faktora. Takođe, najviši nivo antocijana ne mora uvek da se poklopi sa optimalnim odnosom šećera i kiselina u grožđu.

Formiranje aromatičnih prstenova može biti povezano i sa metabolizmom acetil-CoA, kroz kondenzacione reakcije više molekula poreklom iz Krebsovog ciklusa. U regulaciji ovih metaboličkih tokova ključnu ulogu ima enzim fenilalanin-amonijum liaza (PAL), koji preusmerava metabolizam fenilalanina iz proteinske sinteze ka sintezi fenilpropanoidnih jedinjenja, uključujući različite derivate cimetne kiseline.

Tokom procesa sazrevanja, koncentracija antocijana se postepeno povećava do faze pune zrelosti, nakon čega u fazi prezrelosti dolazi do njihovog smanjenja. Ovaj obrazac je karakterističan za većinu sorti, ali maksimalne vrednosti variraju u zavisnosti od genetskih i ekoloških faktora. Takođe, najviši nivo antocijana ne mora uvek da se poklopi sa optimalnim odnosom šećera i kiselina u grožđu.

Polifenoli, odnosno fenolna jedinjenja, predstavljaju veoma heterogenu i široko rasprostranjenu grupu sekundarnih metabolita biljaka, sa više od 8000 do sada identifikovanih struktura, prisutnih u različitim biljnim tkivima kao što su voće, povrće, žitarice, listovi i cvetovi. Sa hemijskog stanovišta, ova jedinjenja karakteriše prisustvo aromatičnog prstena na koji su vezane jedna ili više hidroksilnih grupa. Zahvaljujući svojoj strukturi, ona mogu da deluju kao donori protona i elektrona, zbog čega ispoljavaju izražena antioksidativna svojstva, neutrališući slobodne radikale i pri tome formirajući stabilnije, manje reaktivne fenoksil radikale.

Fenolna jedinjenja spadaju u najznačajnije grupe sekundarnih metabolita biljaka i u velikoj meri doprinose hemijskoj i biološkoj složenosti crvenih vina. U grožđu i vinu, ova jedinjenja imaju ključnu ulogu u formiranju boje, ukusa, arome i stabilnosti proizvoda, ali istovremeno doprinose i njegovom antioksidativnom potencijalu. Zbog toga su fenolna jedinjenja predmet intenzivnih istraživanja u oblasti enologije, hemije hrane i nutricionističkih nauka.

Fenolna jedinjenja u vinu potiču prvenstveno iz pokožice, semenki i peteljki grožđa, dok se u manjoj meri mogu formirati i tokom procesa fermentacije i sazrevanja. Njihov ukupni sadržaj i kvalitativni sastav zavise od brojnih faktora, uključujući sortu vinove loze, klimatske i pedološke uslove, stepen fenolne zrelosti grožđa, kao i primenjenu tehnologiju vinifikacije.

Sa hemijskog stanovišta, fenolna jedinjenja se karakterišu strukturnim prisustvom e hidroksilnih funkcionalnih grupa povezanih sa aromatičnim prstenom. Ova strukturalna osobina omogućava im izraženu reaktivnost prema slobodnim radikalima i metalnim jonima, što predstavlja osnovu njihove antioksidativne aktivnosti.

Fenolna jedinjenja u vinu imaju značajnu ulogu, jer utiču kako na potencijalne bioaktivne efekte, tako i na formiranje boje i ukupnih senzornih karakteristika vina. Iz tog razloga, u fokusu brojnih istraživanja nalazi se identifikacija i razumevanje faktora koji određuju njihovu koncentraciju i varijabilnost u različitim vinima (Ribereau-Gayon i sar., 1988, 1999; Kennedy i sar.,

2000; Revilla i sar., 1997; Arnous i sar., 2002; Connor i sar., 2005; Alcalde-Eon i sar., 2006; Fernandez-Pachon i sar., 2007; Villano i sar., 2006; Anli i Vural, 2009; Palma i Taylor, 1999; Landroult i sar., 1999; Carluccio i sar., 2003; Macheix i sar., 1990).

Na sadržaj i međusobne odnose fenolnih jedinjenja u vinu utiče čitav niz činilaca. Najznačajniji među njima su sorte karakteristike vinove loze, stepen zrelosti grožđa, kao i uslovi gajenja koji obuhvataju klimatske i agroekološke faktore poput tipa zemljišta i primenjenih agrotehničkih mera. Pored toga, važnu ulogu imaju i tehnološki postupci tokom vinifikacije, kao i uslovi čuvanja i odležavanja vina (Connor i sar., 2005; Alcalde-Eon i sar., 2006; Singleton i sar., 1965).

Budući trendovi u istraživanju fenolnog sastava vina usmereni su ka integraciji klasičnih analitičkih metoda sa naprednim statističkim i hemometrijskim pristupima. Multivarijantna analiza, mašinsko učenje i veliki skupovi podataka omogućavaju dublje razumevanje kompleksnih odnosa između fenolnog profila, antioksidativne aktivnosti i senzorskih svojstava vina.

Takođe, raste interesovanje za istraživanje mikroklimatskih i mikroregionalnih efekata, što doprinosi preciznijem definisanju terroir-a i valorizaciji vina iz manje zastupljenih regiona, poput Balkanskog poluostrva.

Detaljna karakterizacija fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti vina zahteva primenu kombinacije analitičkih metoda koje omogućavaju kako kvantitativno određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, tako i identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih komponenti. Zbog složene hemijske prirode vina, ni jedna pojedinačna metoda ne može pružiti potpun uvid u fenolni profil i antioksidativni potencijal, te se u savremenim istraživanjima primenjuje integrisan i metodološki pristup.

Izbor odgovarajuće analitičke tehnike zavisi od cilja istraživanja, prirode ispitivanih jedinjenja, kao i od zahteva za kvantitativnom i kvalitativnom analizom. U ovoj doktorskoj disertaciji posebna pažnja posvećena je primeni savremenih analitičkih metoda, pre svega tečne hromatografije visoke efikasnosti (HPLC), kao i kombinovane tehnike tečne hromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS), koje omogućavaju detaljnu karakterizaciju ispitivanih jedinjenja.

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je niz međusobno dopunjujućih analitičkih metoda i pristupa, koje obuhvataju spektrofotometrijske metode, tečnu hromatografiju visoke efikasnosti i in vitro testove antioksidativne aktivnosti. Ovakav pristup omogućava sveobuhvatnu evaluaciju fenolnog sastava vina i predstavlja osnovu za pouzdanu interpretaciju dobijenih rezultata.

### **2.3.1. Uticaj klimatskih i agroekoloških uslova na koncentraciju fenolnih jedinjenja u vinu**

Geografsko poreklo vina, odnosno terroir, obuhvata kompleksan skup klimatskih, pedoloških i topografskih faktora koji utiču na rast vinove loze i sazrevanje grožđa. Razlike u temperaturi, količini padavina, osunčanosti i tipu zemljišta direktno se odražavaju na sintezu fenolnih jedinjenja.

Studije su pokazale da vina iste sorte, ali različitog porekla, mogu imati značajno različit fenolni profil, čak i kada se primenjuju slični enološki postupci. Ova činjenica dodatno naglašava značaj regionalnih istraživanja u kontekstu globalnih klimatskih promena.

U cilju sagledavanja uticaja klimatskih uslova na vinogradarsku proizvodnju i kvalitet vina, Jones i saradnici (2005, 2006) sprovedli su istraživanja u 27 najznačajnijih vinogradarskih oblasti sveta. Dobijeni rezultati ukazali su da temperaturne oscilacije tokom perioda dozrevanja grožđa imaju značajan uticaj na prinos i kvalitet proizvedenog vina. Na akumulaciju fenolnih jedinjenja u bobici tokom sazrevanja utiče veliki broj ekoloških i agroekoloških činilaca, među kojima su posebno značajni klimatski uslovi, konfiguracija terena, ekspozicija vinograda, intenzitet sunčevog i UV zračenja, hemijsko-mineralni sastav zemljišta, kao i dostupnost vode u zemljištu.

Vinogradarska područja Balkanskog regiona, koja pripadaju mediteranskoj klimatskoj zoni, odlikuju se toplim i suvim klimatskim uslovima pogodnim za sazrevanje grožđa i akumulaciju bioaktivnih jedinjenja u bobici. Tokom vegetacionog ciklusa u takvim uslovima dolazi do povećanja sadržaja polifenola, naročito u pokožici bobice, kao i do promena u koncentraciji šećera, organskih kiselina, mineralnih materija i pH vrednosti šire (Downey i sar., 2003; Kennedy i sar., 2000; Lapidot i sar., 1999; Alcalde-Eon i sar., 2006; Gil-Munoz i sar., 2010).

Istraživanja crvenih vina proizvedenih u regionu Villány u Mađarskoj tokom perioda od 1996. do 2003. godine pokazala su da godišnji klimatski uslovi imaju značajan uticaj na sastav polifenolnih jedinjenja. Prema rezultatima Pour Nikfardjam i saradnika (2006), sušne godine mogu dovesti do smanjenja koncentracije pojedinih stilbena, uključujući resveratrol.

Na hemijski sastav i senzorne karakteristike vina značajno utiču i osobine zemljišta. Faktori kao što su nadmorska visina, nagib terena, ekspozicija vinograda i raspoloživost vode razlikuju se čak i unutar istog vinogradarskog regiona, pri čemu direktno utiču na proces sazrevanja grožđa, sastav bobice i konačan kvalitet vina (Crippen i Morrison, 1986; Bergqvist i sar., 2001; Falquéra i sar., 2012).

Tokom zrenja grožđa dolazi do izraženih promena u sastavu fenolnih jedinjenja. Uočeno je povećanje sadržaja proantocijanidola do približno 60 %, dok se koncentracija monomernih flavan-3-ola u semenkama može smanjiti i do 90 %. Istovremeno, sadržaj flavonola može višestruko porasti, u zavisnosti od intenziteta osunčanosti i broja sunčanih dana tokom sazrevanja (Kennedy i sar., 2000).

Prema pojedinim autorima, najveći deo ukupnih fenolnih jedinjenja u grožđu lokalizovan je u semenkama, gde se nalazi oko 60 %, dok pokožica sadrži približno 15–20 %, a ostatak se nalazi u šepurini odnosno ogrozdini (Downey i sar., 2003).

Pored tradicionalnog određivanja tehnološke zrelosti grožđa na osnovu odnosa šećera i kiselina, značajnu ulogu ima i procena fenolne zrelosti, koja se zasniva na odnosu fenolnih jedinjenja i bojenih materija. Ovakav pristup omogućava preciznije određivanje optimalnog momenta berbe i maksimalnog antioksidativnog potencijala grožđa (de Gaulejac i sar., 1999).

Tokom sazrevanja dolazi do postepenog povećanja koncentracije fenolnih komponenata, naročito antocijana, sve do dostizanja pune zrelosti bobice. Nakon toga, u fazi prezrelosti,

koncentracija ovih jedinjenja počinje da opada. Ovakav trend potvrđen je kod većine sorti vinove loze, pri čemu maksimalne vrednosti antocijana zavise od klimatskih karakteristika i vinogradarskog regiona (Harborne i Williams, 2001; Ribereau-Gayon i sar., 1999; Gil-Munoz i sar., 2010).

Klimatske promene predstavljaju jedan od najvećih izazova savremene enologije i vinogradarstva. Porast prosečnih temperatura, promene u rasporedu padavina i učestalost ekstremnih vremenskih pojava direktno utiču na fiziološke procese vinove loze, uključujući sintezu i akumulaciju fenolnih jedinjenja u grožđu.

Povećanje temperature tokom vegetacionog perioda često dovodi do ubrzanog sazrevanja grožđa, što može rezultirati neravnotežom između šećerne zrelosti i fenolne zrelosti. U takvim uslovima, dolazi do promena u profilu fenolnih jedinjenja, naročito antocijana i tanina, što se direktno odražava na boju, strukturu i stabilnost vina.

Studije ukazuju da povišene temperature mogu smanjiti koncentraciju antocijana u crvenim vinima, dok istovremeno povećavaju sadržaj određenih fenolnih kiselina i flavonola. Ove promene predstavljaju značajan izazov za očuvanje tipičnog stila vina, posebno kod sorti koje su tradicionalno vezane za umerenije klimatske uslove.

U cilju ublažavanja negativnih efekata klimatskih promena, savremeno vinogradarstvo razvija različite adaptivne strategije koje imaju za cilj očuvanje kvaliteta grožđa i stabilnosti fenolnog profila vina.

Jedna od ključnih strategija jeste prilagođavanje termina berbe kako bi se obezbedila optimalna fenolna zrelost. Takođe, primena kontrolisanog vodnog stresa, izbor odgovarajućih podloga i modifikacija sistema uzgoja vinove loze predstavljaju važne mere u adaptaciji na nove klimatske uslove.

U regionima Balkana, gde se očekuju značajne klimatske promene, ove strategije imaju poseban značaj i predstavljaju važan segment budućih istraživanja i prakse.

Tehnološke inovacije u enologiji imaju za cilj očuvanje fenolnog profila vina u uslovima promenjenih klimatskih okolnosti. Primenom selektovanih kvasaca i kontrolisanih uslova fermentacije moguće je delimično modifikovati ekstrakciju i stabilnost fenolnih jedinjenja.

Savremeni tehnološki pristupi uključuju i upotrebu alternativnih tehnika maceracije, kao što su hladna maceracija, pulsirajuća maceracija i primena enzima, koje omogućavaju precizniju kontrolu ekstrakcije fenolnih komponenti.

Ove tehnike omogućavaju enolozima da prilagode fenolni profil vina savremenim klimatskim izazovima, uz očuvanje sortne i regionalne prepoznatljivosti.

U okviru ove doktorske disertacije, uticaj klimatskih promena razmatra se kroz analizu razlika u fenolnom sastavu vina različitih godina berbe i regiona porekla. Ovakav pristup omogućava identifikaciju trendova koji mogu biti povezani sa promenama klimatskih uslova, kao i evaluaciju adaptivnog potencijala pojedinih sorti vinove loze.

Rezultati dobijeni u ovom radu pružaju osnovu za buduća istraživanja usmerena ka razvoju održivih enoloških strategija u uslovima klimatskih promena, kao i za unapređenje kvaliteta vina u regionu Balkana.

### **2.3.2. Povezanost pedoloških karakteristika na fenolnim sastavom vina**

Pored klimatskih faktora, osobine zemljišta imaju značajnu ulogu u formiranju fenolnog profila vina. Tip zemljišta utiče na dostupnost vode i mineralnih materija, kao i na mikrobiološku aktivnost u zoni korena, što posredno utiče na metabolizam vinove loze.

Zemljišta bogata mineralima, sa dobrom drenažom, često doprinose kontrolisanom vodnom stresu, koji stimulise sintezu sekundarnih metabolita, uključujući fenolna jedinjenja. Suprotno tome, previše plodna i vlažna zemljišta mogu rezultirati smanjenom koncentracijom fenolnih jedinjenja zbog razblaženja i intenzivnijeg vegetativnog rasta.

U vinogradarskim regionima Balkana prisutna je velika raznovrsnost zemljišta, uključujući krečnjačka, glinovita i aluvijalna tla, što predstavlja dodatni faktor varijabilnosti u fenolnom sastavu vina istih sorti. Ove razlike omogućavaju dublju interpretaciju eksperimentalnih rezultata u kontekstu regionalne specifičnosti.

### **2.3.3. Uticaj tehnološkog postupka vinifikacije**

Tokom procesa vinifikacije dolazi do ekstrakcije različitih jedinjenja iz čvrstih delova grožđa u tečnu fazu, pri čemu se, pored fenolnih komponenti, izdvajaju i polisaharidi, azotna jedinjenja i mineralne materije. Intenzitet i efikasnost ekstrakcije zavise od trajanja i uslova maceracije, kao i od brojnih tehnoloških faktora, među kojima su odnos čvrste i tečne faze kljuka, prisustvo kiseonika, stepen muljanja bobica, koncentracija alkohola i sumpor(IV)-oksida, temperatura fermentacije, odabrani soj kvasca, kao i postupci stabilizacije i bistrenja vina (Wilson, 1993; Merida i sar., 1991; Ewart i sar., 1993; Soleas i sar., 1998; Lapidot i sar., 1999; Yokotsuka, 2000; Morata i sar., 2004; Revilla i sar., 1997, 1998).

Povećanje udela čvrste faze u kljuku, koje se može postići maceracijom celih grozdova, produženim kontaktom pokožice i semenki sa širom ili dodatkom semenki tokom fermentacije, utiče na povećanu ekstrakciju određenih fenolnih jedinjenja. U takvim uslovima dobijaju se vina sa većim sadržajem (+)-katehina i proantocijanidolnih dimera B1 i B2 (Revilla i sar., 1997).

Prema pojedinim autorima, tokom maceracije u vino prelazi svega 20–30 % ukupnih fenolnih kiselina prisutnih u grožđu (Ribereau-Gayon i sar., 1999). Na sastav fenolnih jedinjenja značajno može uticati i izbor kvasca koji se koristi tokom fermentacije. Određeni sojevi pokazuju manju sposobnost vezivanja antocijana za ćelijski zid, zbog čega doprinose većem sadržaju flavan-3-ola i monomernih antocijana, kao i intenzivnijoj boji crvenih vina (McDonald i sar., 1998; de Gaulejac i sar., 1999; Arnous i sar., 2002; Caridi i sar., 2004; Gil-Munoz i sar., 2010).

Tokom čuvanja, sazrevanja i starenja vina dolazi do brojnih transformacija fenolnih

jedinjenja usled oksidacionih i kondenzacionih reakcija. Metaboliti kvasca, poput piruvinske kiseline i acetaldehida, mogu reagovati sa antocijanima i drugim fenolnim komponentama, pri čemu nastaju stabilniji pigmenti kao što su vitisin A i vitisin B (Romero i Bakker, 1999; Liu i sar., 2000; Luiz, 2011).

Utvrđeno je i da pojedina sredstva za bistrenje mogu uticati na smanjenje sadržaja fenolnih jedinjenja i intenziteta boje mladih crvenih vina. Na primer, primena natrijum-bentonita u većim količinama može dovesti do smanjenja koncentracije antocijana, katehina i dimernih proantocijanidola za približno 15% u poređenju sa tretmanom želatinom (Singleton i Trousdale, 1992; Luiz, 2011).

Savremeni tehnološki postupci usmereni ka povećanju sadržaja fenolnih jedinjenja obuhvataju produženu maceraciju, termovinifikaciju, zamrzavanje šire, kao i dodatak semenki i peteljki grozda u kljuk (Harborne i Williams, 2001; Luiz, 2011). Istraživanja su pokazala da vina proizvedena pri povišenim temperaturama fermentacije imaju izraženiji intenzitet boje u odnosu na vina dobijena standardnim postupcima, iako pri tome mogu sadržati niže koncentracije monomernih antocijana i veći udeo polimernih pigmenata (Lapidot i sar., 1999; Lila, 2004; Gil-Munoz i sar., 2010).

Značaj fenolnih jedinjenja u vinu može se sagledati sa tri aspekta: senzornog, tehnološkog i biološkog.

Sa senzorskog stanovišta, fenolna jedinjenja utiču na boju, ukus, aromu i teksturu vina. Sa tehnološkog aspekta, ona učestvuju u procesima oksidacije, polimerizacije i stabilizacije vina tokom odležavanja. Sa biološkog aspekta, fenolna jedinjenja doprinose antioksidativnom potencijalu vina i njegovim potencijalnim zdravstvenim efektima.

Sve navedeno ukazuje da su fenolna jedinjenja centralni faktor kvaliteta crvenih vina, zbog čega njihova detaljna analiza predstavlja osnovu savremenih istraživanja u oblasti enologije i hemije hrane.

Fenolna jedinjenja predstavljaju široku i strukturno raznovrsnu grupu sekundarnih biljnih metabolita koji imaju ključnu ulogu u fiziologiji biljaka, ali i u hemijskom, senzorskom i biološkom profilu vina. Njihova kompleksnost proizilazi iz velikog broja mogućih strukturnih varijacija, različitih stepena oksidacije, supstitucije aromatičnog prstena i mogućnosti polimerizacije, što ih čini jednim od najistraživanijih sistema u oblasti hemije hrane i enologije.

U crvenim vinima, fenolna jedinjenja potiču prvenstveno iz pokožice, semenki i, u manjoj meri, mesa bobice grožđa. Tokom vinifikacije dolazi do njihove ekstrakcije u vino, pri čemu se njihov konačni sastav menja pod uticajem fermentacije, oksidacionih procesa i reakcija polimerizacije. Razumevanje teorijskih osnova fenolnih jedinjenja predstavlja neophodan preduslov za pravilnu interpretaciju eksperimentalnih rezultata dobijenih u ovoj disertaciji.

U crnom vinskom grožđu nivoi ukupnih fenola se obično kreću između 2 i 11 g/kg (Džekson 1994b, Singleton 1966). U crnim vinima nivoi ukupnih fenola su tipični između 0,8 i 4 g/L i ekstrakcija ukupnih fenola iz grožđa u vino na taj način retko prelazi 50% i na taj način objašnjava različite nivoe u grožđu i vinu (Haslam 2005).

Količina ukupnih fenola iz različitih delova bobica crvenog grožđa je oko 33% u kožici, 62% u semenu, 1% u pulpi i 4% u soku (Zoecklein et al. 1995). Tako su polifenoli uglavnom prisutni u semenkama i koži bobica grožđa sa vrlo malim količinama fenola u pulpi i soku od grožđa.

Produžena maceracija i viša temperatura fermentacije generalno favorizuju ekstrakciju flavonoida i tanina, dok kraći kontakt pokožice sa sokom rezultira blažim fenolnim profilom. Takođe, upotreba enoloških aditiva i način odležavanja vina (drvene buradi, tip drveta) mogu značajno uticati na fenolni sastav.

Razumevanje uticaja tehnoloških faktora omogućava enolozima da ciljano modifikuju fenolni profil vina u skladu sa željenim senzorskim karakteristikama i stilom vina.

#### **2.3.4. Uticaj sorte, regiona, agroekoloških uslova i tehnologije na profil polifenolnih jedinjenja u vinu**

Fenolni sastav vina rezultat je složene i interakcije genetskih, ekoloških i tehnoloških faktora. Sorta vinove loze, geografski region porekla i primenjena tehnologija vinifikacije predstavljaju tri ključna determinanta koje uslovljavaju kvantitativni i kvalitativni profil fenolnih jedinjenja u vinu. Razumevanje uticaja ovih faktora od presudnog je značaja za interpretaciju eksperimentalnih rezultata i identifikaciju izvora varijabilnosti u fenolnom sastavu vina.

Sorta vinove loze predstavlja primarni izvor varijabilnosti fenolnog sastava vina, budući da je biosinteza fenolnih jedinjenja genetski uslovljen proces. Različite sorte karakterišu se specifičnim kapacitetom za sintezu i akumulaciju pojedinačnih klasa fenolnih jedinjenja u pokožici, semenima i mesu bobice grožđa.

Cabernet Sauvignon se u literaturi opisuje kao sorta sa izraženim potencijalom za akumulaciju tanina, flavan-3-ola i fenolnih kiselina. Debeli pokožica bobice, kao i visok odnos pokožice i soka, doprinose većem sadržaju flavonoidnih jedinjenja u vinu. Ova sorta se često povezuje sa višim sadržajem katehina i oligomernih proantocijanidina, što utiče na strukturu, adstringentnosti sposobnost odležavanja vina.

Merlot, sa druge strane, odlikuje se mekšim senzorskim profilom i drugačijim odnosom fenolnih jedinjenja. U poređenju sa Cabernet Sauvignon-om, vina Merlota često imaju niži sadržaj tanina, ali relativno viši udeo pojedinih flavonola i antocijana, što doprinosi zaobljenijem ukusu i ranijoj potrošačkoj prihvatljivosti.

Razlike u fenolnom sastavu između ovih sorti čine ih pogodnim modelima za proučavanje sortnog uticaja na antioksidativni potencijal i senzorska svojstva vina.

Geografski region porekla vina, odnosno terroir, predstavlja skup klimatskih, pedoloških i topografskih faktora koji značajno utiču na biosintezu fenolnih jedinjenja u grožđu. Temperatura, količina sunčevog zračenja, padavine i tip zemljišta direktno utiču na metabolizam biljke i sintezu sekundarnih metabolita.

U toplijim regionima, sa većom insolacijom, često se beleži povećana sinteza flavonoida i stilbena, kao odgovor biljke na UV zračenje. Suprotno tome, u hladnijim regionima može doći do drugačije raspodele fenolnih jedinjenja, sa naglašenijom akumulacijom određenih antocijana i flavonola.

Balkanski region, posebno Srbija i Slovenija, predstavlja interesantno područje za proučavanje regionalnog uticaja zbog izraženih klimatskih razlika na relativno malom geografskom prostoru. Vinogradarski regioni Srbije uglavnom se odlikuju kontinentalnom klimom sa toplim letima i hladnijim zimama, dok slovenački regioni, naročito Primorska, imaju izražen mediteranski uticaj.

Ove razlike mogu značajno uticati na fenolni profil vina istih sorti, što omogućava identifikaciju regionalnih markera i doprinosi razumevanju uticaja terroir-a na kvalitet vina.

### **2.3.5. Uticaj godine berbe, osunčanosti i UV zračenja**

Godina berbe predstavlja dodatni faktor varijabilnosti fenolnog sastava vina, jer vremenski uslovi tokom vegetacionog perioda mogu značajno varirati iz godine u godinu. Razlike u temperaturi, količini padavina i dužini perioda sazrevanja grožđa utiču na stepen zrelosti bobica i sintezu fenolnih jedinjenja.

Sušne i sunčane godine često dovode do povećane koncentracije fenolnih jedinjenja, dok vlažne i hladnije godine mogu rezultirati razblaženijim fenolnim profilom. Zbog toga se u savremenim istraživanjima posebna pažnja posvećuje analizi uticaja godine berbe na fenolni sastav i antioksidativnu aktivnost vina.

Izloženost grožđa sunčevoj svetlosti i UV zračenju ima direktan uticaj na sintezu fenolnih jedinjenja, naročito flavonola i antocijana. Flavonoli se često smatraju UV-zaštitnim jedinjenjima, čija sinteza se povećava kao odgovor na povećanu izloženost sunčevom zračenju.

U regionima sa izraženijom insolacijom, vina često pokazuju viši sadržaj flavonola i intenzivniju boju. Ovaj efekat je naročito izražen kod sorti sa tanjom pokožicom, dok kod sorti sa debljom pokožicom dolazi do drugačije raspodele fenolnih jedinjenja.

Razlike u osunčanosti između vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije predstavljaju važan faktor u objašnjenju uočenih razlika u fenolnom profilu ispitivanih vina.

### **2.3.6. Uticaj mikrobioloških faktora i fermentacije**

Mikrobiološki procesi tokom fermentacije imaju značajan uticaj na transformaciju fenolnih jedinjenja. Kvasci i bakterije mogu doprineti hidrolizi estara i glikozida, oslobađajući slobodna fenolna jedinjenja ili modifikujući njihov hemijski oblik.

Tokom alkoholne fermentacije dolazi do promena u redoks uslovima, što može uticati na stabilnost i reaktivnost fenolnih komponenti. Takođe, sekundarna fermentacija i malolaktička

fermentacija mogu dodatno modifikovati fenolni profil vina.

Razumevanje ovih procesa je važno za interpretaciju razlika u fenolnom sastavu vina proizvedenih različitim tehnološkim postupcima.

### **2.3.7. Interakcija sortnih, regionalnih i tehnoloških faktora**

Fenolni sastav vina ne može se posmatrati kao rezultat delovanja pojedinačnih faktora, već kao posledica njihove međusobne interakcije. Sortne karakteristike određuju osnovni potencijal za sintezu fenolnih jedinjenja, regionalni uslovi modulišu ovaj potencijal, dok tehnološki postupci određuju stepen njihove ekstrakcije i stabilnosti u vinu.

Zbog toga savremeni istraživački pristupi u enologiji sve češće koriste integrisane analitičke i statističke metode kako bi se sagledala kompleksnost ovih interakcija. Takav analitički pristup korišćen je i tokom izrade ove doktorske disertacije, sa ciljem detaljne karakterizacije fenolnog profila i antioksidativnog potencijala crvenih vina

### **2.3.8. Fenolni metabolizam**

Vodni stress se smatra jednim od najvažnijih faktora koji utiču na biosintezu fenolnih jedinjenja u grožđu. Umeren vodni stres tokom perioda sazrevanja grožđa može dovesti do povećane sinteze flavonoida i stilbena, dok ekstremni stres može negativno uticati na kvalitet grožđa.

Fenolna jedinjenja se često akumuliraju kao deo adaptivnog odgovora biljke na stresne uslove. Posebno je značajna povećana sinteza resveratrola u uslovima stresnih faktora, što dodatno naglašava njegovu ulogu kao fitoaleksina.

Razumevanje odnosa između vodnog stresa i fenolnog profila vina od posebnog je značaja u kontekstu klimatskih promena, koje sve više utiču na vinogradarske regione širom sveta.

Antioksidativna efikasnost fenolnih jedinjenja zavisi od više strukturnih faktora, uključujući broj i položaj hidroksilnih grupa, stepen konjugacije, prisustvo elektron donorskih ili elektron akceptorski supstituenata, kao i stepen polimerizacije.

Flavonoidi sa orto-dihidroksilnom strukturom u B prstenu, kao što su kvercetin i katehin, pokazuju izraženu antioksidativnu aktivnost, dok glikozilacija često dovodi do njenog smanjenja.

Vino predstavlja izuzetno kompleksnu matricu u kojoj pojedinačna fenolna jedinjenja ne deluju izolovano, već u međusobnoj interakciji. Sinergijski efekti između različitih polifenola, kao i interakcije sa metalnim jonima, proteinima i drugim komponentama vina, značajno utiču na ukupan antioksidativni potencijal.

Razumevanje ovih sinergijskih efekata predstavlja jedan od ključnih izazova savremene enološke i nutricionarne hemije i zahteva integraciju eksperimentalnih i teorijskih pristupa, što

predstavlja osnovu ove doktorske disertacije.

## **2.4. Glavne grupe fenolnih jedinjenja prisutne u bobici vinove loze i njenim proizvodima**

Polifenolne komponente biljnog porekla spadaju među najvažnije sekundarne metabolite, dok u vinu imaju značajnu ulogu u formiranju boje, senzornih karakteristika i bioloških svojstava. Hemijska raznovrsnost fenolnih jedinjenja, kao i njihova složena međusobna interakcija, čine osnovu za razumevanje kvaliteta vina i njegovog potencijalnog funkcionalnog značaja.

U grožđu, fenolna jedinjenja su dominantno lokalizovana u pokožici, semenkama i peteljci, dok je njihov sadržaj u pulpi znatno manji. Tokom procesa vinifikacije, naročito tokom maceracije, dolazi do ekstrakcije ovih jedinjenja u vino, pri čemu stepen i dinamika ekstrakcije zavise od sorte grožđa, stepena zrelosti, kao i od primenjenih tehnoloških postupaka.

Posmatrano sa hemijskog stanovišta, ova jedinjenja odlikuje aromatična struktura za koju su vezane hidroksilne funkcionalne grupe. Ova strukturalna osobina odgovorna je za njihovu antioksidativnu aktivnost, jer omogućava doniranje atoma vodonika ili elektrona, kao i stabilizaciju nastalih radikala putem rezonantnih struktura.

Fenolna jedinjenja se u literaturi razvrstavaju prema različitim kriterijumima klasifikacije (Macheix i sar, 1990; German i Walzem, 2000; Havsteen, 2002; Grotewold, 2006; Pereira i sar., 2009; Klepacka i sar., 2011).

Klasifikacija fenolnih jedinjenja u vinu može se vršiti na osnovu njihove hemijske strukture, molekulske mase, kao i stepena polimerizacije.

Oni se obično klasifikuju ili kao flavonoidi ili kao neflavonoidi, zbog velike proporcije fenola u crvenim vinima sadrže flavonoidnu prstenastu strukturu.

### **2.4.1. Flavonoidna jedinjenja**

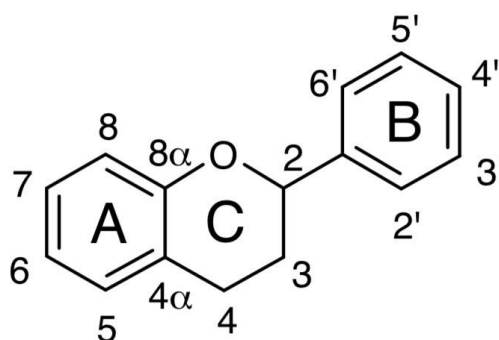
Flavonoidi čine najbrojniju i strukturalno najraznovrsniju grupu fenolnih jedinjenja u crvenim vinima. Njihova osnovna struktura zasniva se na flavonoidnom skeletu (C6–C3–C6), koji omogućava formiranje velikog broja derivata.

U vinima se najčešće sreću sledeće flavonoidne podgrupe:

- Flavan-3-oli, uključujući katehin, epikatehin i njihove oligomerne oblike,
- Proantocijanidini (kondenzovani tanini),
- Flavonoli (kvercetin, miricetin, kemferol i njihovi glikozidi),
- Antocijanini, koji predstavljaju ključne pigmente zadužene za crvenu boju vina,
- Flavoni i flavanoni, prisutni u manjim količinama.

Flavonoidi imaju izražen uticaj na senzorska svojstva vina, naročito na punoću i stabilnost boje. Njihova biološka aktivnost zavisi od broja i rasporeda hidroksilnih grupa, stepena vezivanja

šećernih ostataka (glikozilacije), kao i sposobnosti molekula da formiraju stabilne rezonantne strukture. (Slika 2).



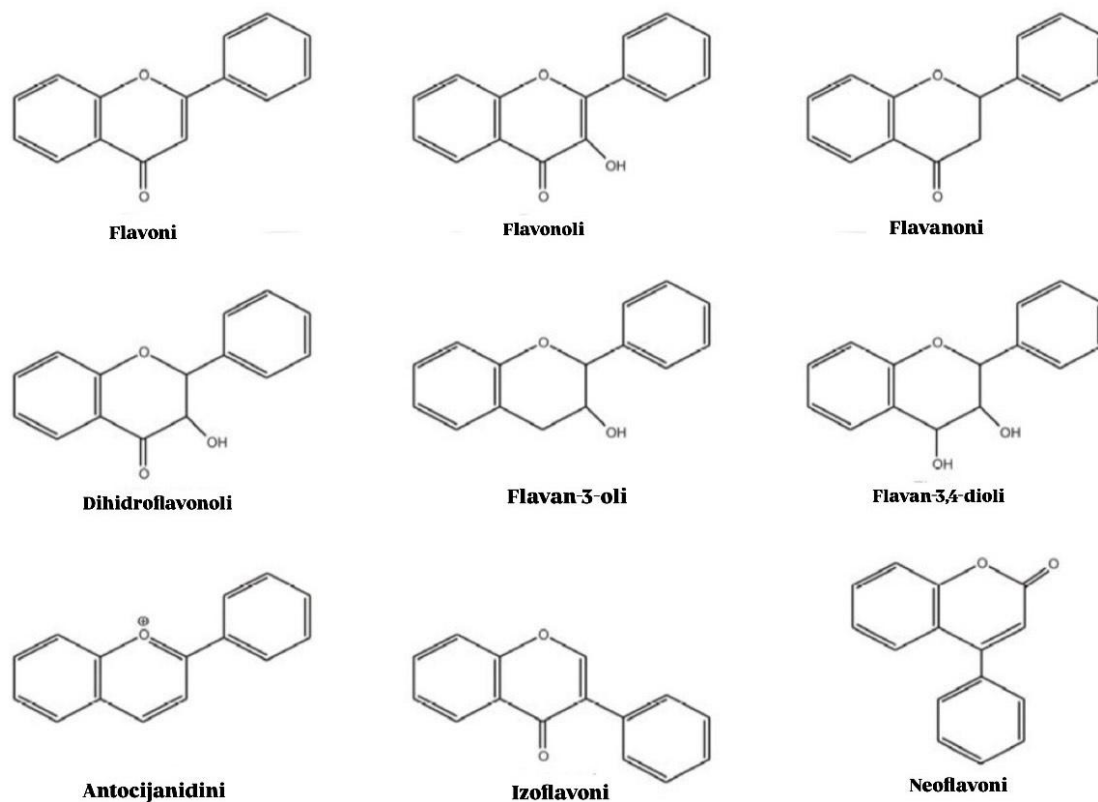
**Slika 2.** Struktura flavonoidnog prstena sa numerisanim ugljenikovim atomima

Flavonoidi predstavljaju veliku grupu polifenolnih jedinjenja čija se struktura može modifikovati različitim supstitucijama, kao što su hidroksi, metoksi, acilne ili glikozidne grupe, koje se vezuju na različitim pozicijama osnovnog skeleta. Osnovna flavonoidna struktura može sadržati i karbonilnu funkcionalnu grupu, kao i različite stepene nezasićenosti u heterocikličnom C prstenu, što doprinosi njihovoj raznolikosti i reaktivnosti.

U grožđu i vinu najzastupljenije klase flavonoida uključuju antocijanine, flavanole, flavonole i kondenzovane tanine (proantocijanidole). Ova jedinjenja karakteriše prisustvo hidroksilnih grupa na pozicijama 5 i 7 A prstena flavonoidne strukture, dok se značajne varijacije javljaju u obrascu hidroksilacije i drugim supstitucijama na B i C prstenu (Cook i Samman, 1996).

Flavonoidni skelet se sastoji od dva aromatična prstena (A i B) povezana preko heterocikličnog C prstena, pri čemu se različite klase formiraju promenama u stepenu oksidacije i položaju supstituenata na ugljeničnim atomima u pozicijama 2, 3 i 4. Na ovaj način nastaju različite podgrupe, uključujući flavone, flavanole, flavanone, dihidroflavone, antocijanidine, flavan-3-ole, flavan-3,4-diols, kao i izoflavone i neoflavone, u zavisnosti od načina povezivanja prstenova.

U strukturalnom i funkcionalnom smislu, flavonoidi u vinu se mogu javiti u slobodnom obliku ili u obliku kompleksnijih jedinjenja nastalih polimerizacijom ili vezivanjem sa šećerima (glikozidi), kao i sa drugim organskim kiselinama i jedinjenjima, uključujući acilovane derivate. U grožđu i vinu posebno su zastupljeni flavonoli, antocijani, flavan-3-oli i njihovi polimeri, dok su flavan-3,4-dioli prisutni u znatno manjim količinama.



**Slika 3.** Strukturne formule glavnih flavonoidnih grupa

Flavonoidi obuhvataju nekoliko podgrupa: flavan-3-ole, flavonole i antocijane. Ova jedinjenja se biosintetišu putem fenilpropanoidnog puta i imaju ključnu ulogu u formiranju senzornog profila vina.

Jedinjenja iz grupe flavan-3-ola, među kojima su katehin i epikatehin, dominantno potiču iz semenki grožđa i odgovorni su za gorčinu i adstringentnost vina. Predstavljaju osnovne monomerne jedinice kondenzovanih tanina (proantocijanidina). Njihova sposobnost polimerizacije dovodi do formiranja proantocijanidina i odgovorni su za strukturu vina, ali i za značajan deo njegove antioksidativne aktivnosti.

Polimerizacija flavan-3-ola dovodi do formiranja oligomera i polimera različite molekulske mase, čija biološka aktivnost i senzorski efekti zavise od stepena polimerizacije i prostorne konfiguracije.

Flavonoli, među kojima se izdvajaju kvercetin, miricetin i kemferol, prisutni su pretežno u pokožici grožđa i imaju važnu ulogu u kopigmentaciji sa antocijanima, čime doprinose stabilnosti boje crvenih vina.

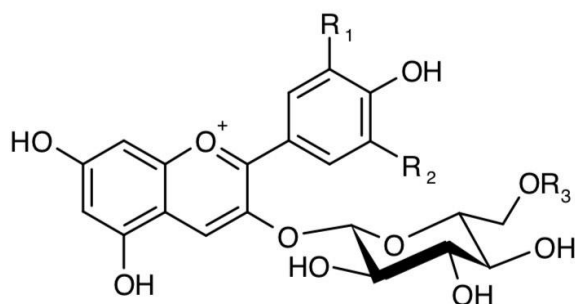
## 2.4.2. Antocijani

Antocijani su pigmentna jedinjenja odgovorna za crvenu, ljubičastu i plavu boju vina, pri čemu je malvidin-3-glikozid najdominantniji predstavnik u vinima sorti Cabernet Sauvignon i Merlot (Šaćirović S. et al. 2019, Ferreira V. et al. 2000).

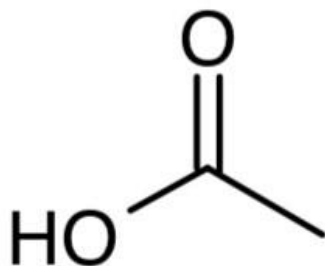
Sa hemijskog stanovišta, ova jedinjenja se javljaju u obliku glikozilovanih derivate antocijanidina, pri čemu je malvidin-3-O-glikozid najzastupljeniji antocijan u vinima dobijenim od sorti Cabernet Sauvignon i Merlot.

Stabilnost antocijana u vinu uslovljena je pre svega pH vrednošću sredine, kao i prisustvom sumpor-dioksida, kopigmentacije i formiranja polimernih pigmentata tokom procesa starenja. Razumevanje hemije antocijana ključno je za interpretaciju boje i dugotrajnosti vina.

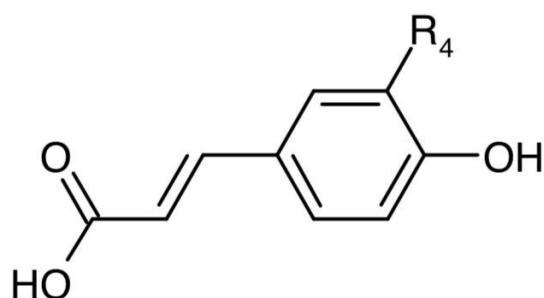
Antocijanini grožđa postoje kao 3-monoglukozidi pet antocijanidina: cijanidin, delpinidin, peonidin, petunidin i malvidin (Slika 4). Deo glukoze antocijanini mogu biti nesupstituisani ili acilovani kao estri sirćetne kiseline, p-kumarinske kiseline ili kafeinske kiseline. Iako profili antocijanina mogu veoma varirati između sorti grožđa, malvidin-3-glukozid je tipično najdominantniji antocijanin. Prijavljeni nivoi antocijana u crvenom grožđu kreću se od 300 do 7500 mg/kg, ali nivoi veoma variraju u zavisnosti od sorte, zrelosti, godine proizvodnje i uslovi životne sredine (Mazza 1995). Nivo antocijana u vinu pokazuje izraženu varijabilnost u zavisnosti od sorte grožđa i starosti vina. U mladim vinima njihova koncentracija se najčešće kreće u širokom opsegu, približno od 100 do 1500 mg/L (Ribereau-Gayon i sar., 2006). S obzirom na to da su antocijani hemijski vrlo reaktivna jedinjenja, tokom procesa odležavanja dolazi do njihovog postepenog opadanja usled različitih transformacija i reakcija, pa se u starijim vinima njihova koncentracija može smanjiti na svega 0–50 mg/L (Ribereau-Gayon i sar., 2006).



<b>Antocijanidin</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Cijanidin	OH	H
Delpinidin	OH	OH
Peonidin	OMe	H
Petunidin	OMe	OH
Malvidin	OMe	Ome



**R<sub>3</sub> Acilacija**  
sirćetna kiselina



**R<sub>4</sub>=H: p-kumarinska kiselina**  
R<sub>4</sub>=OH: kafeinska kiselina

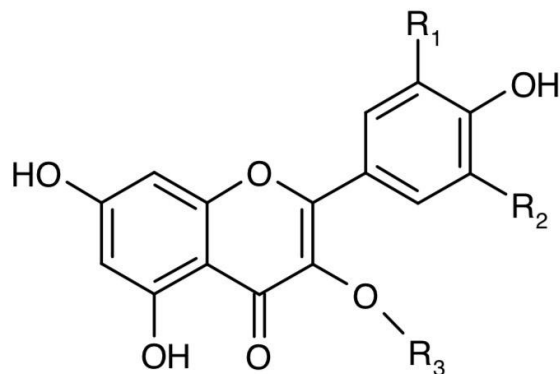
**Slika 4.** Hemijske strukture flavilijumskog oblika antocijanidina u grožđu

Razlike u supstitucijama na B prstenu antocijana rezultiraju razlike u njihovim svojstvima boje. Di-supstituisani antocijanini (Ci3G i Pn3G) imaju maksimume apsorpcije na nešto nižim talasnim dužinama od tri supstituisanih antocijanina (Dl3G, Pt3G i Mv3G) i stoga imaju malo više narandžasti ton u boju (Cabrita et al. 2000). Neki autori su izvestili da molar apsorpcije različitih antocijana ponekad variraju za faktor dva između različitih antocijana (Giusti et al. 1999; Cabrita et al. 2000). Međutim, nedavno je otkriveno da postoje samo male razlike (10%) između molara apsorpcije različitih antocijana i da su prethodno prijavljene varijacije može biti posledica nečistoća u uzorcima antocijanina (Jordheim et al. 2007). Prosek prijavljeno je da molarna apsorpcija iznosi 22000 L/(cm·mol) za antocijanidin-3- monoglikozidi u vodenom rastvoru na pH 1.

### 2.4.3. Flavonoli

U bobici grožđa flavanoli (Slika 5.) se najčešće javljaju u obliku glikozida osnovnih flavonolnih jedinjenja, pri čemu su najzasupljeniji derivati kvarcetina, mircetina i kamferola. Ova jedinjenja su pretežno lokalizovana u pokožici grožđa, dok su u ostalim delovima bobice prisutna u znatno manjim količinama (Ribereau-Gaion i Glories 1987; Castillo-Munoz et al. 2007). Usled

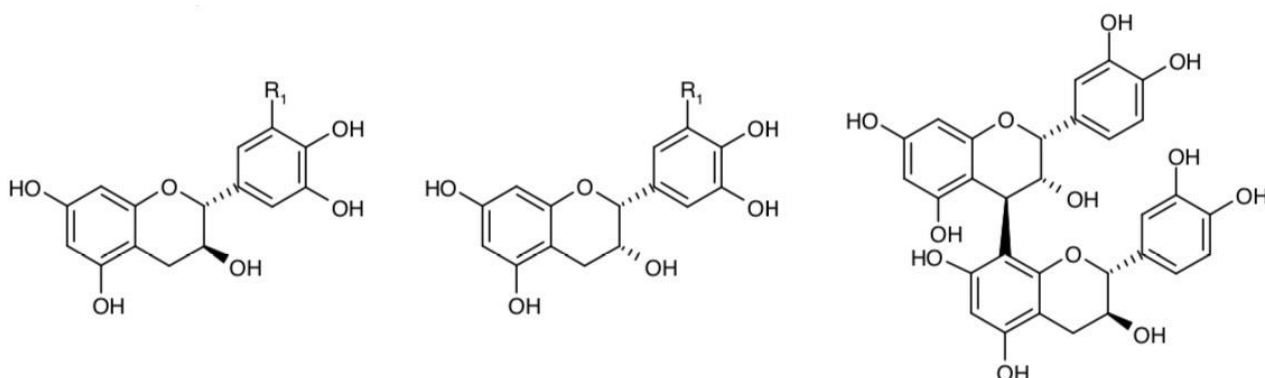
hidrolize glikozidne veze tokom proizvodnje vina, takođe neglikozilovani flavonoli se nalaze u vinima (Schwarz et al. 2005). Ukupni nivoi flavonola u grožđu iznose između 129 i 346  $\mu\text{mola/kg}$  (što odgovara između 80 i 210 mg ekvivalenta rutina/kg) pokriva 7 različitih sorta crvenog grožđa i između 28 i 377  $\mu\text{mol/L}$  (što odgovara 17-230 mg rutinskih ekvivalenta/l) u crnom vinu iz 10 različitih sorti grožđa (Castillo-Munoz et. al. 2007).



Flavonoli	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
kamferol	H	H	H
kvarcetin	OH	H	H
mircetin	OH	OH	H
izohamnetin	OMe	H	H
laricitrin	OH	Ome	H
siringetin	OMe	Ome	H

**Slika 5.** Hemijske strukture prisutnih flavonola u vinu. U grožđu su flavonoli prisutni kao glikozidi (R<sub>3</sub> = ostatak šećera), npr. Za rutin R<sub>3</sub> = ramnozilglukozid.

Flavanoli (+)-katehin i (-)-epikatehin su najčešći monomeri flavanola i uglavnom se nalaze u semenkama i kožici grožđa (Slika 6). Manje zastupljeni flavanoli (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin se nalaze u ljuski grožđa (Gonzalez-Manzano et al. 2004). Tipični nivoi monomera su flavanoli u komercijalnim crvenim vinima između 30 i 100 mg/L (Umetnost i dr. 2000).



R<sub>1</sub>=H: (+)-katehin  
R<sub>1</sub>=OH: (+)-galokatehin

R<sub>1</sub>=H: (-)-epikatehin  
R<sub>1</sub>=OH: (-)-epigalokatehin

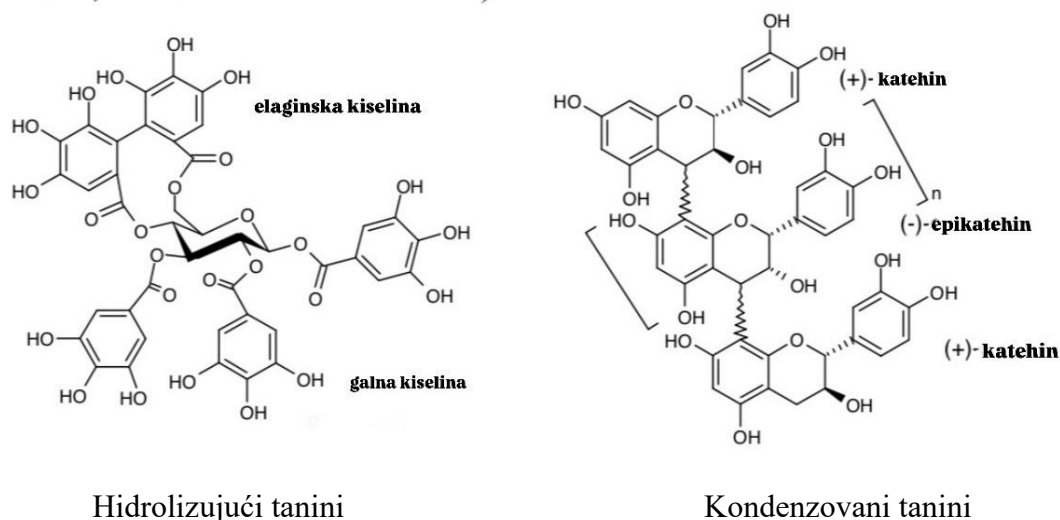
procijanidin B1

**Slika 6.** Hemijske strukture monomernih flavanola i dimernog flavanola (procijanidin B1)

Oligomerni flavanoli se sastoje od gradivnih blokova monomernih flavanola kao što je ilustrovano za procijanidin B1 (Slika 6). Brojni oligomerni flavanoli su identifikovani u grožđu i vinima i termin oligomerni se obično koristi za flavonole koji se sastoje od dve do pet monomernih jedinica (Monagas et al. 2005). Flavanoli doprinose gorčini vinima (kao i grožđu) (Peleg et al. 1999).

#### 2.4.4. Tanini

Tanini su najzastupljenija klasa fenola u grožđu i crnim vinima (Kennedi et. al. 2006b) i igraju važnu ulogu u stabilnosti boje i osobinama osećaja vina u ustima (Gavel 1998, Kennedi et al. 2006a, Singleton i Trousdale 1992). Sposobnost tanina da se veže sa proteinima prisutnim u pljuvački je veoma povezan sa astringentnim osećajem crnog vina (Gavel 1998). Tanini se obično klasifikuju kao bilo kondenzovani tanini ili tanini koji se hidrolizuju (Slika 7). Kondenzovani tanini su oligomerna i polimerna jedinjenja sastavljena od flavanolnih jedinica i potiču pre svega iz semena i ljuske grožđa, dok hidrolizujući tanini uglavnom potiču od hrastovine i predstavljaju estre galne kiseline ili glukoze (Edelmann i Lendl 2002, Herderich i Smith 2005).



**Slika 7.** Primeri hemijskih struktura kondenzovanih i hidrolizujućih tanina

Reakcije između tanina i antocijana tokom starenja vina dovode do više stabilnih pigmenta, a sugerise se da su ovi konjugati barem delimično odgovorni za stabilnost boje crnog vina (Cheinier et al. 2006). Nivoi tanina u crnim vinima mereni taloženjem proteina (Harbertson et al. 2003) variraju od samo 30 do više od 1500 mg katehina ekvivalenti/L (Skogerson et al. 2007; Fernandez i Agosin 2007; Harbertson 2003; Versari et al. 2006). Nivoi tanina mereni drugim metodama mogu

dati prilično različite rezultate, prema specifičnosti metode prema taninima i na jedinice koje se koriste za izveštavanje o rezultatima.

#### 2.4.5. Neflavonoidni fenoli

Neflavonoidna fenolna jedinjenja obuhvataju relativno jednostavne molekule koji se u vinu javljaju u slobodnom obliku ili kao estri. U ovu grupu spadaju:

Fenolne kiseline, koje se dalje dele na:

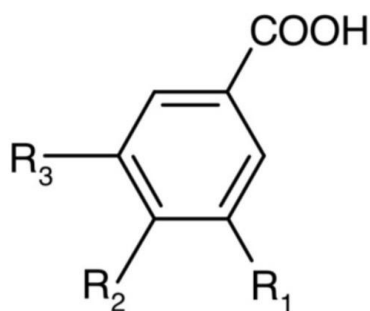
- hidroksibenzoeve kiseline (galna, vanilinska, siringinska),
- hidroksicimetne kiseline (kafeinska, p-kumarna, ferulinska).

Stilbeni, među kojima je najznačajniji trans-resveratrol.

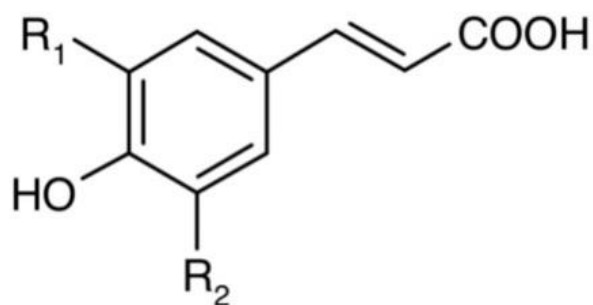
Među neflavonoidnim fenolnim jedinjenjima prisutnim u grožđu i vinu, najzastupljeniju grupu čine fenolne kiseline i njihovi različiti derivati (Slika 8). U grožđu dominiraju hidroksicinamatni estri vezani za vinsku kiselinu, koji se pretežno nalaze u pulpi i pokožici bobice (Monagas et al., 2005; Adams, 2006).

Tokom procesa vinifikacije i sazrevanja vina, usled hidrolitičkih reakcija, dolazi do oslobađanja slobodnih fenolnih kiselina, uključujući galnu kiselinu, kao i hidroksicinaminske derivate koji mogu nastati razgradnjom estarskih oblika (Ribereau-Gayon et al., 2006).

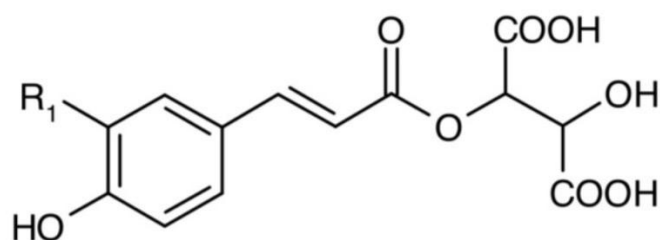
U crvenim vinima ukupna koncentracija fenolnih kiselina obično se kreće u opsegu od približno 100 do 200 mg/L (Ribereau-Gayon et al., 2006).



<b>Benzoeva kiselina</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	H	OH	H
protokatehinska kiselina	OH	OH	H
vanilinska kiselina	Ome	OH	H
galna kiselina	OH	OH	OH



<b>Hidroksicinamati</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	H
kafeinska kiselina	OH	H
ferulinska kiselina	OMe	H
sinapska kiselina	OMe	OMe



<b>Hidroksicinamidni vinski estri</b>	<b>R<sub>1</sub></b>
kutarična kiselina	H
kaftarinska kiselina	OH
fertarna kiselina	OMe

**Slika 8.** Hemijske strukture fenolnih kiselina prisutnih u grožđu i vinskim proizvodima

Znatan deo neflavonoidnih vinskih fenola može da potiče od upotrebe hrasta tokom starenja vina (Zoecklein et al. 1995). Druge klase neflavonoidni fenoli uključuju stilbene i isparljive fenole, koji su važni za aromu i antioksidativna svojstva vina, ali su prisutni u veoma malim količinama (Monagas et al. 2005).

#### 2.4.6. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline predstavljaju značajan deo ukupnog fenolnog sadržaja vina i često se koriste kao indikatori porekla i tehnoloških postupaka. Hidroksibenzojeve kiseline su uglavnom povezane sa degradacijom tanina i lignina, dok hidroksicimetne kiseline potiču iz metabolizma fenilpropanoidnog puta.

Fenolne kiseline u vinu se dalje dele na hidroksibenzojevi hidroksicimetne kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline, uključujući galnu, vanilinsku i siringinsku kiselinu, predstavljaju derivate benzojeve kiseline koji se razlikuju po vrsti i položaju supstituenata na aromatičnom prstenu. Galna kiselina je jedna od najznačajnijih predstavnika ove grupe i često se koristi kao referentni standard u određivanju ukupnog sadržaja fenola.

Hidroksicimetne kiseline, među kojima se izdvajaju kafeinska, ferulinska i p-kumarna kiselina, prisutne su u grožđu i vinu najčešće u esterifikovanom obliku, vezane za vinsku kiselinu. Ove kiseline imaju izražen antioksidativni potencijal i učestvuju u reakcijama oksidacije i polimerizacije tokom odležavanja vina.

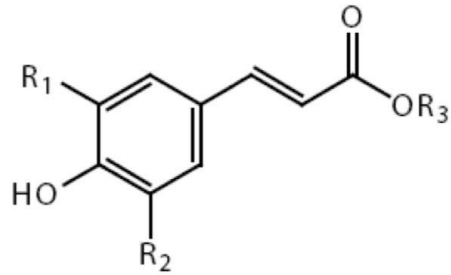
Fenolne kiseline imaju značajnu ulogu u stabilnosti boje vina i predstavljaju važne prekursore u formiranju složenijih fenolnih struktura tokom tehnoloških procesa.

Fenolne kiseline u grožđu i vinu obuhvataju hidroksi i metoksi derivate benzojeve i cimetne kiseline, koji predstavljaju važne komponente neflavonoidne frakcije fenola. U grupu derivata benzojeve kiseline ubrajaju se vanilinska, galna, p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska i elaginska kiselina, dok su među derivatima cimetne kiseline prisutne trans-kafena, trans-p-kumarna, trans-ferulna i hlorogena kiselina. Pored toga, u grožđu se nalaze i estarski oblici cimetnih i vinskih kiselina, kao što su cis- i trans-kutarna, trans-kaftarna, trans-fertarinska i sinapinska kiselina.

Ova jedinjenja mogu biti prisutna u različitim hemijskim oblicima, uključujući glikozidne derivate, koji se tokom kiselinske hidrolize mogu osloboditi u slobodnu formu, dok se estarski oblici razlažu u alkalnim uslovima. Posebno značajni su estri vinske kiseline, koji doprinose sklonosti šire ka brzom enzimskom i hemijskom tamnjenju, usled njihove visoke reaktivnosti i podložnosti oksidacionim procesima (Tian i sar., 2009).

Hidroksicimetne kiseline imaju značajnu ulogu i u formiranju boje crvenih vina, jer njihova oksidacija može dovesti do stvaranja žućkastih pigmenata. Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina u velikoj meri zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu, pri čemu se galna kiselina, zbog prisustva tri hidroksilne grupe, smatra jednim od najefikasnijih prirodnih antioksidanasa.

Pored toga, fenolne kiseline ispoljavaju niz bioloških efekata, među kojima je posebno značajan uticaj na procese lipidne peroksidacije, zbog čega se istražuju kao potencijalni prirodni konzervansi i antiinflamatorni agensi (Bravo, 1998; Meyer i sar., 1997; Cushnie i Lamb, 2011; Tian i sar., 2009).



<b>Hidroksicimetne kiseline</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<i>p</i> -kumarna kiselina	H	H	OH
Kafena kiselina	OH	H	OH
Ferulna ferulna	OCH <sub>3</sub>	H	OH
Sinapinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

**Slika 9.** Struktura hidroksicimetnih kiselina

#### 2.4.7. Stilbeni i resveratrol

Stilbeni su relativno mala, ali biološki veoma značajna grupa fenolnih jedinjenja u vinu. Najpoznatiji je trans-resveratrol, prisutni su u relativno niskim koncentracijama, ali privlače veliku pažnju zbog izražene biološke aktivnosti. Njihova sinteza u grožđu često je povezana sa stresnim uslovima i odbrambenim mehanizmima biljke.

Resveratrol je predmet intenzivnih istraživanja zbog potencijalnih zdravstvenih efekata, uključujući antioksidativno, antiinflamatorno i kardioprotektivno delovanje. Iako je njegova koncentracija u vinu niža u poređenju sa flavonoidima, njegov doprinos biološkoj aktivnosti vina je značajan zbog visoke reaktivnosti i specifičnih mehanizama delovanja.

Biosinteza stilbena u grožđu povezana je sa odgovorom biljke na stresne uslove, kao što su patogeni i UV zračenje, što dodatno povezuje terroir i uslove gajenja sa bioaktivnim potencijalom vina.

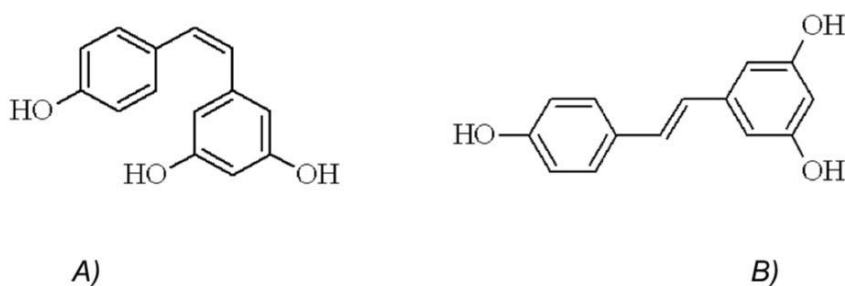
Stilbeni predstavljaju grupu fenolnih jedinjenja kod kojih su dva aromatična prstena povezana etenskim ili etanskim mostom, što ovu klasu strukturno izdvaja u odnosu na ostale polifenole (Camont i sar., 2005). U ovu grupu spadaju različiti oblici resveratrola (cis i trans), piceid u cis i trans formi, kao i drugi derivati poput astringina, astilbina i viniferina. Među njima, trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) se izdvaja kao najznačajniji predstavnik u vinu, pre svega zbog izraženih bioloških svojstava (Baxter, 2008; Docherty i sar., 2001; Jeandet i sar., 1991; Mark i sar., 2005).

Biosinteza resveratrola u grožđu predstavlja odbrambeni odgovor biljke na različite stresne uslove. Njegova sinteza se pojačava u slučaju infekcija izazvanih patogenim plesnima, kao i pod uticajem abiotičkog stresa, posebno UV zračenja (Adrian i sar., 2000). Smatra se da UV-B zračenje

stimuliše aktivnost enzima uključenih u put biosinteze stilbena, čime se povećava produkcija ovih zaštitnih jedinjenja (Cantos i sar., 2000; Falquéra i sar., 2012).

U grožđu je dominantan trans-resveratrol, koji se može javiti u slobodnom obliku ili kao glikozid (piceid). Najveće koncentracije nalaze se u pokožici bobice, dok su u manjim količinama prisutni i u semenkama i peteljkovini, pri čemu njihov sadržaj zavisi od sorte i uslova gajenja (Burns i sar., 2002; Melzoch i sar., 2001; Soleas i sar., 1995).

Tokom alkoholne fermentacije dolazi do povećanja ekstrakcije resveratrola, pri čemu je njegova koncentracija u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem etanola. Dodatno, tokom malolaktične fermentacije može doći do oslobađanja resveratrola iz njegovih glikozidnih oblika, što rezultira povećanjem njegove ukupne koncentracije u vinu. U pojedinim studijama zabeležene su više vrednosti resveratrola u vinima sorte Pinot Noir poreklom iz Bordoa u poređenju sa drugim crvenim vinima (Jeandet i sar., 1995).



**Slika 10.** Strukturni prikaz cis-i trans- izomera resveratrola (3,5,4'-trihidroksistilben)

## 2.5. Antioksidanti i antioksidaciona aktivnost vina

Biološki antioksidanti najčešće se definišu prema Halliwell-u (1990) kao jedinjenja koja, iako prisutna u malim količinama u odnosu na supstrat koji podleže oksidaciji, mogu značajno usporiti ili sprečiti njegove oksidativne promene. Njihovo delovanje zasniva se na različitim mehanizmima, među kojima su najvažniji sposobnost neutralizacije slobodnih radikala kroz donaciju elektrona ili atoma vodonika peroksilnim i hidroksilnim radikalima, odnosno stabilizacija nastalih reaktivnih vrsta (Bragadóttir, 2001).

Pored toga, antioksidanti mogu delovati i tako što vezuju jone metala, čime onemogućavaju katalitičko učešće metala u reakcijama koje vode ka stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta i iniciranju oksidacije lipida (Vaya i sar., 2001). Dodatni mehanizmi uključuju razgradnju hidroperoksida, uklanjanje singletnog kiseonika, kao i ispoljavanje sinergističkog delovanja sa drugim antioksidativnim jedinjenjima (Pokorny, 2001).

Prema klasifikaciji koju su dali Shi i saradnici (2001), antioksidansi se, u zavisnosti od mehanizma delovanja i mesta aktivnosti u organizmu, mogu podeliti na preventivne, „reparacione“ i „hvatače“ slobodnih radikala (scavenger antioksidante).

Preventivni antioksidansi sprečavaju nastanak slobodnih radikala i inicijaciju lančanih reakcija peroksidacije lipida. U ovu grupu spadaju enzimski sistemi kao što su superoksid

dismutaza, katalaza i glutathion-peroksidaza, zatim proteini koji vezuju jone metala (npr. transferin, ceruloplazmin, albumin, mioglobin), kao i sistemi koji razgrađuju reaktivne forme kiseonika (Shi i sar., 2001; Vaya i sar., 2001).

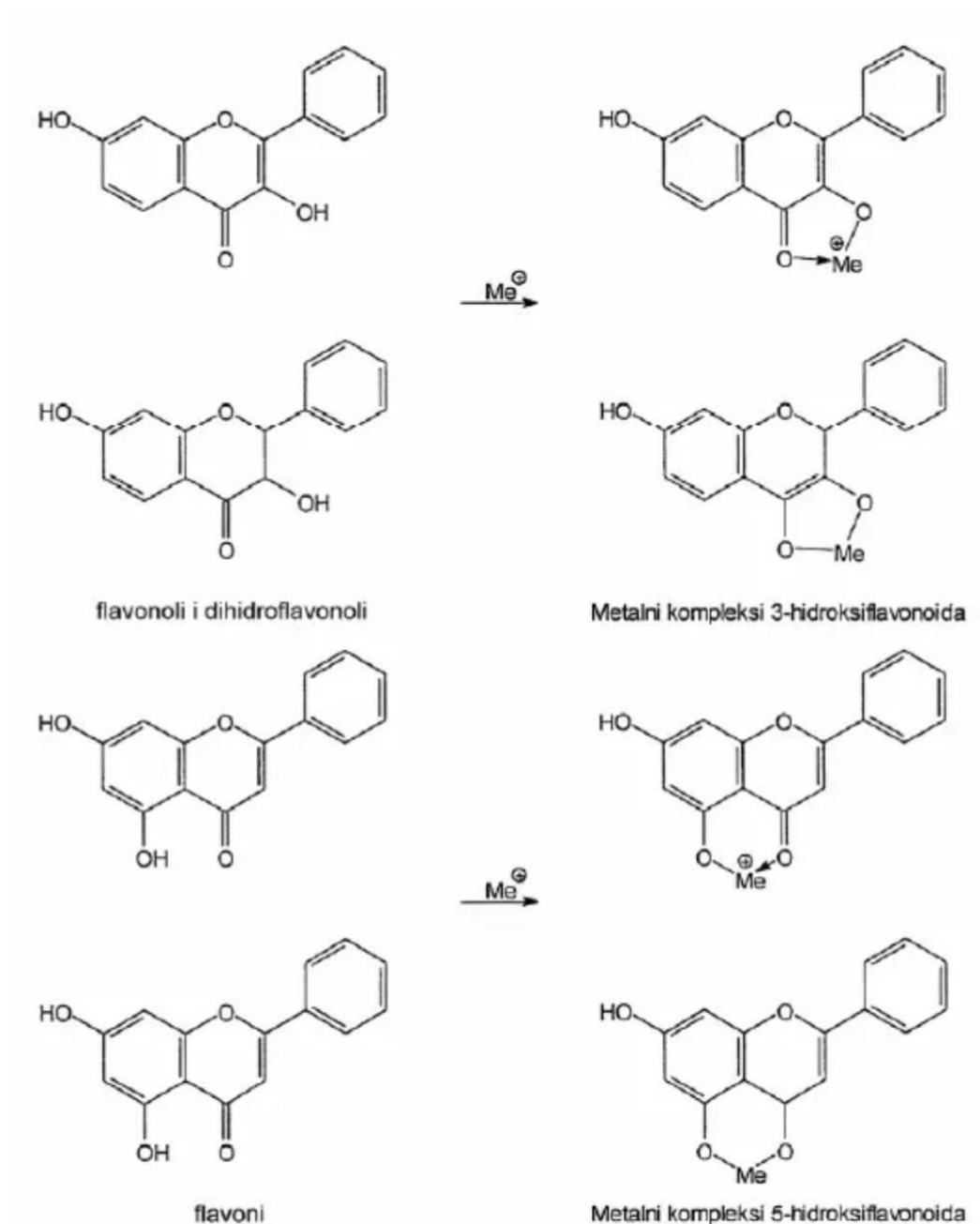
„Scavenger“ antioksidanti deluju tako što direktno reaguju sa slobodnim radikalima, čime prekidaju lančane reakcije oksidacije i sprečavaju njihovo dalje širenje. Ovoj grupi pripadaju i vodorastvorni i lipidno rastvorni antioksidansi. U vodorastvorne se ubrajaju vitamin C, glutathion, bilirubin, albumin i određena polifenolna jedinjenja, dok lipidno rastvorne obuhvataju vitamine A i E, karotenoide i pojedine polifenole (Vaya i sar., 2001; Percival, 1998).

Treću grupu čine „reparacioni“ antioksidansi, koji ne deluju na nastanak radikala, već učestvuju u popravci i uklanjanju već nastalih oštećenja biomolekula nastalih usled oksidativnog stresa. U ovu grupu se ubrajaju enzimi uključeni u reparaciju DNK, proteaze, fosfolipaze i različiti transferazni sistemi.

Sa aspekta porekla, antioksidansi se dele na endogene i egzogene. Endogeni antioksidansi se sintetišu u organizmu i uključuju enzimске i neenzimске sisteme kao što su SOD, katalaza, glutathion-peroksidaza, NADPH, koenzim Q10, glutathion, lipoična kiselina, kao i proteini koji učestvuju u transportu i skladištenju metala (ferritin, transferin, ceruloplazmin). Njihova aktivnost često zavisi od prisustva esencijalnih mikroelemenata poput Se, Cu, Zn i Mn kao kofaktora enzima (Percival, 1998).

Egzogeni antioksidansi se unose ishranom ili putem suplementacije, a uključuju vitamin C, vitamin E, karotenoide (npr.  $\beta$ -karoten), likopen, kao i brojne polifenole, uključujući flavonoide, fenolne kiseline i proantocijanidine (Percival, 1998).

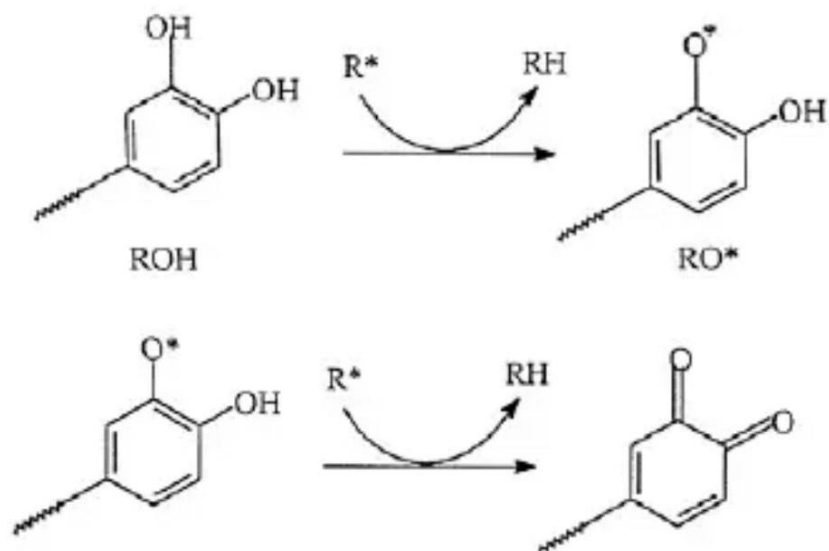
Posebno značajnu grupu egzogenih antioksidanasa predstavljaju polifenoli, čija antioksidativna aktivnost u velikoj meri zavisi od njihove hemijske strukture. Ključni strukturni faktori uključuju broj i položaj hidroksilnih grupa, prisustvo dvostruke veze između C2 i C3 atoma, keto grupu na C4 položaju, kao i eventualne supstitucije poput metoksi i šećernih ostataka (Heim, 2002; Pietta, 2000). Dodatno, flavonoidi mogu ispoljavati antioksidativno dejstvo i putem keliranja metalnih jona, pri čemu ulogu imaju 3'- i 4'-hidroksilne grupe, kao i kombinacije hidroksilnih i keto funkcionalnih grupa u strukturi molekula (Pokorny, 2001; Hudson i sar., 1983).



**Slika 11.** Mehanizam heliranja metalnih jona kod flavonoida

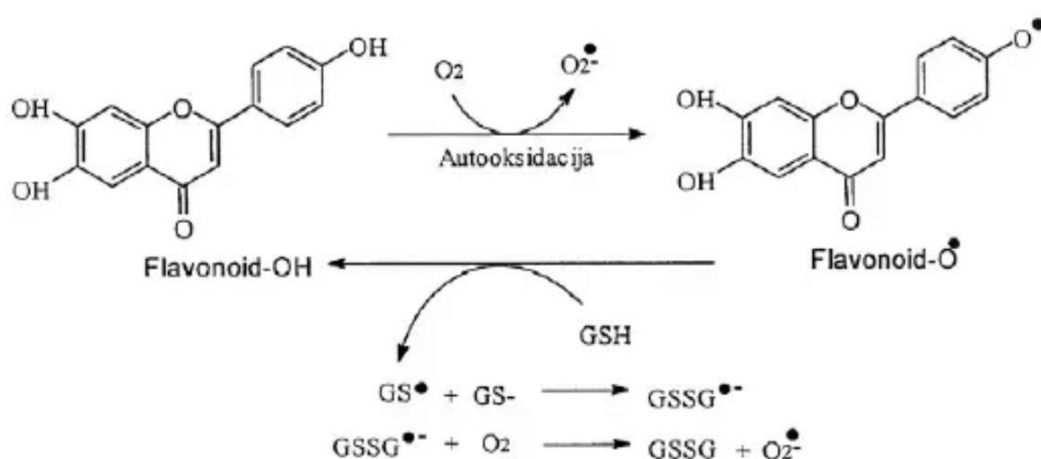
Flavonoidna jedinjenja ispoljavaju antioksidativno delovanje u različitim sredinama, uključujući i vodene i lipidne sisteme. Njihova efikasnost se dovodi u vezu sa relativno niskim redoks potencijalom (0,23–0,75 V), što omogućava da redukuju različite reaktivne radikale ( $R\bullet$ ) sa višim redoks potencijalom (2,13–1,0 V), kao što su superoksidni anjon radikal, peroksilni, alkoksilni i hidroksilni radikali, putem doniranja atoma vodonika.

Nastali fenoksilni (aroilni) radikal može dalje stupati u reakcije sa drugim radikalnim vrstama, pri čemu se formiraju stabilniji oksidacioni proizvodi, najčešće hinonske strukture (Slika 12) (Pietta, 2000).



**Slika 12.** Mehanizam donacije atoma vodonika kod flavonoida

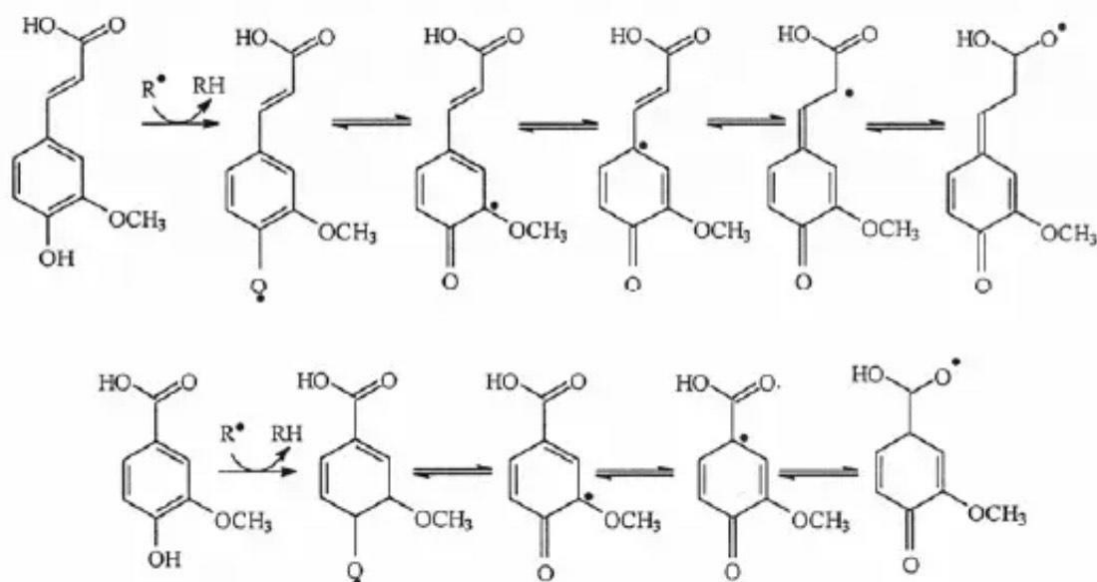
Pod određenim uslovima oksidativnog stresa, flavonoidi mogu ispoljiti i prooksidativno delovanje, pri čemu umesto neutralizacije radikala mogu doprineti nastanku reaktivnih radikalnih vrsta. Mehanizam ovog prooksidativnog efekta flavonoida prikazan je na Slici 13 (Rietjens i sar., 2002).



**Slika 13.** Šematski prikaz prooksidativnog efekta flavonoida

Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina u velikoj meri zavisi od broja hidroksilnih supstituenata u molekulu, pri čemu povećanje njihovog broja obično dovodi do izraženijeg

antioksidativnog efekta derivata fenolnih kiselina. Prisustvo karboksilne grupe u strukturi derivata benzoeve kiseline, usled svojih elektron-akceptorskih svojstava, može smanjiti sposobnost molekula da donira atom vodonika iz hidroksilnih grupa. U poređenju sa njima, hidroksi derivati cimetine kiseline najčešće pokazuju viši antioksidativni potencijal u odnosu na odgovarajuće derivate benzoeve kiseline (Rice-Evans i sar., 1996). Šematski prikaz mehanizma antioksidativnog delovanja derivata benzoeve i cimetine kiseline dat je na Slici 14 (Zhou i sar., 2006).



**Slika 14.** Rezonantna stabilizacija fenoksilnih radikala derivata cimetine i benzoeve kiseline

Brojna istraživanja ukazuju da biološka aktivnost flavonoida i drugih fenolnih jedinjenja u velikoj meri zavisi od njihove hemijske strukture, kao i od sposobnosti učestvovanja u oksidoreduktivnim reakcijama, čime doprinose zaštiti organizma od oksidativnog stresa. Savremene studije pokazuju da određeni flavonoidi, uključujući kvercetin, mogu značajno doprineti ukupnom antioksidativnom kapacitetu, pri čemu se njihova aktivnost često poredi sa delovanjem vitamina E (van Acker i sar., 1996).

Hemijska i biološka ispitivanja crvenih vina potvrđuju da su fenolna jedinjenja ključni nosioci njihovih antioksidativnih, antiinflamatornih i potencijalno protektivnih efekata (German i Walzem, 2000; Havsteen, 2002; Macheix i sar., 1990; Pereira i sar., 2009; Shahidi i Wanasundara, 1992). Ovi efekti proizilaze iz njihove sposobnosti da učestvuju u reakcijama neutralizacije slobodnih radikala, kao i u kompleksnim redoks procesima koji se odvijaju u prisustvu etanola i drugih komponenti vina.

Antioksidativni potencijal crvenih vina najčešće se povezuje sa prisustvom flavan-3-ola (katehin, epikatehin), oligomernih proantocijanidina, antocijana i pojedinih fenolnih kiselina. U brojnim studijama utvrđene su pozitivne korelacije između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta vina, pri čemu posebno značajnu ulogu imaju galna kiselina, katehin i epikatehin (Minussi i sar., 2003; Soleas i sar., 1997; Radovanović i sar., 2010a; Taha i sar., 2008).

Tokom sazrevanja vina dolazi do značajnih strukturnih promena fenolnih jedinjenja,

uključujući polimerizaciju i kondenzaciju tanina, što utiče na ukupni antioksidativni profil vina (Piljac i sar., 2005). Takođe, uslovi čuvanja, poput tipa sudova za odležavanje, mogu značajno uticati na stabilnost fenolnog sastava i ukupni antioksidativni kapacitet, pri čemu se u nekim studijama navodi veći potencijal vina odležavanih u hrastovim sudovima u odnosu na vino čuvano u bocama (Bartlome i sar., 1996; Vivas i Glories, 1996).

Farmakokinetička istraživanja ukazuju da se pojedina fenolna jedinjenja, uključujući fenolne kiseline, resveratrol i određene flavonoide, mogu relativno brzo apsorbovati i distribuirati u organizmu nakon oralnog unosa (Simonetti i sar., 2001; Soleas i sar., 2001). Eksperimentalni podaci takođe pokazuju da se proantocijanidini mogu distribuirati u različitim tkivima u kratkom vremenskom periodu nakon unosa, dok flavonoidi i antocijani mogu dostići ciljne organe u vrlo kratkom vremenu (Passamonti i sar., 2003; Youdim i sar., 2002).

Sa fiziološkog aspekta, flavonoidi mogu doprineti modulaciji različitih enzimskih sistema uključenih u inflamatorne procese i metabolizam histamina, što se povezuje sa njihovim potencijalnim gastroprotektivnim efektima (Curhan i sar., 1998). Pored toga, njihovo antioksidativno delovanje može doprineti smanjenju oksidacije LDL holesterola i povećanju HDL frakcije, što je povezano sa povoljnim efektima na kardiovaskularni sistem (Frankel i sar., 1995; Meyer i sar., 1997).

Brojna epidemiološka i eksperimentalna istraživanja posvećena su ispitivanju potencijalnih antikancerogenih efekata fenolnih jedinjenja iz vina, kao i njihovoj mogućoj ulozi u smanjenju rizika od različitih malignih oboljenja (Doll, 1990; Hertog, 1995; Hou, 2003; Olas i Wachowich, 2002; Soleas i sar., 2002).

Antioksidativni potencijal crvenih vina u najvećoj meri se povezuje sa prisustvom flavonoidnih i drugih fenolnih jedinjenja, pri čemu se u brojnim studijama ističe njihova ključna uloga u neutralizaciji slobodnih radikala i zaštiti biomolekula od oksidativnog oštećenja. Pojedina istraživanja ukazuju na postojanje pozitivne korelacije između ukupnog sadržaja fenola i ukupnog antioksidativnog kapaciteta vina, kao i između koncentracija pojedinačnih jedinjenja poput galne kiseline, katehina i epikatehina i njihove biološke aktivnosti.

Crvena vina pokazuju izražen inhibitorni efekat na oksidaciju LDL čestica, što se dovodi u vezu sa njihovim bogatim fenolnim sastavom. Međutim, doprinos pojedinačnih jedinjenja varira, pa su u različitim eksperimentalnim modelima galna, kafena i druge fenolne kiseline, kao i flavonoidi poput kvercetina i rutina, pokazali različit stepen sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Rezultati pojedinih studija ukazuju da se ne može jednostavno uspostaviti linearna veza između koncentracije pojedinačnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti, već da značajnu ulogu ima njihova međusobna interakcija.

Dodatna istraživanja primenom različitih analitičkih tehnika pokazala su da i fenolne kiseline u esterifikovanom obliku mogu imati izmenjena antioksidativna svojstva u odnosu na slobodne forme, pri čemu struktura značajno utiče na reaktivnost prema različitim vrstama reaktivnih kiseoničnih vrsta. Takođe je uočeno da pojedine fenolne frakcije, posebno antocijani i proantocijanidini, doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti, ali njihov pojedinačni doprinos zavisi od matriksa vina i prisustva drugih komponenti.

S obzirom na kompleksnost sastava, sinergističko delovanje različitih grupa fenolnih jedinjenja smatra se jednim od ključnih faktora ukupnog antioksidativnog efekta vina. Kombinovani efekti flavonoida, fenolnih kiselina i drugih antioksidanasa često su izraženiji nego njihovo pojedinačno delovanje, što dodatno otežava precizno definisanje dominantnih nosilaca aktivnosti.

Tokom tehnoloških procesa proizvodnje i odležavanja vina dolazi do značajnih promena u fenolnom profilu, uključujući polimerizaciju, oksidaciju i kondenzaciju jedinjenja, što direktno utiče na njihovu stabilnost i biološku aktivnost. Pored toga, različiti tehnološki postupci vinifikacije, kao i uslovi skladištenja i tip sudova za odležavanje, mogu značajno modifikovati antioksidativni potencijal vina.

U celini posmatrano, antioksidativna svojstva crvenih vina predstavljaju rezultat složenih interakcija između brojnih fenolnih jedinjenja, njihovih strukturnih karakteristika i tehnoloških faktora, pri čemu sinergija između komponenti ima presudnu ulogu u ukupnom biološkom efektu.

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja je jedno od njihovih najvažnijih bioloških svojstava i osnovni razlog zbog koga se crveno vino smatra značajnim izvorom antioksidanasa u ljudskoj ishrani.

Antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja u vinu ogleda se u njihovoj sposobnosti da reaguju sa reaktivnim oblicima kiseonika i azota, pri čemu se ograničava ili usporava oksidativna degradacija biološki značajnih molekula. Ova aktivnost može se objasniti kroz nekoliko osnovnih mehanizama.

Jedan od najvažnijih mehanizama jeste doniranje atoma vodonika slobodnim radikalima, pri čemu nastaje stabilan fenoksilni radikal. Stabilnost ovog radikala dodatno je povećana rezonantnim delokalizovanjem elektrona u aromatičnom prstenu.

Drugi značajan mehanizam jeste transfer elektrona, gde fenolna jedinjenja deluju kao redukciona sredstva, neutrališući oksidativne agense. Ovaj mehanizam je naročito relevantan u metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti, kao što su FRAP i ABTS testovi.

Pored toga, fenolna jedinjenja mogu delovati i kao helatori metalnih jona, čime inhibiraju Fentonove reakcije i sprečavaju nastanak visoko reaktivnih hidroksilnih radikala.

Važno je naglasiti da se antioksidativna aktivnost vina ne može pripisati jednom mehanizmu, već predstavlja rezultat sinergijskog delovanja različitih fenolnih komponenti.

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i azota (RNS) predstavljaju nusprodukte normalnih metaboličkih procesa u organizmu, ali se mogu stvarati i pod uticajem različitih spoljašnjih faktora, kao što su zagađenje životne sredine, UV zračenje i različiti oblici stresa. Kada dođe do poremećaja ravnoteže između njihovog stvaranja i sistema za njihovo uklanjanje, razvija se oksidativni stres, koji se dovodi u vezu sa nastankom i progresijom brojnih hroničnih bolesti.

Fenolna jedinjenja vina ostvaruju antioksidativno delovanje putem višekomplementarnih mehanizama, koji se mogu svrstati u nekoliko osnovnih kategorija.

Najčešće primenjivane metode uključuju DPPH, ABTS i FRAP testove, koji omogućavaju

kvantifikaciju antioksidativnog potencijala vina (Somers T.C., Evans M.E., 1977, Clifford M.N., 2004).

Više naučnih studija ukazuje na izraženu povezanost između ukupne koncentracije fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta crvenih vina, pri čemu se flavonoidna jedinjenja posebno izdvajaju kao ključni nosioci ove aktivnosti (Waterhouse A.L., 2002).

## 2.6. Reaktivne vrste i oksidativni procesi u biološkim sistemima

Slobodni radikali predstavljaju atome, molekule ili jonske vrste koje u svojoj elektronskoj strukturi sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Prisustvo nesparenog elektrona uslovljava njihovu izraženu hemijsku reaktivnost i nestabilnost. U zavisnosti od ukupnog naelektrisanja, radikalske vrste mogu imati pozitivno ili negativno naelektrisanje, pri čemu se razlikuju radikal-katjoni i radikal-anjoni. Nespareni elektron može biti lokalizovan na atomima različitih elemenata, zbog čega se izdvajaju reaktivne vrste kiseonika, azota, hlora i drugih elemenata.

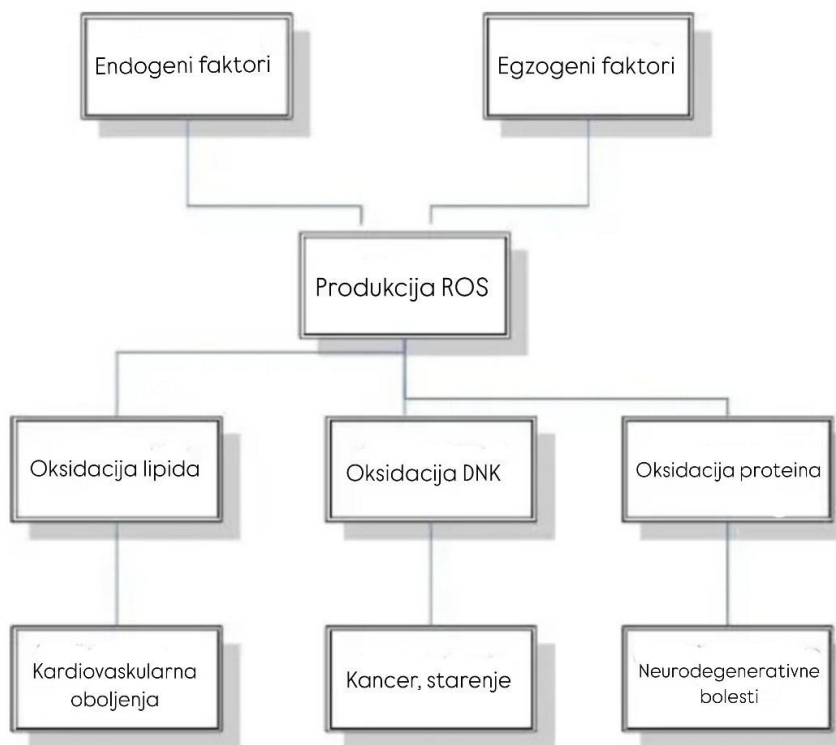
Reaktivne vrste obuhvataju i radikalske i neradikalske oblike. Radikalske vrste poseduju nesparen elektron, dok neradikalske oksidativne komponente nemaju slobodan elektron, ali lako učestvuju u reakcijama koje dovode do formiranja slobodnih radikala. U biološkim sistemima poseban značaj imaju reaktivne vrste kiseonika (ROS, engl. reactive oxygen species), reaktivne vrste azota (RNS, engl. reactive nitrogen species) i reaktivne vrste hlora (RCS, engl. reactive chlorine species), koje su prikazane u Tabeli 1 (Halliwell i Whiteman, 2004).

**Tabela 1.** Pregled najznačajnijih reaktivnih radikalskih i neradikalskih vrsta

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Reaktivne vrste kiseonika	
superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$	vodonik peroksid, $H_2O_2$
hidroksil radikal, $OH^{\cdot}$	hipobromna kiselina, $HOBr$
hidroperoksil radikal, $HO_2^{\cdot}$	hiphlorna kiselina, $HOCl$
peroksil radikal, $RO_2^{\cdot}$	ozon, $O_3$
alkoksil radikal, $RO^{\cdot}$	singletni kiseonik, $^1\Delta_g O_2$
karbonatni radikal, $CO_3^{\cdot-}$	organski peroksid, $ROOH$
ugljenoksidni radikal, $CO_2^{\cdot-}$	peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
	peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
Reaktivne vrste hlora	
Atomski hlor, $Cl^{\cdot}$	hiphlorna kiselina, $HOCl$
	nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$
	hloramini
Reaktivne vrste azota	
azotmonoksidni radikal, $NO^{\cdot}$	azotasta kiselina, $HNO_2$
azotdioksidni radikal, $NO_2^{\cdot}$	nitrozo katjon, $NO^+$
	nitroksidni anjon, $NO^{\cdot-}$
	azot(IV)-oksid, $N_2O_4$
	azot(III)-oksid, $N_2O_3$
	peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
	peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
	nitronijum (nitril) katjon, $NO_2^+$
	alkilperoksinitriti, $ROONO$
	nitril (nitronijum) hlorid, $NO_2Cl$

Reaktivni slobodni radikali mogu nastati kroz veliki broj hemijskih reakcija koje se, prema mehanizmu odvijanja, najčešće svrstavaju u četiri osnovne grupe: oksido-redukzione reakcije, termolitičke procese, fotolitičke procese i dejstvo zračenja visoke energije (Piletić i sar., 1993).

U fiziološkim uslovima organizma stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i drugih slobodnih radikala nalazi se u dinamičkoj ravnoteži sa antioksidativnim zaštitnim sistemom. Oksidativni stres predstavlja stanje u kojem dolazi do poremećaja ove ravnoteže usled dominacije prooksidativnih faktora nad antioksidativnim mehanizmima odbrane (Halliwell, 1999; Zirojević i sar., 2002). U biološkim sistemima formiranje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja i slobodnih radikala može biti izazvano delovanjem endogenih faktora, kao što su enzimski prooksidativni sistemi, ćelijsko disanje i fagocitoza, ali i egzogenih uticaja poput jonizujućeg zračenja i zagađenog vazduha (Bagchi i Puri, 1998). Posledica oksidativnog stresa jesu oštećenja osnovnih biomolekula, što može doprineti razvoju brojnih patoloških stanja i oboljenja, među kojima su maligne bolesti, ateroskleroza, kardiovaskularna oboljenja, astma, dermatitis, artritis, gastritis, dijabetes, bolesti jetre i bubrega, različiti inflamatorni procesi, kao i neurodegenerativna oboljenja poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Slika 15.) (Kow, 1999; Lee i sar., 2004).

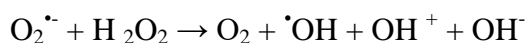


**Slika 15.** Uloga slobodnih radikala u razvoju različitih oboljenja

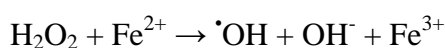
Tokom normalnih metaboličkih procesa u organizmu dolazi do kontinuiranog stvaranja određenih slobodnih radikala. Kod sisara se više od 90% kiseonika unetog disanjem u mitohondrijama redukuje do vode prihvatanjem četiri elektrona iz transportnog lanca elektrona respiratornog sistema (Acworth, 2003). Takođe, tokom fagocitoze dolazi do pojačanog stvaranja slobodnih radikala, pre svega superoksid anjon-radikala i vodonik-peroksida, u okviru procesa poznatog kao respiratorni prasak fagocitnih ćelija, koji predstavlja deo imunskog odgovora na prisustvo bakterija i virusa (Đorđević, 2000).

Perhidroksilni radikal ( $\text{HO}_2\bullet$ ), koji predstavlja protonovani oblik superoksid anjon-radikala ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, ali se može formirati i jednoelektronskom oksidacijom vodonik-peroksida. Značajne količine ovih reaktivnih vrsta nastaju u reakcijama koje katalizuju pojedine oksidaze, poput ksantin-oksidaze, kao i tokom fagocitnih procesa (Ohara i sar., 1993; Choi i sar., 2006).

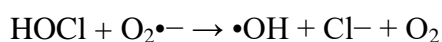
Hidroksil-radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) smatra se najreaktivnijom reaktivnom kiseoničnom vrstom i u najvećoj meri je odgovoran za citotoksično dejstvo kiseonika. Zbog izrazito velike reaktivnosti veoma brzo reaguje sa različitim biomolekulima, zbog čega mu je vreme poluživota izuzetno kratko i iznosi približno  $10^{-9}$  s. U ćelijama se hidroksil-radikal može formirati u uslovima pogodnim za odvijanje Haber–Vajsove reakcije:



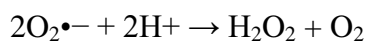
ili reakcija gvožđa sa vodonik-peroksidom:



Hidroksil-radikal može nastati i tokom fagocitoze, pod dejstvom  $\gamma$ -zračenja na molekul vode, kao i troelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija. Njegovo formiranje moguće je i iz hipohloraste kiseline prema sledećoj reakciji (Mimić-Oka i sar., 1999):



Iako vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nema karakter slobodnog radikala, svrstava se u reaktivne kiseonične vrste (Wu i Cederbaum, 2003). U poređenju sa ostalim intermedijerima redukcije kiseonika pokazuje najveću stabilnost i manju reaktivnost. Nastaje neposrednom dvoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon-radikala, kao i enzimskom dismutacijom superoksid anjon-radikala katalizovanom superoksid-dismutazom:



Proces formiranja vodonik-peroksida odvija se u različitim ćelijskim strukturama, uključujući peroksizome, mitohondrije, mikrozome i ćelijske membrane (Gatellier i sar., 1995). Singletni kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ) predstavlja veoma reaktivnu formu kiseonika koja može nastati enzimskim putem u prisustvu mijeloperoksidaze i laktoperoksidaze (Kanofsky i sar., 1988), ali i tokom procesa fagocitoze (Steinbeck i sar., 1992). Tokom lančanih reakcija oksidativne degradacije lipida formiraju se peroksilni i alkoksilni radikali ( $\text{RO}_2\bullet$  i  $\text{RO}\bullet$ ), koji učestvuju u daljem toku lipidne peroksidacije (Mimić-Oka i sar., 1999).

Oksidativni stres predstavlja stanje koje može izazvati oštećenja osnovnih biomolekula, uključujući ugljene hidrate, proteine, lipide i nukleinske kiseline, što za posledicu može imati različite poremećaje metaboličkih procesa, narušavanje ćelijske funkcije i konačno ćelijsku smrt (Malešević, 2002).

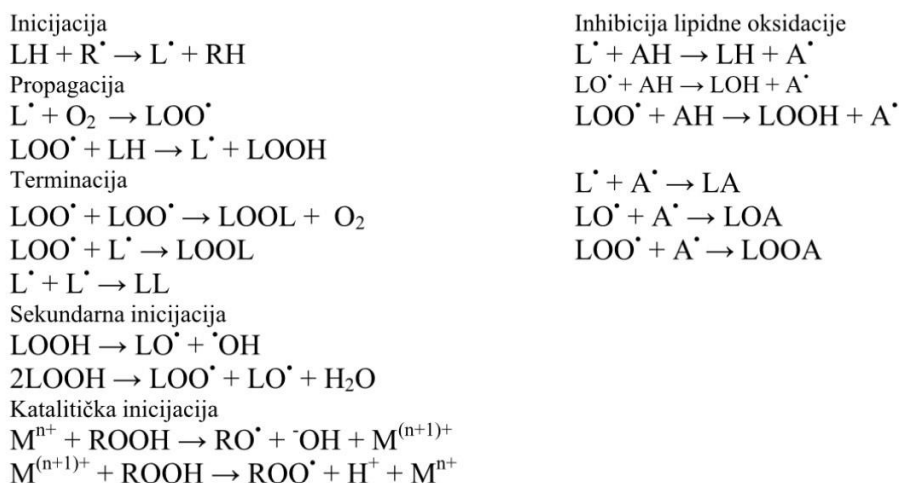
Proteini su prirodni makromolekuli izgrađeni od dugih polipeptidnih lanaca sastavljenih od aminokiselinskih ostataka međusobno povezanih peptidnim vezama. U organizmu imaju brojne

strukturne i funkcionalne uloge. Pojedini proteini učestvuju u izgradnji tkiva i ćelijskih struktura, kao što su kolagen, keratin, elastin i lipoproteini, dok drugi obavljaju specifične fiziološke funkcije, među kojima su transport kiseonika (hemoglobin), imunološka zaštita (antitela), koagulacija krvi (fibrinogen) i kontrakcija mišića (aktomiozinski sistem) (Piletić i sar., 1993). Oksidativne modifikacije proteina mogu dovesti do promena u signalnim putevima, poremećaja transdukcije signala, izmene enzimske aktivnosti i drugih važnih bioloških procesa (Hosseinian, 2006).

Lipidi predstavljaju značajnu grupu bioloških jedinjenja i mogu se podeliti na proste i složene lipide. Prosti lipidi sastoje se uglavnom od masnih kiselina i alkohola, najčešće glicerola, dok složeni lipidi u svojoj strukturi sadrže dodatne komponente, poput ostataka fosforne kiseline kod fosfolipida, ugljenih hidrata kod glikolipida ili sterolnih jedinjenja. Lipidi imaju ključnu ulogu u građi bioloških membrana, učestvuju u prenosu nervnih impulsa, regulišu propustljivost membrana, omogućavaju međučelijsku komunikaciju, služe kao energetska rezerva i pružaju mehaničku i termičku zaštitu organizma (Piletić i sar., 1993).

U uslovima oksidativnog stresa dolazi do oksidativnog oštećenja lipida prisutnih u ćelijskim membranama, lipoproteinima i drugim lipidnim strukturama. Posebno su podložni oksidaciji holesterol u membranama, kao i polinezasićene masne kiseline prisutne u fosfolipidima i glikolipidima (Abuja i sar., 2001). Proces lipidne oksidacije može se odvijati enzimskim putem, dejstvom enzima lipoksigenaza, ili neenzimskim mehanizmima. Pojačana lipidna oksidacija registrovana je kod brojnih patoloških stanja, uključujući kancerogenezu, aterosklerozu i neurodegenerativna oboljenja (Girotti, 1998).

Pored biološkog značaja, lipidna oksidacija predstavlja i jedan od osnovnih procesa odgovornog za kvarenje masti i ulja, što dovodi do smanjenja njihove nutritivne vrednosti, pojave neprijatnog ukusa i mirisa, kao i stvaranja potencijalno toksičnih jedinjenja. Ovaj proces podrazumeva reakcije slobodnoradikalskih i neradikalskih kiseoničnih vrsta sa lipidima, pri čemu dolazi do oksidativne degradacije nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Mehanizam lipidne oksidacije odvija se kroz složene lančane reakcije koje obuhvataju tri osnovne faze, dok je način delovanja antioksidanata prikazan na Slici 16 (Yanishlieva-Maslarova, 2001).



**Slika 16.** Faze lipidne peroksidacije i način delovanja antioksidativnih sistema

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) predstavlja osnovni molekul odgovoran za prenos i čuvanje naslednih informacija u ćeliji. Različite reaktivne vrste kiseonika i slobodni radikali mogu ispoljiti različite mehanizme delovanja i stepen toksičnosti prema DNK molekulu. Posebno značajna oštećenja izazivaju hidroksil-radikali, koji mogu reagovati kako sa azotnim bazama, tako i sa šećernom komponentom DNK.

Oštećenje dezoksiriboze započinje apstrakcijom vodonikovog atoma sa ugljenikovog atoma šećerne komponente, što dovodi do destabilizacije molekula DNK, prekida lanca i oslobađanja azotnih baza, uz istovremeno nastajanje malondialdehida (MDA). Među najčešćim oblicima oksidativnog oštećenja DNK izdvajaju se modifikacije baza, prekidi jednog ili oba lanca, gubitak baza, interakcije DNK sa proteinima, kao i reakcije sa produktima lipidne peroksidacije, uključujući MDA.

Delovanjem slobodnih radikala mogu nastati strukturne promene DNK koje dovode do pojave mutacija i drugih genetskih poremećaja. Ukoliko su zahvaćeni određeni protoonkogeni ili drugi regulatorni geni, takve promene mogu doprineti razvoju malignih transformacija ćelija i različitih degenerativnih procesa (Đorđević i sar., 2000).

### **2.6.1. Neutralizacija slobodnih radikala (HAT mehanizam)**

Jedan od osnovnih mehanizama antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja je direktna neutralizacija slobodnih radikala putem doniranja atoma vodonika, poznata kao mehanizam prenosa atoma vodonika (HAT – *Hydrogen Atom Transfer*).

U ovom mehanizmu, fenolna jedinjenja reaguju sa slobodnim radikalima tako što im predaju atom vodonika iz hidroksilne grupe, čime se radikal stabilizuje, dok fenolni molekul prelazi u relativno stabilan fenoksilni radikal. Stabilitnost nastalog fenoksilnog radikala uslovljena je delokalizacijom elektrona duž aromatičnog prstena, što sprečava dalje propagiranje lančanih oksidacionih reakcija.

Antiradikalska efikasnost ovog mehanizma u velikoj meri zavisi od broja i rasporeda hidroksilnih grupa u strukturi fenolnih jedinjenja. Molekuli koji sadrže veći broj ovih grupa, kao što su flavonoidi i galna kiselina, ispoljavaju znatno izraženiji kapacitet za neutralizaciju slobodnih radikala.

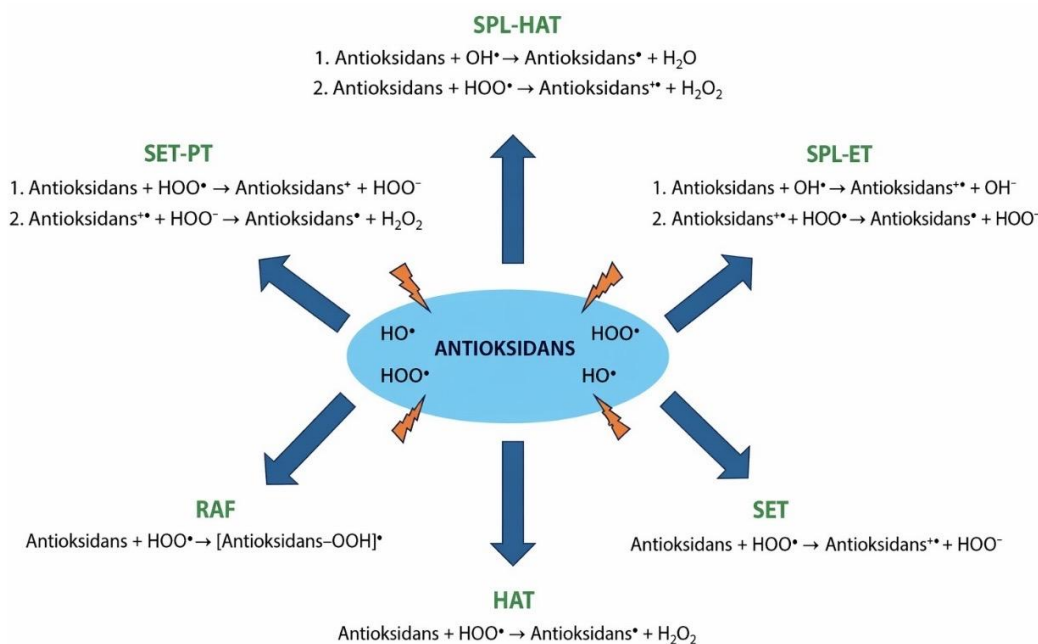
### **2.6.2. Mehanizam sekvencijalnog prenosa elektrona i protona (SET-PT)**

Mehanizam poznat kao sekvencijalni prenos elektrona i protona (Single Electron Transfer – Proton Transfer – SET-PT) odvija se kroz dva uzastopna koraka, pri čemu fenolno jedinjenje prvo predaje elektron reaktivnoj radikalnoj vrsti, a zatim dolazi do naknadnog odvajanja protona. U ovom procesu, fenolno jedinjenje donira elektron oksidativnom agensu, čime dolazi do njegove redukcije (Slika 17).

SET-PT mehanizam često se razmatra u kontekstu antioksidativnih testova zasnovanih na

prenosu elektrona, kao što su FRAP i ABTS metode, koje se široko primenjuju u ispitivanju antioksidativnog kapaciteta vina. Fenolna jedinjenja sa nižim oksidacionim potencijalom pokazuju veću sposobnost prenosa elektrona i, samim tim, višu antioksidativnu aktivnost.

HAT i SET mehanizmi se ne isključuju međusobno, već često deluju simultano, u zavisnosti od strukture fenolnog jedinjenja i uslova reakcije.



**Slika 17.** Šematski prikaz mehanizma uključenih u aktivnost uklanjanje slobodnih radikala kod antioksidansa

### 2.6.3. Mehanizam sekvencijalnog gubitka protona uz prenos elektrona (SPLET mehanizam)

Savremena istraživanja ukazuju na postojanje kombinovanog mehanizma antioksidativnog delovanja, poznatog kao SPLET (*Sequential Proton Loss Electron Transfer*). Ovaj mehanizam podrazumeva prvo gubitak protona iz fenolne hidroksilne grupe, a zatim prenos elektrona.

SPLET mehanizam je naročito izražen u sredinama sa višim pH vrednostima, gde deprotonacija fenolnih jedinjenja olakšava prenos elektrona. Ovaj mehanizam ima poseban značaj u biološkim sistemima, gde pH varijacije mogu uticati na dominantni put antioksidativnog delovanja.

SPLET mehanizam se često pokazuje kao energetski povoljniji u vodenim i alkoholnim sredinama, što ga čini posebno relevantnim za proučavanje antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja u vinu.

#### **2.6.4. Prooksidativni potencijal fenolnih jedinjenja**

Iako se fenolna jedinjenja uglavnom smatraju antioksidansima, u određenim uslovima ona mogu ispoljiti i prooksidativno delovanje. Ovo se najčešće dešava u prisustvu visokih koncentracija metalnih jona ili pri visokim koncentracijama samih fenolnih jedinjenja.

Prooksidativni efekti fenolnih jedinjenja mogu dovesti do stvaranja reaktivnih intermedijera, koji dalje učestvuju u oksidacionim procesima. Razumevanje ovog dualnog ponašanja fenolnih jedinjenja je od ključnog značaja za pravilnu interpretaciju njihovog biološkog delovanja.

U kontekstu vina, antioksidativni mehanizmi fenolnih jedinjenja doprinose ne samo potencijalnim zdravstvenim efektima, već i stabilnosti i dugovečnosti vina. Neutralizacija slobodnih radikala i heliranje metalnih jona usporavaju oksidativne procese tokom skladištenja i odležavanja vina, čime se očuvaju njegova senzorska svojstva.

Zbog toga je detaljno razumevanje antioksidativnih mehanizama fenolnih jedinjenja od suštinskog značaja za interpretaciju eksperimentalnih rezultata i evaluaciju kvaliteta crvenih vina.

### 3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Ova doktorska disertacija usmerena je na detaljno i sistematsko proučavanje fenolnog profila i antioksidativne aktivnosti crvenih vina sorti Cabernet Sauvignon i Merlot, poreklom iz različitih vinogradarskih oblasti Srbije i Slovenije. Istraživanje je usmereno ka boljem razumevanju hemijskog profila ovih vina, kao i utvrđivanju uticaja agroekoloških i tehnoloških faktora na njihov bioaktivni sastav i funkcionalna svojstva.

Poseban naučni doprinos ove studije ogleda se u integraciji hemijskih analiza i statističkog modelovanja, sa ciljem identifikacije ključnih parametara koji određuju antioksidativni kapacitet vina, kao i njihovog međusobnog odnosa sa sadržajem fenolnih jedinjenja.

Specifični ciljevi istraživanja uključuju:

- kvantifikaciju ukupnog sadržaja fenola u uzorcima vina primenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda, sa ciljem procene ukupnog fenolnog potencijala,
- identifikaciju i određivanje pojedinačnih fenolnih jedinjenja (flavonoida i neflavonoida) primenom savremenih instrumentalnih tehnika (HPLC-DAD i LC-MS/MS), čime se omogućava detaljna hemijska karakterizacija uzoraka,
- ispitivanje antioksidativne aktivnosti vina primenom više komplementarnih in vitro metoda (npr. DPPH, ABTS, FRAP), radi sveobuhvatne procene različitih mehanizama antioksidativnog delovanja,
- analizu uticaja sorte grožđa, geografskog porekla (terroir-a) i godine berbe na varijabilnost fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti vina,
- ispitivanje korelacionih odnosa između pojedinačnih i ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta, u cilju identifikacije najznačajnijih bioaktivnih komponenti odgovornih za funkcionalna svojstva vina,
- primenu multivarijantnih statističkih metoda (kao što su PCA, klaster analiza i korelaciona analiza) radi integracije i interpretacije kompleksnih podataka, kao i izdvajanja ključnih faktora koji diferenciraju uzorke po poreklu i sastavu.

Realizacijom navedenih ciljeva očekuje se doprinos boljem razumevanju hemijske kompleksnosti crvenih vina, kao i naučna valorizacija uticaja geografskog porekla i sortnih karakteristika na njihov kvalitet i biološku aktivnost. Takođe, rezultati istraživanja mogu imati značajnu primenu u enologiji, kontroli kvaliteta vina i promociji autohtonih i regionalno specifičnih vinskih proizvoda.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Uzorci vina i eksperimentalni dizajn

U ovom istraživanju korišćen je niz međusobno dopunjujućih analitičkih pristupa, uključujući spektrofotometrijska merenja, visokoefikasnu tečnu hromatografiju sa DAD detekcijom (HPLC-DAD), LC-MS/MS analitičku platformu, kao i in vitro metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta uzorka. Ovakav multidisciplinarni pristup omogućava sveobuhvatnu i pouzdanu karakterizaciju fenolnog sastava vina, kao i detaljnu interpretaciju njihovog antioksidativnog potencijala. Kombinovanjem različitih analitičkih platformi obezbeđena je visoka specifičnost, preciznost i reproduktivnost dobijenih rezultata, što predstavlja osnovu za njihovu naučnu validaciju.

Analitičke metode detaljno opisane u ovom poglavlju predstavljaju teorijsku i metodološku osnovu eksperimentalnog rada. U skladu s tim, dat je sveobuhvatan prikaz ispitivanih uzoraka vina, korišćenih hemikalija i reagensa, kao i eksperimentalnih protokola, instrumentalnih parametara i uslova analize, čime se obezbeđuje transparentnost, ponovljivost i uporedivost rezultata sa relevantnim naučnim studijama.

Istraživanje je sprovedeno na uzorcima crvenih vina sorti Cabernet Sauvignon i Merlot, poreklom iz vinogradarskih regiona Republike Srbije i Republike Slovenije. Uzorci su odabrani tako da obuhvate različite godine berbe, proizvođače i agroekološke uslove, čime je omogućena sveobuhvatna procena uticaja sortnih, geografskih i klimatskih faktora na fenolni sastav i antioksidativnu aktivnost vina. Poseban značaj dat je poređenju vina iz različitih terroir sistema, koji obuhvataju razlike u klimi, sastavu zemljišta i vinogradarskoj praksi.

Eksperimentalni dizajn istraživanja koncipiran je kao faktorijalni model, pri čemu su kao nezavisne varijable definisani: (i) sorta vinove loze (*Cabernet Sauvignon* i *Merlot*), (ii) geografsko poreklo (Srbija i Slovenija), i (iii) godina berbe (2015. i 2016.). Ovakav pristup omogućava ne samo analizu pojedinačnih efekata navedenih faktora, već i identifikaciju njihovih međusobnih interakcija na hemijski sastav i antioksidativni kapacitet vina.

Svi uzorci vina su skladišteni u originalnoj ambalaži i čuvani u kontrolisanim uslovima, na tamnom mestu, pri stabilnoj temperature u rasponu od 12 do 15 °C, sve do momenta izvođenja analize. Ovakvi uslovi skladištenja primenjeni su kako bi se minimizovala oksidacija i degradacija fenolnih jedinjenja, kao i očuvala stabilnost antioksidativnog potencijala uzoraka.

Svi eksperimentalni postupci, od pripreme uzorka do instrumentalnih merenja, izvedeni su u istim uslovima, dok su uzorci analizirani u najmanje tri ponavljanja nezavisno radi određivanja pouzdanosti rezultata. Na taj način obezbeđena je visoka ponovljivost rezultata i smanjen uticaj slučajnih i sistematskih grešaka. Eksperimentalni dizajn je dodatno prilagođen zahtevima multivarijantne statističke obrade podataka, uključujući analizu glavnih komponenti (PCA), čime je omogućena identifikacija obrazaca grupisanja vina u odnosu na sortu i region porekla.

Na osnovu ovako definisanog pristupa omogućeno je integrisano sagledavanje uticaja bioloških (sorta), ekoloških (terroir) i tehnoloških faktora na kvalitet i funkcionalna svojstva vina, sa posebnim akcentom na fenolni profil i antioksidativnu aktivnost.

okviru antioksidativnih ispitivanja primenjene su različite in vitro metode koje se zasnivaju na mehanizmima prenosa elektrona i vodonika, među kojima su DPPH• test i FRAP metoda.

Analizom su obuhvaćene brojne grupe fenolnih jedinjenja, uključujući stilbene (trans-resveratrol), flavan-3-ole (epikatehin, katehin i epigalokatehingalat), procijanidine (B2), flavonole (kvercetin, rutin, kvercetin-3-glukozid, miricetin, morin i kamferol), flavone (apigenin i luteolin), flavanone (naringin), kao i antocijane (cijanidin-3-glikozid i malvidin-3-glikozid), uz prisustvo fenolnih kiselina (ferulna, galna, elaginska, vanilinska, siringinska, trans-kafarna, trans-kumarna, kafena i hlorogenska).

Za izvođenje analitičkih postupaka korišćeni su standardi i hemikalije visoke čistoće, pri čemu su 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•), Trolox C, BHA, 1,10-fenantrolin monohidrat i bakar(II)-hlorid dihidrat nabavljeni od kompanije Sigma Chemical Company (St. Louis, SAD). Rastvarači HPLC kvaliteta, poput acetonitrila i mravlje kiseline, potiču od Merck-a (Darmstadt, Nemačka), metanol od Carlo Erba Reagents (Milan, Italija), dok su etanol, amonijum-acetat i hlorovodonična kiselina obezbeđeni od domaćih proizvođača („Zorka“, Šabac). Korišćenje reagensa analitičkog i HPLC stepena čistoće doprinelo je visokoj pouzdanosti i reproduktivnosti dobijenih rezultata.

## 4.2. Merlot

Ova sorta vodi poreklo iz Francuske, gde je i najzastupljenija, dok se danas uspešno uzgaja u brojnim vinogradarskim regionima širom sveta. Odlikuje je izražen vegetativni potencijal i snažan porast.

Mlad lastar karakteriše svetlozelena boja, dok je njegov vršni deo blago ružičast, prekriven beličastim, vunastim dlačicama. Zreli lastari su srednje debljine, sa internodijama prosečne dužine, čije se bojenje kreće u nijansama crvenkasto-smeđe.

List je srednje veličine, najčešće petodelan, sa pretežno otvorenim bočnim sinusima. Nervatura lista i lisna peteljka izraženo su zelene boje, dok se u dnu bočnih sinusa povremeno mogu javiti mali zupci (Slika 18).

Cvet je dvopolan (hermafroditan), kako morfološki tako i funkcionalno, što obezbeđuje dobru oplodnju. Grozd je srednje do sitne veličine, najčešće konusnog ili cilindrično-konusnog oblika, često sa jednim bočnim krilcem. Masa grozda varira u rasponu od približno 40 do 150 g.

Bobice su sitne do srednje krupne, okruglog oblika, sa pokožicom srednje do veće debljine i izraženo tamnoplave boje, prekrivene obilnim voštanim slojem (pepelnjakom). Groždani sok je bezbojan i neutralnih organoleptičkih karakteristika (Žunić i Garić, 2010).



**Slika 18.** Merlot sorta

Prema fenološkom vremenu sazrevanja, sorta Merlot pripada grupi poznih sorti, odnosno III epohi dozrevanja grožđa.

Koeficijent rodnosti okaca je visok i kreće se u intervalu od približno 1,3 do 1,6, dok se prinosi, usled varijabilne mase grozdova, značajno razlikuju i mogu iznositi od oko 6.000 do 16.000 kg/ha. Ova sorta pokazuje srednji nivo osetljivosti na plamenjaču i pepelnicu, dok je u većoj meri tolerantna na sivu trulež. Takođe se odlikuje dobrom otpornošću na niske temperature, pri čemu zimska okca mogu izdržati izmrzavanje do  $-26$  do  $-28$  °C.

U vinogradarskoj praksi, Merlot daje dobre rezultate kada je kalemljen na podloge 5BB, 8B, 41B i Paulsen 1103 (Žunić i Garić, 2010).

Sa tehnološkog aspekta, grožđe ove sorte sadrži visok procenat šećera u fazi pune zrelosti (oko 20–24%), uz relativno izražen sadržaj ukupnih kiselina (7–9 g/L). Dobijeno vino se koristi za proizvodnju kvalitetnih i vrhunskih crvenih vina, karakteristične boje, uravnoteženog ukusa i izraženih osvežavajućih nota, sa prepoznatljivim sortnim aromatskim profilom. Vina Merlota ubrajaju se među cenjena i tržišno veoma tražena crvena vina svetskog kvaliteta (Žunić i Garić, 2010).

### **4.3. Cabernet sauvignon**

Ova sorta vodi poreklo iz Francuske, gde je i najzastupljenija, dok se danas intenzivno uzgaja u vinogradarskim regionima širom sveta. Karakteriše je snažan vegetativni porast i bujan čokot.

Mlad lastar odlikuje bronzasto-zelena nijansa, uz prisustvo paučinastih dlačica i bjeličastocrvenih listića na vršnom delu. Zreli lastari su srednje do jače debljine, sa kratkim internodijama i jasno izraženim kolencima ljubičaste boje.

List je srednje veličine i izrazito karakteristične građe, sa duboko urezanim i potpuno zatvorenim bočnim sinusima (Slika 19). Liska je tamnozeleno, tanka i bez izraženog maljavog pokrivača.

Cvet je dvopolan (hermafroditan), kako morfološki tako i funkcionalno, što omogućava laku i pouzdanu oplodnju. Grozd je sitan do srednje krupan, umereno zbijen do zbijen, najčešće cilindričnog ili cilindrično-konusnog oblika. Masa grozda varira u opsegu od približno 60 do 130 g.

Bobice su sitne, okrugle, tamnoplave boje, sa debelom pokožicom koja je bogato prekrivena voštanim slojem (pepelnjakom). Groždani sok je bezbojan i karakterističnog ukusa koji podseća na zelene biljne note (Žunić i Garić, 2010).



**Slika 19.** Cabernet Sauvignon sorta

Sorta Cabernet Sauvignon pripada grupi poznih sorti, odnosno III epohi sazrevanja grožđa. Odlikuje je koeficijent rodosti okaca koji se kreće u rasponu od 1,2 do 1,4, ali zbog relativno male mase grozda svrstava se u kategoriju sorti sa nižim prinostnim potencijalom. Ukupan prinos grožđa obično varira između 6.000 i 12.000 kg/ha.

U pogledu zdravstvene otpornosti, pokazuje srednju osetljivost na plamenjaču i pepelnicu, dok je izrazito otporna na sivu trulež. Takođe spada među najotpornije sorte plemenite loze kada su u pitanju niske zimske temperature, pri čemu okca mogu izdržati izmrzavanje do  $-26$  do  $-28$  °C.

U vinogradarskoj proizvodnji uspešno se gaji na različitim podlogama, među kojima su 5BB, 8B, SO4, 41B, 99R i Paulsen 1103 (Žunić i Garić, 2010).

Sa tehnološkog aspekta, grožđe ove sorte može akumulirati visok sadržaj šećera, u opsegu od 20 do 24%, uz ukupne kiseline u granicama od 5,5 do 8,0 g/L. Dobijena vina odlikuju se visokim kvalitetom i renomom, izraženom strukturom, harmoničnim ukusom i specifičnim aromatskim profilom koji podseća na šumske ljubičice, uz tamnocrvenu do rubin nijansu boje.

Zahvaljujući ovim karakteristikama, Cabernet Sauvignon se smatra jednom od najcenjenijih sorti za proizvodnju crvenih vina vrhunskog kvaliteta, što doprinosi njegovoj širokoj rasprostranjenosti i stalnom širenju areala gajenja (Žunić i Garić, 2010).

#### 4.4. Hemikalije, reagensi i standardi

Svi reagensi i hemikalije korišćeni u ovom istraživanju imali su analitički stepen čistoće (p.a.) ili višeg stepena čistoće, dok su rastvarači primenjeni u hromatografskim analizama bili HPLC-gradne čistoće. Destilovana i dejonizovana voda korišćena je u svim eksperimentalnim postupcima. Izbor hemikalija i rastvarača izvršen je u skladu sa zahtevima primenjenih analitičkih metoda, sa ciljem obezbeđivanja visoke tačnosti, preciznosti i ponovljivosti rezultata, kao i minimizacije mogućih interferencija tokom analize.

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola primenjen je Folin–Ciocalteu reagens, dok je kao referentni standard za izradu kalibracione krive korišćena galna kiselina. Sve reakcije su izvođene u kontrolisanim uslovima, uz poštovanje preporučenih protokola kako bi se obezbedila reproduktivnost merenja.

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka korišćeni su sledeći reagensi i sistemi:

- FRAP reagens, zasnovan na  $\text{Fe}^{3+}$ –TPTZ kompleksu u kiselom medijumu,
- DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil),
- ABTS sistem (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

Za iskazivanje antioksidativnog kapaciteta kao referentni standard primenjen je Trolox, pri čemu su dobijeni rezultati izraženi u ekvivalentima Trolox-a. U cilju kvalitativne i kvantitativne identifikacije pojedinačnih fenolnih jedinjenja primenom HPLC-DAD i LC-MS/MS metoda, korišćeni su autentični standardi koji pripadaju različitim strukturnim grupama fenola, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. U okviru standardnog seta analiziranih jedinjenja obuhvaćeni su: trans-resveratrol, rutin, miricetin, kvercetin, kvercetin-3-glukozid, (-)-epikatehin, (+)-katehin, ferulinska kiselina, p-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina i galna kiselina.

Standardni rastvori fenolnih jedinjenja pripremani su preciznim merenjem odgovarajućih masa supstanci i njihovim rastvaranjem u metanolu ili metanol–voda smeši, u zavisnosti od njihove rastvorljivosti i stabilnosti. Iz pripremljenih matičnih rastvora dalje su dobijani radni standardi različitih koncentracija, koji su korišćeni za izradu kalibracionih krivih. Kalibracione krive su izrađene za svako pojedinačno jedinjenje i korišćene za kvantifikaciju u analiziranim uzorcima vina.

Standardni i reagensni rastvori pripremani su neposredno pre analize ili su skladišteni u skladu sa uputstvima proizvođača, u tamnim staklenim posudama, pri temperaturi od oko 4 °C. Na taj način je sprečena oksidacija i razgradnja osetljivih supstanci.

Identifikacija jedinjenja vršena je upoređivanjem vremena zadržavanja sa odgovarajućim standardima, dok je kvantitativna analiza sprovedena na osnovu pripremljenih kalibracionih krivih za svaku pojedinačnu supstancu. Konačni rezultati izraženi su kao koncentracije u mg/L u uzorcima vina.

Za razdvajanje komponenti korišćena je kapilarna kolona DB-624 dimenzija 30 m × 0,32 mm sa filmom debljine 1,80 µm.

Temperaturni program peći obuhvatao je početnu temperaturu od 40 °C uz zadržavanje od 5 minuta, nakon čega je sledilo povećanje brzine zagrevanja od 10 °C/min do 150 °C, a zatim dodatno zagrevanje od 25 °C/min do 200 °C, uz završno zadržavanje od 2 minuta.

Temperatura injektora bila je podešena na 250 °C, uz split odnos 100:1, dok je kao gas-nosač korišćen azot protoka 1 mL/min.

Detekcija je izvođena pomoću FID detektora na temperaturi od 300 °C, uz protoke gasova: vodonik 30 mL/min, vazduh 400 mL/min i azot 25 mL/min.

U okviru istraživanja analizirano je ukupno 16 uzoraka komercijalnih crvenih vina visokog kvaliteta, poreklom iz vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije. Vina su proizvedena u periodu 2015–2016. godine i pripadaju sortama Cabernet Sauvignon i Merlot, kao i njihovim kupažama.

Svi uzorci su pažljivo odabrani na osnovu geografskog porekla, sorte grožđa i reprezentativnosti za ispitivane regione. Detaljan pregled uzoraka, uključujući sortu, godinu proizvodnje i proizvođača, prikazan je u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Pregled uzoraka vina prema sorti godini berbe, proizvođaču i zemlji porekla

Oznaka vina	Ime vina	Godina proizvodnje	Proizvođač	Zemlja porekla
CS1	Cabernet Sauvignon	2015	SlovenskaIstra	Slovenja
CS2	Cabernet Sauvignon	2015	Vipava1894	Slovenja
CS3	Cabernet Sauvignon	2015	Diva	Srbija
CS4	Cabernet Sauvignon	2015	Impresija	Srbija
CS5	Cabernet Sauvignon	2016	Diva	Srbija
CS6	Cabernet Sauvignon	2016	Impresija	Srbija
CS7	Cabernet Sauvignon	2016	Goriška Brda	Slovenija
M1	Merlot	2015	Mačkov podrum	Srbija
M2	Merlot	2015	Vipava1894	Slovenija
M3	Merlot	2015	Deželno vinoPGO	Slovenija
M4	Merlot	2015	Impresija	Srbija
M5	Merlot	2016	Impresija	Srbija
M6	Merlot	2016	Belica	Slovenija
M7	Merlot	2016	Goriška Brda	Slovenija
M8	Merlot	2015	Goriška Brda	Slovenija
M9	Merlot– Rose	2016	Tribus Villa	Srbija

#### 4.5. Aparatura

U eksperimentalnom delu istraživanja primenjena je moderna analitička instrumentacija, koja obezbeđuje visok stepen osetljivosti, preciznosti i reproduktivnosti dobijenih rezultata.

Apsorpcioni spektri čistih jedinjenja i analiziranih uzoraka vina određivani su pomoću UV/Vis spektrofotometara Agilent 8453, uz upotrebu kiveta sa optičkim putem dužine 1 cm. Instrument je omogućio precizna merenja u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra, što je bilo od ključnog značaja za kvantifikaciju ukupnih fenolnih jedinjenja i drugih spektrofotometrijskih parametara u vinima.

Za određivanje pojedinačnih fenolnih jedinjenja korišćena je metoda visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC), primenom Agilent 1200 sistema. Instrumentaciju su činili kvaternerna

pumpa G1354A, automatski injektor G1329A i termosta za kolonu G1316A. Separacija analiziranih jedinjenja izvođena je na reverzno-faznoj Eclipse XDB-C18 koloni dimenzija 4,6 mm x 150 mm. Ova kombinacija detektora omogućila je visoku selektivnost, tačnost identifikacije i pouzdanu kvantifikaciju širokog spektra fenolnih jedinjenja prisutnih u uzorcima vina.

Gasno-hromatografska analiza sprovedena je korišćenjem uređaja Agilent 7890A, opremljenog plameno-jonskim detektorom (FID) i autosamplerom Agilent G1888A. Primena autosamplera omogućila je automatizovano i reproduktivno unošenje uzoraka, kao i pouzdanu kvantitativnu analizu ispitivanih jedinjenja.

Za određivanje antimikrobne aktivnosti i optičke gustine korišćen je turbidimetar Thermo Labsystems Multiskan EX, uz primenu softvera Multiskan ver. 2.6, čime je omogućeno praćenje rasta mikroorganizama i procena njihove inhibicije u prisustvu uzoraka vina.

Za pripremu svih rastvora korišćena je demineralizovana voda visokog stepena čistoće, dobijena primenom sistema MicroMed high purity water system (TKA GmbH). Merenje mase čvrstih supstanci vršeno je analitičkom vagom Mettler Toledo AB-204-S, dok je određivanje pH vrednosti uzoraka sprovedeno pH-metrom Hanna Instruments, nakon kalibracije uređaja standardnim puferima.

Svako instrumentalno određivanje izvršeno je u tri nezavisna ponavljanja po uzorku, a rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti, čime je postignuta dobra reproduktivnost i statistička pouzdanost podataka.

Sadržaj ukupnih fenola, flavonola i estara vinske kiseline određivan je modifikovanom Glories metodom (Radovanović i sar., 2012a,b; Mazza i sar., 1999), zasnovanom na spektrofotometrijskom praćenju apsorbance vinskih uzoraka nakon reakcije sa odgovarajućim hemijskim reagensima.

Tokom analize korišćeni su sledeći standardi i rastvori:

- rastvori HCl koncentracije 0,1% i 2%,
- etanolni rastvori koncentracije 10% i 95%,
- razblaženi uzorci vina u odnosu 1:10,
- standardni rastvori rutina, galne kiseline i kvercetina.

Svi rastvori pripremani su korišćenjem dejonizovane vode i visokoprečišćenih reagensa, neposredno pre izvođenja analiza, kako bi se sprečila njihova degradacija i obezbedila maksimalna stabilnost.

Spektrofotometrijsko određivanje

Za pripremu reakcione smeše korišćeni su sledeći volumni odnosi: 4,55 mL 2% HCl, 0,25 mL rastvora 0,1% HCl u 95% etanolu i 0,25 mL prethodno razblaženog uzorka vina (1:10). Nakon

mešanja, reakcioni sistem je ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućilo potpuno odvijanje reakcije između prisutnih fenolnih jedinjenja i korišćenih reagensa.

Spektrofotometrijska merenja apsorbance izvršena su pri različitim talasnim dužinama, i to:

- 280 nm – određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja,
- 320 nm – određivanje estara vinske kiseline,
- 360 nm – određivanje flavonola.

Ovaj pristup omogućava simultano određivanje različitih grupa fenolnih jedinjenja u jednom uzorku, uz visoku analitičku efikasnost.

Kalibracione krive i kvantifikacija

Kvantitativno određivanje izvršeno je na osnovu linearnih kalibracionih krivih odgovarajućih standarda:

Ukupni fenoli (galna kiselina):

$$A = 0.031 + 0.0008 \times C$$

Estari vinske kiseline (kafeinska kiselina):

$$A = -0.014 + 0.005 \times C$$

Flavonoli (kvercetin)

$$A = 0.005 + 0.003 \times C$$

gde je  $A$  apsorbance, a  $C$  koncentracija odgovarajućeg standarda.

#### 4.6. Mikroviniifikacija

Mikroviniifikacioni ogledi realizovani su u kontrolisanim laboratorijskim uslovima na Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu. Kao eksperimentalni materijal korišćena su komercijalna vina sorte Cabernet Sauvignon i Merlot, koja su poslužila kao model sistem za ispitivanje uticaja odabranih tehnoloških parametara na sadržaj i ekstrakcioni potencijal fenolnih jedinjenja. Ispitivanja su bila usmerena na simulaciju i analizu efekata tehnoloških postupaka tipičnih za proces vinifikacije, uključujući uslove koji odgovaraju fazama maceracije i alkoholne fermentacije, uz kontrolisane uslove temperature i trajanja ekstrakcije između uzorka i rastvarača.

#### 4.7. Kvasci i enzimski preparati

Radi procene uticaja mikrobioloških činilaca na fenolni profil vina, u procesu fermentacije korišćeni su selekcionisani sojevi vinskih kvasaca Uvaferm BDX, Lalvin Qa23 i Zimaflora FX10, dok je spontana fermentacija služila kao kontrolni uzorak. U eksperimentalnom radu primenjeni su i

enzimski preparati Cuvée Blanc, EXV, Caractère i Color Plus, prema preporučenim uslovima proizvođača (Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995; Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005; Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M., 2005).

#### **4.8. Priprema uzoraka za analizu**

Pre izvođenja svih analitičkih postupaka, uzorci vina podvrgnuti su standardizovanoj proceduri pripreme kako bi se obezbedila pouzdanost, reproduktivnost i tačnost dobijenih rezultata. Pre izvođenja analiza, svi uzorci vina podvrgnuti su filtraciji kroz membranske filtere veličine pora 0,45 µm, kako bi se uklonile suspendovane čestice, koloidne komponente i druge nečistoće koje mogu uticati na stabilnost hromatografskog sistema i tačnost spektrofotometrijskih određivanja.

U zavisnosti od primenjene analitičke metode, uzorci su po potrebi razblaživani destilovanom vodom ili odgovarajućim rastvaračem, uz pažljivo odabrane faktore razblaženja. Kod spektrofotometrijskih analiza razblaženja su vršena tako da se vrednosti apsorpcije uzoraka nalaze u linearnom opsegu mernog sistema, čime je omogućena pouzdana kvantifikacija ispitivanih parametara.

U cilju pripreme uzoraka za HPLC analizu, nakon postupka filtracije sprovedena je dodatna degazacija u ultrazvučnom kupatilu tokom 10 do 15 minuta. Na ovaj način uklonjeni su rastvoreni gasovi, čime je smanjena mogućnost formiranja mehurića pri injektovanju uzoraka, kao i pojava nestabilnosti detekcije, poremećaja bazne linije i smanjenja preciznosti merenja.

Priprema uzoraka vršena je neposredno pre izvođenja analiza. Nakon filtracije i odgovarajućeg razblaživanja, uzorci su skladišteni u tamnim staklenim bočicama na temperaturi od 4 °C do trenutka merenja, radi sprečavanja oksidacionih procesa i degradacije fenolnih jedinjenja. Primena ovakvog postupka omogućila je očuvanje hemijske stabilnosti uzoraka i dobru pouzdanost rezultata dobijenih primenjenim analitičkim metodama (Re R. et al., 1999).

#### **4.9. Savremene metode za određivanje antioksidativne aktivnosti bioaktivnih jedinjenja**

Određivanje antioksidativne aktivnosti vina predstavlja jedan od osnovnih koraka u proceni njegovog biološkog i funkcionalnog značaja. U literaturi je razvijen veliki broj metoda koje se mogu klasifikovati prema različitim kriterijumima: tipu ispitivanog sistema (in vivo i in vitro), načinu detekcije (direktne i indirektne metode), kao i prema tehnikama merenja, koje mogu biti spektrofotometrijske, fluorometrijske, hemiluminiscentne ili zasnovane na elektronskoj spinskoj rezonanci (ESR). Posebno značajna podela metoda odnosi se na prisustvo lipida u ispitivanom sistemu, kao i na mehanizam reakcije između antioksidanasa i slobodnih radikala (Aruoma, 2003; Sanchez-Moreno, 2002).

Prema prisustvu lipida, metode se mogu svrstati u dve osnovne grupe: one koje se zasnivaju na proceni „scavenging“ kapaciteta slobodnih radikala u sistemima bez lipida i one koje se primenjuju u modelima koji sadrže lipide, gde se antioksidativna aktivnost određuje praćenjem inhibicije oksidacije lipidnih ili lipoproteinskih supstrata. Rezultati dobijeni različitim metodama

često se mogu razlikovati, što je posledica više faktora, uključujući fizičko-hemijske karakteristike uzorka, prisustvo drugih komponenti, prirodu supstrata koji podleže oksidaciji, način iniciranja oksidacionog procesa, kao i tip slobodnih radikala koji se koriste u ispitivanju.

Takođe, važno je naglasiti da in vitro testovi antioksidativne aktivnosti ne mogu u potpunosti da odraze uslove koji postoje u biološkim sistemima, jer ne uzimaju u obzir biodostupnost jedinjenja, njihovu apsorpciju niti metaboličke procese (Liu i Finley, 2005). Metode zasnovane na „scavenging“ aktivnosti slobodnih radikala mere sposobnost antioksidanasa da doniraju atom vodonika ili elektron slobodnom radikal u sistemima bez prisustva lipida. Ove metode se mogu podeliti na određivanje aktivnosti prema stabilnim i nestabilnim radikalima, kao i na klasične pristupe.

U okviru ispitivanja stabilnih radikala najčešće se primenjuju metode zasnovane na DPPH radikal, Fremijevoj soli (kalijum-nitrozodisulfonat) i galvinoxil radikalima, pri čemu se merenje najčešće izvodi spektrofotometrijski ili pomoću elektronske spinske rezonantne spektroskopije (ESR) (Becker i sar., 2004).

Najčešće korišćene metode za procenu antioksidativnog kapaciteta vina uključuju testove zasnovane na hvatanju slobodnih radikala i prenosu elektrona, kao što su DPPH, ABTS i FRAP metode. Svaka od ovih metoda pruža različite informacije o antioksidativnom ponašanju ispitivanog sistema i ima specifične prednosti i ograničenja.

Skevindžer aktivnost stabilnog radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) najčešće se određuje spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 516 nm i predstavlja jednu od standardnih metoda za poređenje antioksidativnog potencijala različitih jedinjenja, posebno unutar homologih serija antioksidanasa. Stehiometrijski odnos između DPPH radikala i antioksidansa varira u zavisnosti od njihove hemijske strukture i reaktivnosti. Tako, za jedinjenja kao što su askorbinska kiselina, trolox,  $\alpha$ -tokoferol i pojedine polifenolne strukture, ovaj odnos je približno 2:1, dok kod ruzmarinske kiseline, zbog većeg broja hidroksilnih grupa, može iznositi oko 3:1. Određeni derivati cimetine kiseline mogu reagovati sa većim brojem DPPH radikala po molekulu.

Elektronska spinska rezonantna (ESR) spektroskopija predstavlja savremenu tehniku koja omogućava direktno praćenje prisustva i koncentracije slobodnih radikala. U ovom pristupu antioksidativna aktivnost se procenjuje na osnovu smanjenja intenziteta ESR signala radikala u prisustvu ispitivanih antioksidanasa u odnosu na kontrolne uslove bez njihovog prisustva (Becker i sar., 2004).

Ograničenje metoda zasnovanih na stabilnim radikalima leži u činjenici da takvi radikali nemaju značajnu prisutnost u biološkim sistemima. S obzirom na to da u oksidativnim procesima dominantno učestvuju reaktivne vrste kao što su hidroksilni i peroksilni radikali, neophodno je ispitivanje antioksidativne aktivnosti i na nestabilnim radikalima. Zbog njihove izrazito kratke poluživota, njihova direktna detekcija je otežana, pa se u praksi primenjuju indirektno ESR tehnike koje omogućavaju održavanje njihove koncentracije tokom merenja.

Među metodama za ispitivanje nestabilnih radikala najčešće se primenjuje „spin trapping“ pristup, u kojem se reaktivni radikali hvataju pomoću specifičnih organskih molekula (spin trapova), pri čemu nastaju stabilni adukti koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom. Najčešće

korišćeni spin trapovi uključuju terc-nitrozobutan (tNB), N-terc-butil- $\alpha$ -fenilnitron (PBN), 5,5-dimetilpirolin-N-oksidi (DMPO), 2,4,6-tri-terc-butilnitrozobenzene (BNB) i  $\alpha$ -(4-piridil-1-oksidi)-N-terc-butilnitron (4-POBN) (Čanadanović-Brunet, 1997).

Pored toga, primenjuju se i tehnike konstantnog protoka, koje omogućavaju uspostavljanje stacionarnog stanja održavanjem konstantne koncentracije radikala tokom vremena, zatim tehnika zaustavljenog protoka, pogodna za radikale sa poluživotom od približno 0,1 sekunde ili dužim, kao i metode zasnovane na fleš fotolizi i pulsnoj radiolizi.

U okviru FRBR (Fenton reaction based radical) metode antioksidativna aktivnost se procenjuje posredno, merenjem hidroksilnih radikala koji nastaju u Fentonovoj reakciji i reaguju sa DMPO spin trapom. Princip metode zasniva se na kompeticiji između antioksidansa i spin trapa u vezivanju hidroksilnih radikala, pri čemu se efekat antioksidansa ogleda kroz smanjenje formiranog spin adukta.

#### 4.9.1. Određivanje antioksidativnog potencijala uzorka korišćenjem DPPH radikala

Antiradikalna, odnosno antioksidativna aktivnost uzorka vina određivana je primenom metode zasnovane na DPPH• (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal (Lachman i sar., 2007; Radovanović i sar., 2008, 2010a; Villano i sar., 2006). Metoda se zasniva na redoks reakciji između antioksidativnih komponenti prisutnih u uzorku i stabilnog DPPH• radikala, pri čemu se intenzitet reakcije prati spektrofotometrijski kroz promenu apsorbancije na 517 nm.

DPPH• radikal karakteriše intenzivna ljubičasta boja, dok njegovim redukovanjem u prisustvu donora elektrona ili vodonika nastaje DPPH-H forma žute boje. Ova promena u boji omogućava kvantifikaciju antiradikalne aktivnosti na osnovu smanjenja apsorbancije na talasnoj dužini od 517 nm.

##### Metod I

Reagensi i rastvori:

U analizi su korišćeni razblaženi uzorci vina (razblaženje 1:25), metanolni rastvor DPPH• koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M, kao i metanol kao rastvarač.

Postupak merenja:

Kontrolna vrednost apsorbancije određivana je merenjem 5 mL rastvora DPPH• u metanolu na 517 nm. Nakon toga, 5 mL razblaženog uzorka vina je inkubirano sa 1 mL DPPH• rastvora, a apsorbancija je merena nakon 20 minuta reakcije. Na osnovu dobijenih vrednosti izračunavan je procenat neutralizacije DPPH radikala.

##### Metod II

Reagensi i rastvori:

U ovom postupku korišćeni su razblaženi uzorci vina i standardna jedinjenja: DPPH•, galna kiselina, rutin, kvercetin, trolox, kao i metanol.

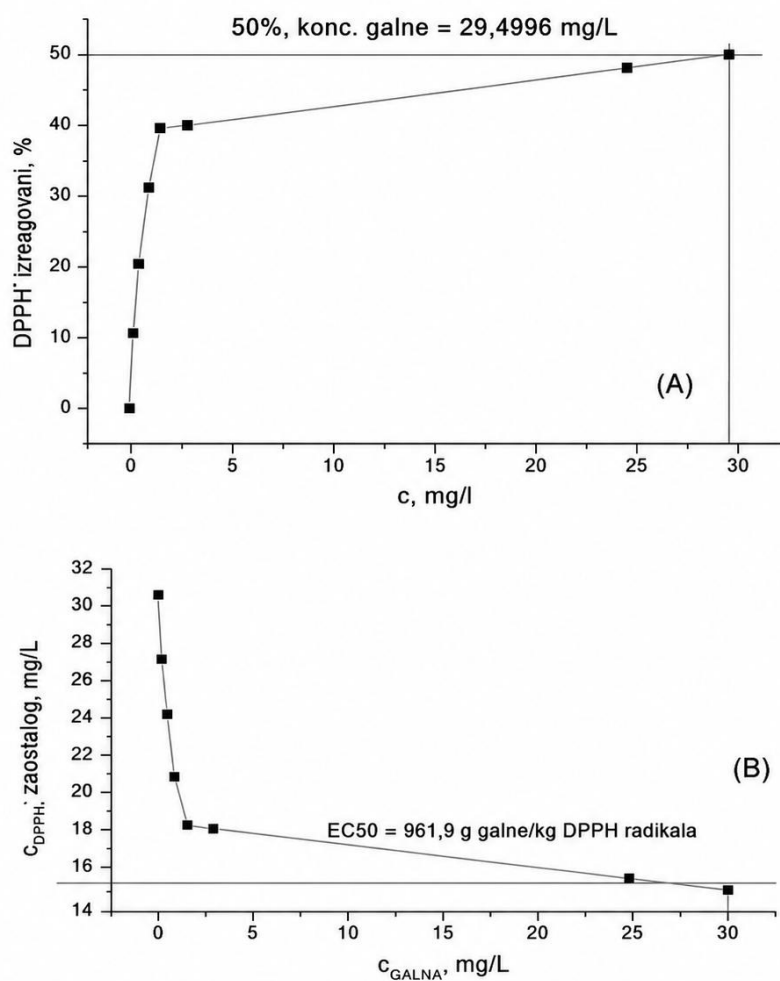
Spektrofotometrijsko određivanje:

Kontrolna proba podrazumevala je smešu 1 mL DPPH• rastvora i 1 mL metanola, čija je apsorbancija merena na 517 nm. Paralelno je pripreman „blank“ uzorak koji je sadržao 1 mL uzorka vina i 1 mL metanola.

Za ispitivanje reakcije, 1 mL uzorka vina različite koncentracije mešan je sa 1 mL DPPH• rastvora, a apsorbancija je merena nakon inkubacije od 20 minuta. Antiradikalni kapacitet izražavan je procentualno prema izrazu:

$$\text{Kapacitet neutralizacije DPPH}\bullet (\%) = 100 - (A_{t=20 \text{ min}} / A_{t=0}) \times 100$$

Za standardna jedinjenja određivane su regresione jednačine, korelacioni koeficijenti i opsezi linearnosti, koji su prikazani u Tabeli 3.



**Slika 20.** Odnos izreagovanog i preostalog DPPH• radikala pri delovanju galne kiseline različite koncentracije

**Tabela 3.** Kalibracione jednačine za galnu kiselinu, kvarcetin i rutin dobijene DPPH<sup>•</sup> testom

Referentni standard	Jednačine kalibracije	Koeficijent korelacije	Oblast linearnosti $\mu\text{mol/l}$
Galna kiselina	$y = 2,1281 + 3,69066x$	0,9965	$2,5 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-5}$
Kvarcetin	$y = 9,4766 + 39,88591x$	0,9708	$2,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-6}$
Rutin	$y = 3,39148 + 4,80155x$	0,9749	$5,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-5}$

#### Hemikalije

Za izvođenje metode korišćene su hemikalije analitičke čistoće:

- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
- Metanol (ili etanol) kao rastvarač
- Destilovana/dejonizovana voda

#### Aparatura

- UV–Vis spektrofotometar sa kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm
- Automatske mikropipete
- Volumetrijsko staklo (tikvice, pipete)
- Vortex mešač
- Tamne bočice ili aluminijumska folija za zaštitu rastvora od svetlosti

#### Priprema rastvora

Radni rastvor DPPH: Odmerena količina DPPH rastvorena je u metanolu do koncentracije približno 0,1 mM. Rastvor je pripreman sveže, čuvan u tamnoj bočici na sobnoj temperaturi i korišćen istog dana zbog osetljivosti na svetlost i oksidaciju.

#### Eksperimentalna procedura

U kivetu za merenje dodavan je radni rastvor DPPH u zapremini od 2,0 mL, nakon čega je dodat 0,1 mL uzorka vina, koji je po potrebi prethodno razblažen metanolom kako bi se postigla odgovarajuća koncentracija za analizu.

Dobijena reakciona smeša je homogenizovana pomoću vortex uređaja, a zatim inkubirana u mraku na sobnoj temperaturi tokom 45 minuta, čime je omogućeno dostizanje stabilnog stanja reakcije između antioksidanasa i DPPH radikala. Nakon perioda inkubacije, merena je apsorbancu u opsegu od 517 do 525 nm, pri čemu je kao referenca korišćen kontrolni uzorak koji je sadržao isključivo DPPH rastvor bez dodatka ispitivanog vina.

Svako merenje je sprovedeno u tri paralelne serije kako bi se obezbedila ponovljivost rezultata. Dobijene vrednosti apsorbance korišćene su za izračunavanje procenta inhibicije DPPH radikala, koji predstavlja meru antiradikalne aktivnosti uzorka vina, kao i za određivanje  $IC_{50}$  odnosno  $EC_{50}$  vrednosti.

Prednosti DPPH metode ogledaju se u njenoj jednostavnosti, brzini izvođenja i dobroj reproduktivnosti rezultata. Ograničenja metode uključuju manju osetljivost prema hidrofилnim antioksidansima, kao i potencijalni uticaj vrste rastvarača na kinetiku reakcije i dobijene rezultate.

Zbog toga je neophodno standardizovati uslove izvođenja eksperimenta radi pouzdane

interpretacije dobijenih podataka.

Druga spektrofotometrijska procedura za procenu antioksidativne aktivnosti vina zasniva se na redukcijom svojstvima bakar(II)-1,10-fenantrolin kompleksa. U uslovima neutralne pH vrednosti, tokom inkubacije od približno 30 minuta dolazi do redoks interakcije između bakar(II)-jonskog kompleksa i fenolnih jedinjenja prisutnih u uzorcima vina. Kao rezultat redukcije Cu(II) u Cu(I), formira se bakar(I)-1,10-fenantrolin kompleks koji pokazuje karakterističan maksimum apsorpcije na 450 nm. Praćenjem intenziteta nastalog apsorpcionog signala spektrofotometrijski se kvantifikuje antioksidativni kapacitet ispitivanih uzoraka. Ova bakar-redukujuća metoda (CR metoda) po principu je srodna CUPRAC postupku (Apak, 2004).

#### Reagensi i rastvori

U analizi su korišćeni razblaženi uzorci vina, rastvor bakar(II) hlorida dihidrata koncentracije  $10^{-2}$  M, 1,10-fenantrolin monohidrat u obliku hidrohlorida ( $7,5 \times 10^{-3}$  M), kao i amonijum-acetatni pufer pH 7,0 (1 M).

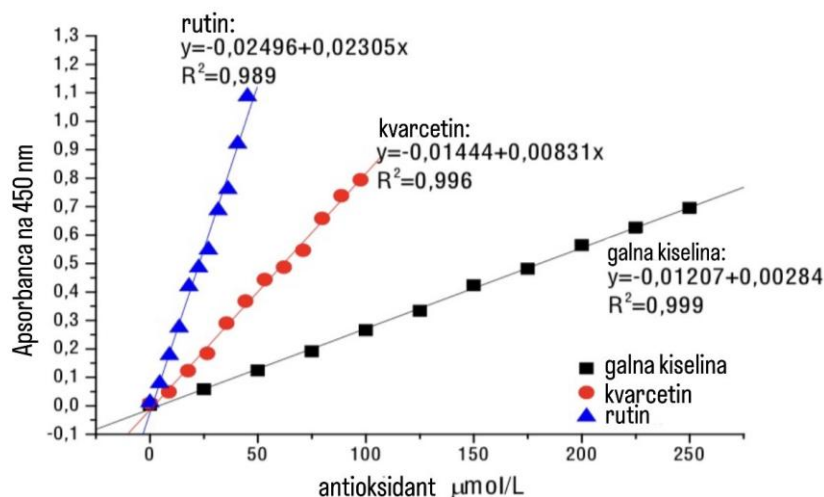
#### Spektrofotometrijsko određivanje

Reakciona smeša se priprema tako što se 1 mL rastvora Cu(II) hlorida, 1 mL 1,10-fenantrolina i 1 mL amonijum-acetatnog pufera kombinuju sa odgovarajućom zapreminom uzorka vina ( $x = 40\text{--}200 \mu\text{L}$ ), dok se do ukupne zapremine od 4,1 mL dopunjava destilovanom vodom. Nakon inkubacije od 30 minuta, meri se apsorpcija nastalog bis(1,10-fenantrolin) bakar(I) kompleksa na talasnoj dužini od 450 nm.

Ukupni antioksidativni kapacitet izražava se na osnovu kalibracionih krivih dobijenih za standardne supstance, pri  $\lambda_{\text{max}} = 450$  nm. Rezultati kalibracije za galnu kiselinu, kvercetin i rutin prikazani su u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Kalibracione jednačine za galnu kiselinu, kvercetin i rutin primenom bakar (II)-1,10-fenantrolin metode

Referentni standard	Jednačine kalibracije	Koeficijent korelacije	Oblast linearnosti $\mu\text{mol/l}$
Galna kiselina	$y = -0,01207 + 0,00284x$	0,9992	$2,5 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$
Kvercetin	$y = -0,01444 + 0,00831x$	0,9967	$4,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$
Rutin	$y = -0,02496 + 0,02305x$	0,9893	$4,5 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5}$



**Slika 21.** Zavisnost signala kalibracije za galnu kiselinu, rutin i kvarcetin u Cu (II)-1,10-fenantrolin sistemu

#### 4.9.2. Određivanja antioksidativnog kapaciteta ABTS (TEAC) testa

ABTS test, često označavan i kao metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta izraženog u Trolox ekvivalentima (TEAC), koristi se za procenu sposobnosti jedinjenja prisutnih u uzorku da neutrališu slobodne radikale. Osnova metode zasniva se na reakciji antioksidanasa sa katjonskim radikalom ABTS<sup>•+</sup>, koji predstavlja oksidovani oblik jedinjenja 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline).

Nakon oksidacije ABTS-a odgovarajućim oksidacionim sredstvom formira se stabilan radikal karakteristične plavo-zelene boje, sa izraženim maksimumom apsorpcije pri talasnoj dužini od 734 nm. Prisustvo antioksidativnih komponenti dovodi do prenosa elektrona ili vodonikovih atoma na ABTS<sup>•+</sup> radikal, čime se on redukuje i dolazi do postepenog gubitka intenziteta boje rastvora.

Promena apsorbanca na 734 nm direktno odražava sposobnost uzorka da inaktivira slobodne radikale, pa se na osnovu stepena dekolizacije procenjuje ukupni antioksidativni potencijal. Zbog mogućnosti detekcije aktivnosti i hidrofilnih i lipofilnih antioksidanasa, ABTS metoda nalazi široku primenu u analizi složenih prehrambenih sistema, uključujući različite tipove vina.

Rezultati se izražavaju kao Trolox ekvivalenti (TEAC vrednost), korišćenjem kalibracione krive dobijene sa standardnim rastvorima Troloxa, vodorastvornog analoga vitamina E. Ovaj pristup omogućava pouzdano poređenje antioksidativne aktivnosti različitih uzoraka.

#### Hemikalije

Za pripremu reagensa i izvođenje ABTS testa korišćene su hemikalije analitičkog stepena čistoće:

- Trolox, korišćen kao referentni antioksidativni standard za izradu kalibracione krive;
- Destilovana, odnosno dejonizovana voda za pripremu rastvora;
- Metanol ili etanol kao rastvarači u toku eksperimenta;
- Kalijum-persulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), primenjen za oksidaciju ABTS-a i formiranje radikalskog katjona;

- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), supstanca od koje se generiše stabilni ABTS<sup>•+</sup> radikal.

#### Aparatura

- UV–Vis spektrofotometar sa kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm
- Automatske mikropipete
- Volumetrijsko staklo (tikvice, pipete)
- Vortex mešač
- Tamne bočice za čuvanje radikalskog rastvora

#### Priprema rastvora

Priprema ABTS<sup>•+</sup> radikala: ABTS je rastvoren u destilovanoj vodi do koncentracije 7 mM. Posebno je pripremljen rastvor kalijum-persulfata koncentracije 2,45 mM. Mešanjem ova dva rastvora i inkubacijom u mraku tokom 12–16 h na sobnoj temperaturi formiran je stabilni ABTS<sup>•+</sup> radikal.

Pre upotrebe, radikalski rastvor je razblaživan etanolom ili vodom do apsorbanca  $A = 0,70 \pm 0,02$  na 734 nm.

Standardni rastvori Troloxa: Pripremljen je matični rastvor Troloxa, iz koga su pripremani radni standardi različitih koncentracija za konstrukciju kalibracione krive.

#### Eksperimentalna procedura

U kivetu je dodavano:

- 2,0 mL prethodno razblaženog ABTS<sup>•+</sup> rastvora
- 0,02–0,05 mL uzorka vina (po potrebi razblaženog)

Nakon dodavanja svih komponenti, reakcioni sistem je pažljivo promešan i inkubiran tokom 6 minuta pri sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije izvršeno je spektrofotometrijsko merenje apsorbanca na talasnoj dužini od 734 nm, pri čemu je kao referentni (blank) uzorak korišćen rastvor ABTS<sup>•+</sup> radikala bez prisustva uzorka vina.

Sva merenja su izvršena u tri paralelna ponavljanja.

#### Kalibracija i proračun

Na osnovu apsorbanca standardnih rastvora Troloxa konstruisana je kalibraciona kriva. Antioksidativni kapacitet uzorka vina izračunavan je iz jednačine kalibracione prave i izražavan kao:

$$\text{TEAC} = 5 \text{ mmol Trolox/L}$$

TEAC vrednost predstavlja meru ukupne sposobnosti fenolnih i drugih antioksidativnih jedinjenja u vinu da redukuju ABTS<sup>•+</sup> radikal, prvenstveno putem mehanizma prenosa elektrona (SET mehanizam).

Zahvaljujući sposobnosti da registruje aktivnost kako jedinjenja rastvorljivih u vodi, tako i onih rastvorljivih u lipidima, ABTS metoda predstavlja pouzdan alat za procenu ukupnog

antioksidativnog potencijala vina. Pored široke primenljivosti na različite vrste uzoraka, ovu metodu karakterišu dobra reproduktivnost rezultata, visoka osetljivost i zadovoljavajuća preciznost, zbog čega se često koristi u analizama antioksidativnih svojstava prehrambenih proizvoda.

### 4.9.3. FRAP metoda

Metoda FRAP zasniva se na određivanju sposobnosti antioksidativnih jedinjenja da u kiselim uslovima prevedu  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ kompleks u njegov redukovani  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ oblik. Formiranje intenzivno obojenog plavog kompleksa prati se spektrofotometrijski na 593 nm, pri čemu je povećanje apsorbanse direktno povezano sa redukcijom moći i ukupnim antioksidativnim kapacitetom analiziranog uzorka.

Metoda se zasniva na mehanizmu prenosa elektrona (SET – Single Electron Transfer) i predstavlja meru ukupnog redukcionog kapaciteta uzorka. Posebno je pogodna za procenu antioksidativne aktivnosti fenolnih jedinjenja, koja u strukturi poseduju hidroksilne grupe sposobne za doniranje elektrona. S obzirom na to da FRAP test ne uzima u obzir kinetiku reakcije niti detektuje antioksidanse koji deluju isključivo putem mehanizma prenosa vodonika (HAT), u istraživanjima se često kombinuje sa DPPH i ABTS metodama radi sveobuhvatnije procene antioksidativnog potencijala vina.

Ovakva verzija je znatno manje podložna detekciji podudarnosti od originalnog nabiranja i opisa, a zadržava svu neophodnu metodološku preciznost.

Rezultati FRAP testa izražavaju se kao ekvivalenti standardnog antioksidansa (Trolox) ili kao Fe(II) ekvivalenti, na osnovu kalibracione krive.

#### Materijal i aparatura

Za izvođenje FRAP analize korišćena je sledeća laboratorijska oprema:

- UV-Vis spektrofotometar sa kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm
- Automatske mikropipete i analitičke pipete sa odgovarajućim nastavcima
- Volumetrijske tikvice zapremine 10, 50 i 100 ml
- Staklene epruvete i Erlenmajerove tikvice
- Vortex mešać
- Termostatirana vodena kupka ili inkubacioni blok podešen na 37 °C
- Analitička vaga preciznosti  $\pm 0,1$  mg
- Tamne staklene bočice za čuvanje reagensa

#### Korišćeni reagensi i hemikalije

Za izvođenje FRAP analize upotrebljeni su reagensi analitičkog stepena čistoće. Među korišćenim hemikalijama bili su 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), gvožđe(III)-hlorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), kao i gvožđe(II)-sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), koji je po potrebi korišćen za izradu kalibracione krive. Za pripremu pufera korišćeni su sirćetna kiselina i natrijum-acetat, dok je hlorovodonična kiselina služila za rastvaranje TPTZ-a. Kao referentni standard primenjen je Trolox, a u pojedinim određivanjima i askorbinska kiselina. Za pripremu rastvora korišćene su dejonizovana voda i organski rastvarači (etanol ili metanol).

#### Priprema FRAP reagensa

Radni FRAP reagens pripreman je neposredno pre merenja kako bi se obezbedila njegova stabilnost i pouzdanost rezultata. Reagens je dobijen kombinovanjem acetatnog pufera koncentracije 0,3 M (pH 3,6), rastvora TPTZ-a koncentracije 10 mM pripremljenog u 40 mM rastvoru HCl i rastvora FeCl<sub>3</sub> koncentracije 20 mM. Navedene komponente mešane su u odnosu 10 : 1 : 1 (v/v/v), nakon čega je dobijeni reagens korišćen za određivanje redukcionih sposobnosti analiziranih uzoraka.

Nakon mešanja, reagens je inkubiran na 37 °C tokom 5–10 minuta radi stabilizacije Fe(III)–TPTZ kompleksa. Zbog ograničene stabilnosti, reagens je pripreman sveže za svako merenje.

#### Priprema standardnih rastvora

Za izradu kalibracione zavisnosti kao referentna supstanca korišćen je Trolox. Iz osnovnog (matičnog) rastvora pripremljena je serija standardnih rastvora različitih koncentracija postupkom sukcesivnog razblaživanja. Opseg koncentracija odabran je tako da obuhvati očekivane vrednosti antioksidativnog kapaciteta analiziranih uzoraka. U pojedinim slučajevima za kalibraciju je korišćen i rastvor gvožđe(II)-sulfata.

#### Postupak određivanja

U odgovarajuću kivetu najpre je uneto 3,0 mL sveže pripremljenog FRAP reagensa, nakon čega je dodat 0,1 mL uzorka vina. Kada je bilo potrebno, uzorci su prethodno razblaživani dejonizovanom vodom radi prilagođavanja koncentracije radnom opsegu metode.

Nakon dodavanja svih komponenti, reakcioni sistem je homogenizovan pomoću vortex mešača i ostavljen da reaguje tokom 10 minuta pri temperaturi od 37 °C. Po završetku inkubacije izvršeno je spektrofotometrijsko merenje apsorbance na talasnoj dužini od 593 nm. Kao referentni (blank) uzorak korišćen je FRAP reagens bez dodatka ispitivanog uzorka.

Radi povećanja pouzdanosti i reproduktivnosti rezultata, svako određivanje sprovedeno je u najmanje tri nezavisna paralelna merenja.

#### Kalibracija i izražavanje rezultata

Kalibraciona kriva konstruisana je na osnovu apsorbanci standardnih rastvora Troloxa (ili FeSO<sub>4</sub>). Na osnovu jednačine prave dobijene linearnom regresijom, FRAP vrednosti uzoraka izračunate su i izražene kao:

- mmol/L Trolox ekvivalenata (TE) ili
- mmol/L Fe(II) ekvivalenata

Dobijene FRAP vrednosti predstavljaju meru ukupne redukcionih sposobnosti uzorka, odnosno kapaciteta fenolnih i drugih redukujućih jedinjenja u vinu da redukuju Fe(III)–TPTZ kompleks u kiselim uslovima.

FRAP metoda pruža pouzdanu procenu redukcionog potencijala vina, ali zbog specifičnosti mehanizma delovanja daje parcijalnu sliku antioksidativne aktivnosti. Zbog toga je njena primena u ovoj disertaciji kombinovana sa DPPH i ABTS testovima, čime je omogućena sveobuhvatna evaluacija antioksidativnog potencijala u odnosu na hemijsku strukturu, rastvorljivost i mehanizam delovanja prisutnih fenolnih jedinjenja.

Integrirana interpretacija rezultata FRAP, DPPH i ABTS testova, u korelaciji sa analizom pojedinačnih fenolnih jedinjenja i teorijskim proračunima, predstavlja savremen i pouzdan pristup u ispitivanju funkcionalnih svojstava vina.

#### 4.9.4. Procena ukupnih fenola u uzorcima primenom Folin-Ciocalteu reagensa

Metod se zasniva na redoks reakciji između fenolnih jedinjenja prisutnih u uzorku i Folin–Ciocalteu reagensa. U alkalnim uslovima dolazi do redukcije fosfomolibdatnih i fosfovolframatnih kompleksa, pri čemu se formira intenzivno plavo obojen proizvod. Jačina razvijene boje zavisi od ukupnog redukcionog kapaciteta uzorka, koji se u najvećoj meri povezuje sa prisustvom fenolnih jedinjenja.

Formirani obojeni kompleks se kvantifikuje spektrofotometrijski merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 765 nm. Rezultati se izražavaju kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/L vina), na osnovu prethodno izrađene kalibracione krive.

##### Hemikalije i reagensi

Za izvođenje metode korišćene su hemikalije analitičke čistoće:

- Folin–Ciocalteu reagens (komercijalni rastvor)
- Natrijum-karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Galna kiselina (standard)
- Destilovana/dejonizovana voda

##### Aparatura i laboratorijsko posuđe

- UV–Vis spektrofotometar sa kvarcnim kivetama (optički put 1 cm)
- Analitička vaga ( $\pm 0,1$  mg)
- Automatske mikropipete (0,1–5 mL)
- Volumetrijsko staklo (pipete, menzure, tikvice)
- Epruvete i stalci za epruvete
- Vortex mešać
- Tamne bočice za inkubaciju uzoraka

##### Priprema rastvora

Rastvor natrijum-karbonata (7,5 % m/v) pripreman je rastvaranjem 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u destilovanoj vodi, nakon čega je rastvor dopunjen do konačne zapremine od 100 mL.

Standardni rastvor galne kiseline (1000 mg/L) dobijen je rastvaranjem 100 mg galne kiseline u volumetrijskoj tikvici zapremine 100 mL, korišćenjem destilovane vode kao rastvarača. Iz ovog osnovnog rastvora pripremani su radni standardi u koncentracionom opsegu od 50 do 500 mg/L, koji su korišćeni za izradu kalibracione krive.

##### Eksperimentalni postupak

U epruvetu je sekvencijalno dodavano 0,1 mL uzorka vina, koji je po potrebi prethodno

razblažen dejonizovanom vodom, nakon čega je dodato 0,5 mL Folin–Ciocalteu reagensa.

Nakon kratke inkubacije od 3–5 minuta, u smešu je uneto 1,5 mL rastvora natrijum-karbonata (7,5 % m/v), a zatim je sistem dopunjen destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 mL.

Reakciona smeša je homogenizovana vortexom i ostavljena da inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, kako bi se omogućio potpuni razvoj plavo obojenog kompleksa.

Apsorbanca je nakon inkubacije merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 765 nm, pri čemu je kao blank korišćen uzorak pripremljen istim postupkom, ali bez dodatka vina, gde je umesto uzorka dodata destilovana voda.

Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja.

Kalibraciona kriva i proračun rezultata

Kalibraciona kriva konstruisana je na osnovu merenja apsorbance standardnih rastvora galne kiseline različitih koncentracija. Dobijena je linearna zavisnost oblika:

$$A = a + b \cdot C$$

gde je A apsorbanca, C koncentracija galne kiseline izražena u mg/L, dok a predstavlja odsečak na y-osi, a b nagib kalibracione prave.

Na osnovu dobijene kalibracione jednačine određivana je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima vina, uz korekciju na faktor razblaženja.

Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline po litru vina (mg GAE/L) i prikazani su kao srednja vrednost sa pripadajućom standardnom devijacijom.

Iako Folin–Ciocalteu postupak ne omogućava diferencijaciju pojedinačnih fenolnih komponenti, on se široko koristi kao brz i reproducibilan pokazatelj ukupnog fenolnog potencijala uzoraka vina.

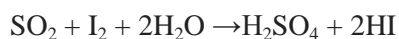
Potrebno je naglasiti da reagens može reagovati i sa drugim redukcionim supstancama prisutnim u vinu, kao što su askorbinska kiselina, redukujući šećeri i sumpor-dioksid. Zbog toga se rezultati ovog testa često interpretiraju zajedno sa podacima dobijenim naprednim analitičkim tehnikama, poput HPLC–DAD i LC–MS/MS analiza, koje omogućavaju detaljnu identifikaciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

#### **4.9.5. Jodometrijsko određivanje ukupnog i slobodnog sumpor-dioksida u vinu (Ripper metoda)**

Sumpor-dioksid (SO<sub>2</sub>) predstavlja jedan od najvažnijih enoloških aditiva zbog svoje dvostruke uloge: deluje kao snažan antioksidans i kao antimikrobno sredstvo. Njegovo prisustvo u vinu usporava oksidativne procese, stabilizuje boju, štiti fenolna jedinjenja i sprečava razvoj neželjene mikroflore. U vinu se SO<sub>2</sub> nalazi u više hemijskih oblika, čija je raspodela uslovljena pH vrednošću i sastavom matriksa:

Slobodni SO<sub>2</sub> predstavlja hemijski aktivnu frakciju sumpor-dioksida, koja obuhvata molekularni SO<sub>2</sub>, kao i bisulfitne i sulfitne jone, i odgovorna je za ispoljavanje antioksidativnog i antimikrobnog dejstva u vinu. Vezani SO<sub>2</sub> formira se reakcijom sa karbonilnim jedinjenjima, pre svega acetaldehidom, ali i sa šećerima i drugim komponentama prisutnim u vinu. Ukupni SO<sub>2</sub> predstavlja zbir slobodne i vezane forme ovog jedinjenja.

Za kvantitativno određivanje pojedinačnih frakcija primenjuje se klasična Ripperova metoda, koja se zasniva na jodometrijskoj titraciji u kiselj sredini, pri čemu se sumpor-dioksid oksiduje jodom. Hemijska reakcija odvija se prema sledećoj jednačini:



Po završetku reakcije, višak joda gradi intenzivno plavo obojenje sa škrobom, čime se vizuelno određuje krajnja tačka titracije. Metoda omogućava pouzdano određivanje sadržaja slobodnog SO<sub>2</sub> direktnom titracijom, dok se za određivanje ukupnog SO<sub>2</sub> prethodno sprovodi alkalna hidroliza uzorka radi oslobađanja vezanog oblika.

U kontekstu ispitivanja antioksidativnog kapaciteta vina, određivanje slobodnog SO<sub>2</sub> ima poseban značaj jer upravo ova frakcija neposredno učestvuje u zaštiti fenolnih jedinjenja od oksidacije. Ukupni SO<sub>2</sub> daje širu sliku hemijske stabilnosti vina, ali je funkcionalna antioksidativna aktivnost dominantno povezana sa koncentracijom slobodnog, naročito molekularnog oblika koji zavisi od pH vrednosti vina.

#### Materijal i hemikalije

Za izvođenje analize korišćene su hemikalije analitičke čistoće:

- Standardni rastvor joda, c = 0,02 N
- Rastvor škroba, 1 % (m/V) – indikator
- Razblažena sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1:3) ili sirćetna kiselina – za zakiseljavanje sredine
- Natrijum-hidroksid (NaOH), 1 M – za alkalnu hidrolizu pri određivanju ukupnog SO<sub>2</sub>
- Destilovana/dejonizovana voda

#### Aparatura i laboratorijski pribor

- Bureta (25 mL)
- Erlenmajerove tikvice (250 mL)
- Automatske pipete sa nastavcima
- Staklene pipete i menzure
- Magnetna mešalica (ili ručno mešanje)
- Analitička vaga

#### 4.9.6. Analitičko određivanje slobodnog SO<sub>2</sub>

U erlenmajerovu tikvicu uneto je 10 mL uzorka vina, nakon čega je dodato približno 20 mL destilovane vode. Radi obezbeđivanja kisele sredine, dodat je 2–3 mL razblažene kiseline. Nakon toga je dodat 1 mL rastvora škroba kao indikatora.

Titracija je vršena standardnim rastvorom joda (0,02 N) uz stalno mešanje, do pojave postojanog plavog obojenja koje je trajalo najmanje 30 sekundi. Zapremina utrošenog joda zabeležena je i korišćena za proračun koncentracije slobodnog SO<sub>2</sub> u uzorku.

#### 4.9.7. Analitičko određivanje ukupnog SO<sub>2</sub>

Za određivanje ukupnog sadržaja SO<sub>2</sub>, postupak započinje alkalnom hidrolizom radi oslobađanja vezanog oblika. U tikvicu sa 10 mL vina i 20 mL destilovane vode dodat je 1 mL rastvora NaOH (1 M). Uzorak je zatim inkubiran na sobnoj temperature u trajanju od 10 do 15 minuta, kako bi došlo do razgradnje adukata nastali između SO<sub>2</sub> i karbonilnih jedinjenja.

Nakon hidrolize, uzorak je zakiseljen dodatkom 2–3 mL razblažene kiseline, dodat je 1 mL rastvora skroba, a zatim je izvršena titracija rastvorom joda (0,02 N) do pojave stabilnog plavog obojenja. Zabeležena zapremina joda korišćena je za proračun koncentracije ukupnog SO<sub>2</sub>.

Proračun

Koncentracija SO<sub>2</sub> (mg/L) izračunava se prema izrazu:

$$\text{SO}_2 \text{ (mg/L)} = V_{I_2} \times N_{I_2} \times 64000 / V_{uz}$$

gde je: V<sub>I<sub>2</sub></sub> – zapremina utrošenog rastvora joda (mL) N<sub>I<sub>2</sub></sub> – normalnost rastvora joda 32 – ekvivalentna masa SO<sub>2</sub> V<sub>uz</sub> – zapremina uzorka vina (mL).

Razlika između ukupnog i slobodnog SO<sub>2</sub> daje vrednost vezanog SO<sub>2</sub> u uzorku.

Ova metoda predstavlja standardnu, reproduktivnu i široko primenjivanu proceduru u enološkoj analitici, pogodnu za rutinsku kontrolu kvaliteta vina, kao i za naučna istraživanja usmerena na procenu hemijske stabilnosti i antioksidativnog potencijala vinskih uzoraka.

#### 4.9.8. HPLC–DAD analiza fenolnih jedinjenja

Kvalitativno i kvantitativno određivanje pojedinačnih fenolnih jedinjenja u uzorcima vina i komine sprovedeno je pomoću visokoeфикаsne tečne hromatografije opremljene diode-array detektorom (HPLC–DAD). Ova tehnika omogućava efikasno razdvajanje složene smeše fenolnih komponenti prisutnih u vinskoj matrici, njihovu pouzdanu identifikaciju na osnovu UV/Vis spektralnih karakteristika, kao i preciznu kvantifikaciju primenom metode spoljašnje standardizacije.

Separacija analiziranih jedinjenja izvedena je primenom reverzno-fazne C18 kolone uz gradijentni režim eluiranja, što je omogućilo simultano razdvajanje fenolnih kiselina, flavan-3-ola, flavonola, stilbene i antocijana u okviru jednog hromatografskog ciklusa. Detekcija je vršena na više talasnih dužina karakterističnih za pojedine klase jedinjenja, dok su kompletni spektralni zapisi u opsegu 200–600 nm korišćeni kao dodatni kriterijum identifikacije.

Radi potvrde identiteta jedinjenja i njihove strukturne karakterizacije, odabrani uzorci analizirani su i primenom LC–MS/MS tehnike sa elektrosprej jonizacijom.

## Materijal i hemikalije

Za pripremu mobilnih faza, rastvora i standarda korišćene su hemikalije HPLC i LC-MS čistoće:

- Ultračista voda (18,2 M $\Omega$ ·cm, Milli-Q ili ekvivalent)
- Acetonitril (HPLC grade,  $\geq 99,9$  %)
- Metanol (HPLC grade)
- Mravlja kiselina ( $\geq 98$  %, p.a.)
- Sirćetna kiselina, glacijalna (p.a.)
- Standardi fenolnih jedinjenja ( $\geq 95$  % čistoće)

Fenolne kiseline obuhvatale su elaginsku, hlorogensku, sinapinsku, ferulnu, p-kumarinsku, trans-kafeinsku, siringinsku, vanilinsku i galnu kiselinu.

Flavonoidna jedinjenja i flavan-3-oli uključivali su morin, krizin, naringin, naringenin, apigenin, luteolin, kaempferol, miricetin, kvercetin-3-glukozid, kvercetin, rutin, (-)-epigalokatehin-galat (EGCG), (-)-epikatehin i (+)-katehin.

Stilbeni i antocijani bili su predstavljeni jedinjenjima trans-resveratrol, malvidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-sophorosid i cijanidin-3-O-glukozid.

Pojedinačni standardni rastvori pripremani su u metanolu ili u smeši metanola i vode, nakon čega su serijskim razblaživanjem dobijani rastvori različitih koncentracija za konstrukciju kalibracionih krivih.

## Aparatura

Analize su izvršene na sledećem instrumentalnom sistemu:

- HPLC sistem sa binarnom pumpom visokog pritiska
- Autosampler sa kontrolisanom temperaturom
- Termostatirana kolona
- Diode-array detektor (DAD)
- LC-MS/MS sistem sa trostrukim kvadrupolom i ESI izvorom

Pomoćna oprema:

- Ultrazvučna kupka za degazaciju
- Membranski filteri 0,45  $\mu$ m (celulozni/PTFE)
- Analitička vaga ( $\pm 0,0001$  g)
- pH metar
- Mikropipete i volumetrijsko staklo klase A

## Priprema uzoraka

Pre hromatografske analize uzorci vina podvrgnuti su filtraciji kroz membranske filtere veličine pora 0,45  $\mu$ m. Kada je bilo potrebno, vršeno je dodatno razblaživanje metanolom ili ultračistom vodom kako bi intenzitet signala odgovarao linearnom području kalibracione krive.

Hromatografski parametri (HPLC–DAD) zapremina injektovanog uzorka: 5–20  $\mu$ L, protok mobilne faze: 0,8–1,0 mL/min, temperatura kolone: 25–30 °C, C18 kolona dimenzija 250  $\times$  4,6 mm, sa veličinom čestica od 5  $\mu$ m.

Sastav mobilne faze

Mobilna faza B: smeša acetonitrila, mravlje kiseline i vode u odnosu 80:5:15 (v/v),  
Mobilna faza A: smeša vode i mravlje kiseline u odnosu 95:5 (v/v).

Na taj način obezbeđeni su odgovarajući uslovi za efikasnu separaciju analiziranih fenolnih jedinjenja.

**Tabela 5.** Gradijent eluiranja

Vreme (min)	A (%)	B (%)
0–10	95	5
10–28	90	10
28–35	80	20
35–40	60	40
40–45	50	50
45–50	95	5

Detekcija i identifikacija (DAD)

Praćenje i identifikacija analiziranih jedinjenja vršeni su merenjem apsorbance na talasnim dužinama specifičnim za pojedine grupe fenolnih jedinjenja:

- 520 nm – antocijani,
- 360 nm – flavonoli,
- 320 nm – hidroksicimetne kiseline,
- 280 nm – fenolne kiseline i flavan-3-oli.

Izbor navedenih talasnih dužina omogućio je pouzdanu detekciju i identifikaciju različitih klasa fenolnih jedinjenja prisutnih u analiziranim uzorcima.

LC–MS/MS potvrda identiteta

Za odabrana jedinjenja identitet je potvrđen LC-MS/MS analizom:

- Jonizacija: ESI (pozitivni i negativni mod)
- Režim rada: MRM
- Temperatura izvora: 300–350 °C
- Gas za desolvaciju: azot (N<sub>2</sub>)
- MS/MS fragmentacija korišćena za strukturnu potvrdu

Kvantifikacija je izvršena metodom eksternog standarda. Za svako jedinjenje konstruisana je kalibraciona kriva u odgovarajućem koncentracionom opsegu. Koncentracije u uzorcima izračunate su na osnovu površine pika i jednačine linearne regresije, uz korekciju na faktor razblaženja. Rezultati su izraženi u mg/L.

Količinsko određivanje analiziranih jedinjenja sprovedeno je primenom metode eksternog standarda. Za svaki analit posebno su pripremljene kalibracione krive u odgovarajućem opsegu koncentracija. Sadržaj jedinjenja u uzorcima određivan je na osnovu površine hromatografskog pika i jednačine dobijene linearnom regresionom analizom, pri čemu je u obračun uključen i faktor razblaženja. Dobijene vrednosti prikazane su u mg/L.

#### Validacija metode

Pouzdanost primenjene metode proverena je u skladu sa ICH smernicama, kroz procenu sledećih validacionih parametara:

- tačnost, određena metodom dodatka standarda,
- preciznost, pri čemu je relativna standardna devijacija (RSD) bila manja od 5%,
- granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ),
- linearnost kalibracionih zavisnosti ( $R^2 > 0,995$ ),
- ponovljivost metode, ispitana u okviru istog dana i između različitih dana merenja.

Primena HPLC–DAD u kombinaciji sa LC–MS/MS analizom omogućava pouzdanu identifikaciju i preciznu kvantifikaciju širokog spektra fenolnih jedinjenja u vinu i komini, čime se obezbeđuje detaljan uvid u fenolni profil uzoraka i njihovu povezanost sa antioksidativnim potencijalom i hemijskom stabilnošću vina.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Slobodni SO<sub>2</sub> (Metoda po Riperu)

Riperova metoda predstavlja jednu od najstarijih i najčešće primenjivanih jodometrijskih metoda za određivanje sadržaja slobodnog i ukupnog sumpor-dioksida u vinu. Zasniva se na oksidaciji SO<sub>2</sub> jodom u kiseloj sredini uz prisustvo skroba kao indikatora krajnje tačke titracije. Zbog svoje jednostavnosti, dostupnosti reagensa i brze primene, metoda je široko zastupljena u rutinskim enološkim analizama, naročito u podrumskim uslovima i manjim laboratorijama.

Međutim, savremena analitička enologija ukazuje da primena ove metode u crvenim vinima bogatim fenolnim jedinjenjima ima određena ograničenja koja mogu uticati na tačnost dobijenih rezultata.

Osnovne prednosti ove metode ogledaju se u sledećem:

- Jednostavna i brza procedura izvođenja bez potrebe za složenom aparaturom,
- mogućnost primene u rutinskim podrumskim i laboratorijskim uslovima,
- niska cena reagensa i opreme,
- dobra ponovljivost rezultata kod belih vina i vina sa niskim sadržajem fenolnih jedinjenja,
- pouzdana procena ukupnog redoks potencijala vina u smislu njegove oksidativne stabilnosti.

Zbog navedenih karakteristika, Riperova metoda se i dalje smatra referentnom metodom za brzu kontrolu sumporisanja tokom vinifikacije.

Kod crvenih vina, koja su bogata fenolnim jedinjenjima (antocijani, tanini, flavonoidi), dolazi do značajnih interferencija tokom titracije. Fenolne komponente, kao i neki produkti njihove oksidacije, mogu reagovati sa jodom, što dovodi do povećanog utroška joda tokom titracije, precenjivanja koncentracije slobodnog SO<sub>2</sub>, otežanog uočavanja jasne krajnje tačke titracije zbog intenzivne boje vina i nemogućnosti jasnog razlikovanja slobodnog i vezanog oblika SO<sub>2</sub>.

Poseban problem predstavlja činjenica da se u alkalnoj sredini tokom određivanja ukupnog SO<sub>2</sub> oslobađa vezani SO<sub>2</sub>, ali fenolna jedinjenja i dalje ostaju prisutna i mogu učestvovati u redoks reakcijama sa jodom. Zbog toga se u praksi često dobijaju veoma slične ili čak identične vrednosti slobodnog i ukupnog SO<sub>2</sub>, što ne odgovara stvarnom hemijskom stanju u vinu.

Takođe, prisustvo acetaldehida, šećera i drugih karbonilnih jedinjenja dodatno komplikuje interpretaciju rezultata, jer se deo vezanog SO<sub>2</sub> ne oslobađa u potpunosti ili reaguje sporednim reakcijama.

Iako Riperova metoda daje dobar uvid u ukupni antioksidativni potencijal vina, njena sposobnost preciznog kvantitativnog razdvajanja slobodnog i vezanog SO<sub>2</sub> u crvenim vinima je ograničena. Zbog toga se u savremenim analizama preporučuje primena preciznijih metoda, kao što su aeraciono-oksidaciona metoda, destilaciona metoda, ili instrumentalne metode (npr. protočna analiza, spektrofotometrija). Ove metode omogućavaju tačnije razdvajanje oblika SO<sub>2</sub> bez uticaja fenolnih interferencija.

Riperova metoda zadržava značajnu praktičnu vrednost u enologiji kao brza i dostupna metoda kontrole sumporisanja. Međutim, u analizi crvenih vina bogatih fenolnim jedinjenjima, rezultate treba tumačiti sa oprezom i u kontekstu mogućih interferencija. U naučnim istraživanjima, naročito u doktorskim disertacijama koje se bave fenolnim sastavom i antioksidativnošću vina, preporučuje se kombinovanje Riperove metode sa preciznijim analitičkim tehnikama radi dobijanja pouzdanijih podataka o stvarnom sadržaju slobodnog i vezanog sumpor-dioksida.

Određivanje sadržaja slobodnog i ukupnog sumpor-dioksida u uzorcima vina izvršeno je jodometrijskom titracijom prema Riperovoj metodi. Ova metoda se zasniva na oksidaciji SO<sub>2</sub> jodom u kiseloj sredini uz prisustvo skroba kao indikatora, pri čemu intenzitet obojenja predstavlja krajnju tačku titracije. Primenjeni faktor 12,8 omogućio je preračunavanje utroška 0,02 N rastvora joda na koncentraciju SO<sub>2</sub> izraženu u mg/L vina.

**Tabela 6.** Slobodni SO<sub>2</sub>

Redni broj	Naziv vina	Slobodni SO <sub>2</sub>
1.	Goriška brda Cabernet 2016	1,3 x 2 x 12,8 = 33,28 mg/l
2.	Vipava 1894 Cabernet 2015	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
3.	Slovenska ISTRA Cabernet 2015	1,1 x 2 x 12,8 = 28,16 mg/l
4.	Goriška brda Merlot 2016	1,2 x 2 x 12,8 = 30,72 mg/l
5.	Goriška brda Merlot 2015	0,8 x 2 x 12,8 = 20,48 mg/l
6.	Mačkov podrum Merlot 2015	0,7 x 2 x 12,8 = 17,92 mg/l
7.	Deželno vino PGO Merlot 2015	1,0 x 2 x 12,8 = 25,6 mg/l
8.	Impresija Merlot 2015	1,0 x 2 x 12,8 = 25,6 mg/l
9.	Belica Merlot 2016	1,2 x 2 x 12,8 = 30,72 mg/l
10.	Impresija Merlot 2016	1,3 x 2 x 12,8 = 33,28 mg/l
11.	Diva Cabernet 2015	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
12.	Diva Cabernet 2016	1,0 x 2 x 12,8 = 25,6 mg/l
13.	Impresija Cabernet 2015	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
14.	Rose Merlot 2016	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
15.	Impresija Cabernet 2016	0,8 x 2 x 12,8 = 20,48 mg/l
16.	Vipava 1894 Merlot 2015	1,1 x 2 x 12,8 = 28,16 mg/l

Koncentracija slobodnog SO<sub>2</sub> u ispitivanim uzorcima vina iznosila je od 17,92 do 33,28 mg/L.

Najmanji sadržaj slobodnog SO<sub>2</sub> utvrđen je u uzorku vina Mačkov podrum Merlot 2015, gde je iznosio 17,92 mg/L. Nasuprot tome, najveća koncentracija ovog jedinjenja zabeležena je kod vina Goriška brda Cabernet 2016 i Impresija Merlot 2016, sa vrednošću od 33,28 mg/L.

Većina analiziranih uzoraka pokazuje koncentracije slobodnog SO<sub>2</sub> u intervalu 23–31 mg/L, što se smatra tehnološki optimalnim opsegom za očuvanje oksidativne stabilnosti crvenih vina bez negativnog uticaja na senzorna svojstva. Ove vrednosti ukazuju na adekvatnu primenu sumporisanja tokom vinifikacije i skladištenja, sa ciljem zaštite fenolnih jedinjenja i aromatskog profila vina od oksidacije.

Analiza rezultata pokazuje da su vina iz berbe 2016. godine uglavnom imala veći sadržaj SO<sub>2</sub> u poređenju sa vinima proizvedenim 2015. godine. Ovakva pojava može se objasniti kraćim vremenom odležavanja mlađih vina, zbog čega dolazi do manjeg smanjenja koncentracije slobodnog sumpor-dioksida tokom skladištenja. Na njegovo postepeno trošenje utiču reakcije vezivanja sa fenolnim jedinjenjima, acetaldehidom, šećerima i drugim komponentama vina.

## 5.2. Ukupni SO<sub>2</sub>

Vrednosti ukupnog SO<sub>2</sub> pokazale su identičan opseg kao i slobodni SO<sub>2</sub> (17,92–33,28 mg/L). Ovakav rezultat ukazuje na izuzetno nizak sadržaj vezanog SO<sub>2</sub> u svim analiziranim uzorcima vina.

S obzirom na to da ukupni SO<sub>2</sub> predstavlja zbir slobodnog i vezanog oblika, očekivano je da ukupne vrednosti budu značajno više od vrednosti slobodnog SO<sub>2</sub>, naročito kod starijih vina, gde je tokom vremena dolazilo do vezivanja SO<sub>2</sub> za produkte oksidacije (pre svega acetaldehid) i fenolne komponente.

**Tabela 7.** Ukupni SO<sub>2</sub>

Redni broj	Naziv vina	Ukupni SO <sub>2</sub>
1.	Goriška brda Cabernet 2016	1,3 x 2 x 12,8 = 33,28 mg/l
2.	Vipava 1894 Cabernet 2015	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
3.	Slovenska ISTR A Kabernet 2015	1,1 x 2 x 12,8 = 28,16 mg/l
4.	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	1,2 x 2 x 12,8 = 30,72 mg/l
5.	Goriška brda Merlot 2016	0,8 x 2 x 12,8 = 20,48 mg/l
6.	Mačkov podrum Merlot 2015	0,7 x 2 x 12,8 = 17,92 mg/l
7.	Deželno vino PGO Merlot 2015	1,0 x 2 x 12,8 = 25,6 mg/l
8.	Impresija Merlot 2015	1,0 x 2 x 12,8 = 25,6 mg/l
9.	Belica Merlot 2016	1,2 x 2 x 12,8 = 30,72 mg/l

Redni broj	Naziv vina	Ukupni SO <sub>2</sub>
10.	Impresija Merlot 2016	1,3 x 2 x 12,8 = 33,28 mg/l
11.	Diva Cabernet 2015	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
12.	Diva Cabernet 2016	1,0 x 2 x 12,8 = 25,6 mg/l
13.	Impresija Cabernet 2015	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
14.	Rose Merlot 2016	0,9 x 2 x 12,8 = 23,04 mg/l
15.	Impresija Cabernet 2016	0,8 x 2 x 12,8 = 20,48 mg/l
16.	Vipava 1894 Merlot 2015	1,1 x 2 x 12,8 = 28,16 mg/l

Podudarnost vrednosti slobodnog i ukupnog SO<sub>2</sub> u svim uzorcima ukazuje na sledeće moguće činjenice:

- veoma mali udeo vezanog SO<sub>2</sub>,
- visok stepen reduktivne zaštite vina tokom skladištenja,
- mali sadržaj oksidacionih produkata u vinu,
- ili ograničenja same Riperove metode u diferencijaciji slobodnog i ukupnog SO<sub>2</sub> u crvenim vinima bogatim fenolima.

Poznato je da Riperova metoda u crvenim vinima može dovesti do precenjivanja vrednosti slobodnog SO<sub>2</sub> usled interferencije fenolnih jedinjenja koja takođe reaguju sa jodom. Ovo može objasniti identičnost dobijenih rezultata za slobodni i ukupni SO<sub>2</sub>.

Dobijene koncentracije SO<sub>2</sub> u svim vinima nalaze se znatno ispod maksimalno dozvoljenih vrednosti propisanih međunarodnim enološkim standardima (OIV i EU regulativa), koji za crvena vina dozvoljavaju ukupni SO<sub>2</sub> do 150 mg/L. To potvrđuje da su analizirana vina proizvedena uz umerenu i kontrolisanu primenu sumpor-dioksida.

Sa enološkog aspekta, ovakve koncentracije slobodnog SO<sub>2</sub> obezbeđuju zaštitu antocijana i tanina od oksidacije, očuvanje boje i fenolne stabilnosti, inhibiciju razvoja nepoželjnih mikroorganizama i očuvanje aromatskog i senzornog profila vina.

Istovremeno, nizak nivo vezanog SO<sub>2</sub> ukazuje na dobar kvalitet sirovine i pravilno vođenu fermentaciju bez značajnog stvaranja acetaldehida, koji je glavni vezujući agens za SO<sub>2</sub>.

Rezultati određivanja slobodnog i ukupnog SO<sub>2</sub> metodom po Riperu pokazuju da su sva analizirana vina u optimalnom tehnološkom opsegu sumporisanja. Međutim, identične vrednosti slobodnog i ukupnog SO<sub>2</sub> ukazuju na poznata ograničenja Riperove metode u analizi crvenih vina bogatih fenolnim jedinjenjima, gde može doći do interferencija tokom titracije.

Zbog toga se može zaključiti da Riperova metoda daje pouzdanu procenu ukupnog antioksidativnog kapaciteta vina u smislu redoks sistema, ali njena sposobnost preciznog razdvajanja slobodnog i vezanog SO<sub>2</sub> u crvenim vinima može biti ograničena.

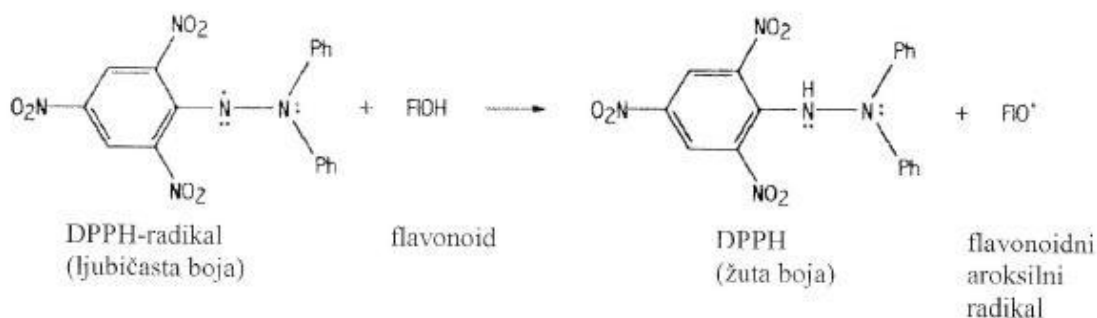
Savremena dostignuća u oblasti analitičke enologije potvrđuju dobijene nalaze i ukazuju da se za tačnu analizu vezanog SO<sub>2</sub> preporučuje primena aeraciono-oksidacionih i instrumentalnih metoda.

### 5.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti vina

#### 5.3.1. DPPH

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) predstavlja stabilan slobodni radikal karakteristične ljubičaste boje, čija je apsorpcija najizraženija u području oko 515 nm. Prisustvom jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima dolazi do redukcije ovog radikala, pri čemu nastaje odgovarajući hidrazinski oblik svetložute boje (Slika 22).

Sposobnost antioksidanasa da neutrališu DPPH radikal može se procenjivati primenom elektron-spin rezonance ili spektrofotometrijskim praćenjem promene apsorbance. Efekat reakcije određuje se na osnovu smanjenja intenziteta apsorpcije u opsegu talasnih dužina od 515 do 528 nm, sve do uspostavljanja stabilne vrednosti.



**Slika 22.** Redukcija DPPH radikala

Antiradikalska aktivnost predstavlja količinu antioksidansa potrebnu da izazove smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50%, a ovaj parametar označava se kao EC<sub>50</sub> (Effective Concentration 50). Za pravilno određivanje EC<sub>50</sub> neophodno je da reakcija dostigne ravnotežno stanje, odnosno fazu u kojoj daljih promena koncentracije više nema.

Vrednost EC<sub>50</sub> određuje se grafički, konstruisanjem zavisnosti procenta inhibicije DPPH radikala (ili preostale koncentracije DPPH) od odnosa koncentracije antioksidansa i koncentracije DPPH radikala. Na osnovu tako dobijene krive očitava se koncentracija antioksidansa koja obezbeđuje 50% neutralizacije početne količine radikala.

$$I(\%) = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100$$

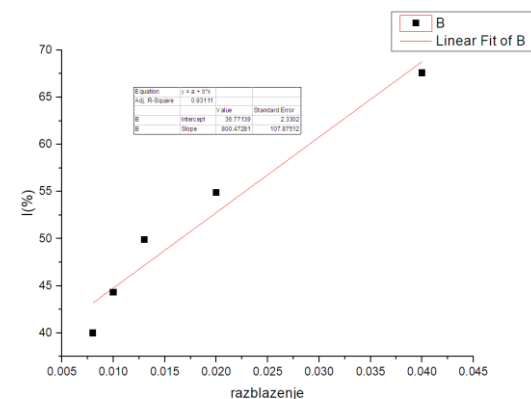
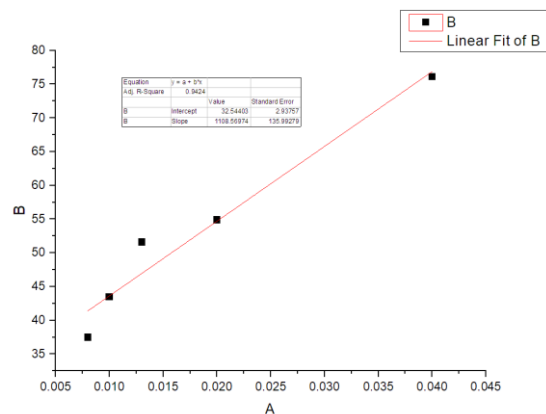
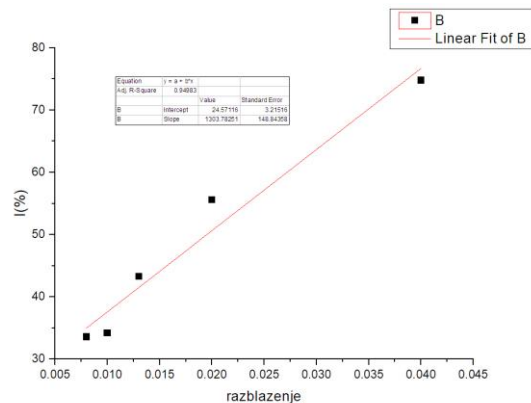
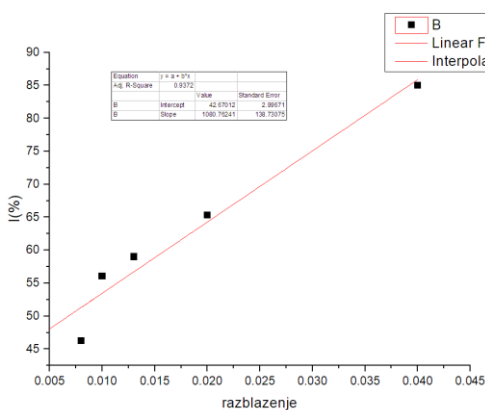
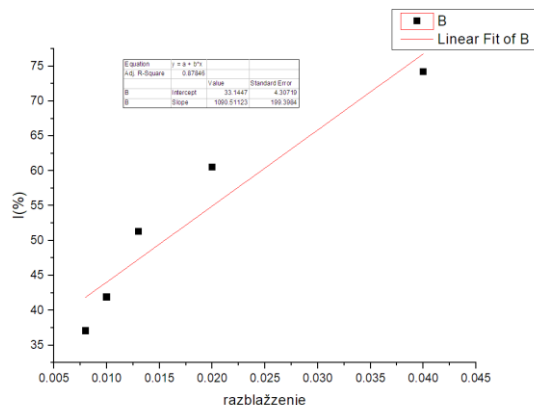
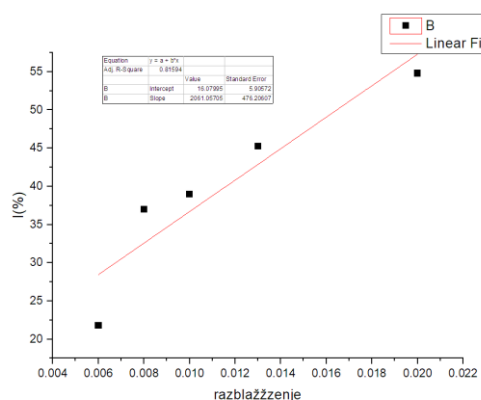
Antioksidativni potencijal analiziranih uzoraka vina procenjen je korišćenjem DPPH metode, koja se zasniva na reakciji između antioksidativnih komponenti vina i stabilnog slobodnog radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH). Prisustvo antioksidanasa dovodi do redukcije DPPH radikala, što se manifestuje smanjenjem intenziteta njegove karakteristične ljubičaste boje.

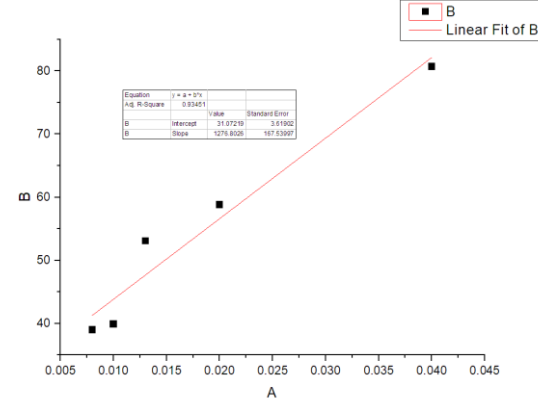
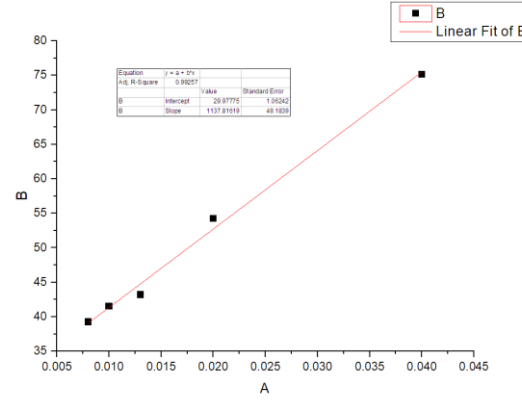
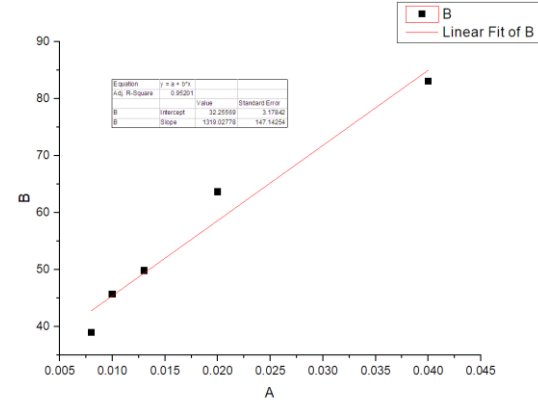
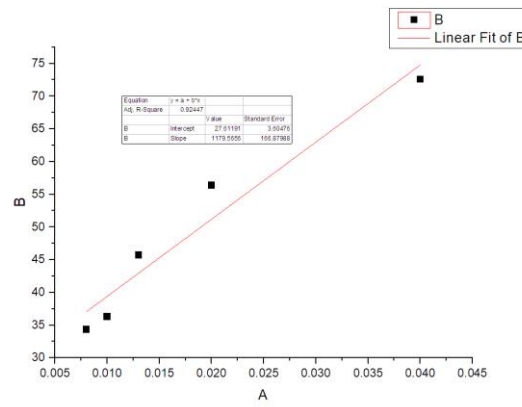
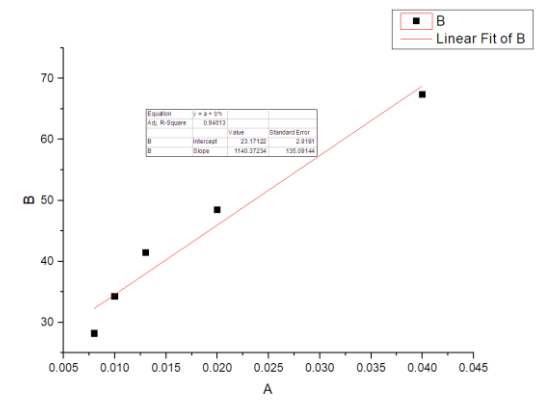
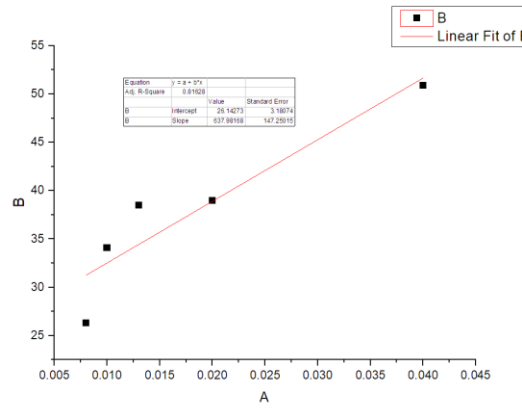
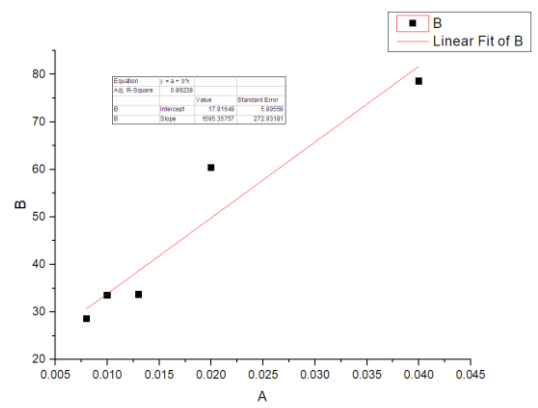
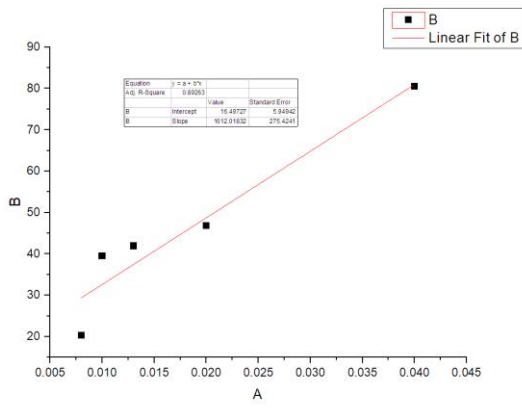
Stepen ove promene praćen je spektrofotometrijskim merenjem apsorbanace pri talasnoj dužini od 525 nm, pri čemu je smanjenje apsorbanace bilo direktno povezano sa redukujućom sposobnošću fenolnih i drugih antioksidativno aktivnih jedinjenja prisutnih u vinu. Dobijeni rezultati prikazani su kao procenat inhibicije DPPH radikala (Tabela 8).

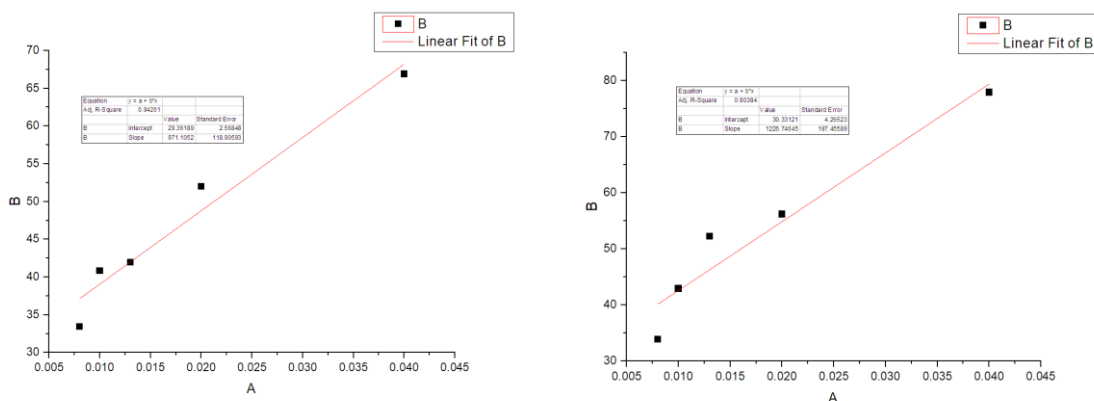
**Tabela 8.** Procenat inhibicije DPPH radikala

<b>Redni broj</b>	<b>Naziv vina</b>	<b>X</b>
1.	Goriška brda Cabernet 2016	1,64 %
2.	Vipava 1894 Cabernet 2015	1,54 %
3.	Slovenska ISTRA Kabernet 2015	0,678 %
4.	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	1,576 %
5.	Goriška brda Merlot 2016	1,9 %
6.	Mačkov podrum Merlot 2015	1,64 %
7.	Deželno vino PGO Merlot 2015	2,0 %
8.	Impresija Merlot 2015	2,0 %
9.	Belica Merlot 2016	3,7 %
10.	Impresija Merlot 2016	2,352 %
11.	Diva Cabernet 2015	1,899 %
12.	Diva Cabernet 2016	1,349 %
13.	Impresija Cabernet 2015	1,479 %
14.	Rose Merlot 2016	2,125 %
15.	Impresija Cabernet 2016	1,802 %
16.	Vipava 1894 Merlot 2015	1,608 %

Vrednost procenata inhibicije kretale su se u rasponu od 0,678 % do 3,7 %, pri čemu su uočene značajne razlike u antiradikalskoj aktivnosti između analiziranih uzoraka vina.







**Slika 23.** DPPH grafici ispitivanih vina po redosledu iz tabele

Najniža vrednost inhibicije zabeležena je kod vina Slovenska ISTRa Cabernet 2015 (0,678 %), dok je najviša vrednost utvrđena kod vina Belica Merlot 2016 (3,7 %). Većina uzoraka pokazuje vrednosti u intervalu 1,3–2,2 %, što ukazuje na umeren do izražen antiradikalni kapacitet tipičan za crvena vina bogata fenolnim jedinjenjima.

Povišene vrednosti inhibicije kod pojedinih Merlot vina (npr. Deželno vino PGO Merlot 2015, Impresija Merlot 2015, Impresija Merlot 2016) ukazuju na veći sadržaj jedinjenja sa izraženom redukujućom sposobnošću, pre svega flavonoida, antocijana i tanina, koji su dominantni nosioci antioksidativne aktivnosti u crvenim vinima.

U proseku, uzorci vina sorte Merlot ispoljili su nešto viši procenat inhibicije DPPH radikala u poređenju sa Cabernet vinima iste berbe. Ovakva razlika može se povezati sa varijacijama u fenolnom sastavu, pri čemu Merlot često sadrži veće količine lako ekstraktibilnih antocijana i flavan-3-ola koji efikasno učestvuju u reakciji sa DPPH radikalom.

Pored toga, uočeno je da vina berbe 2016. godine generalno pokazuju izraženiju antiradikalnu aktivnost u odnosu na uzorke iz 2015. godine, što se može objasniti kraćim vremenom odležavanja i time manjim stepenom oksidativne transformacije i razgradnje fenolnih jedinjenja tokom skladištenja.

DPPH test primarno meri sposobnost jedinjenja da doniraju vodonik ili elektron slobodnom radikal. U vinu, ovu sposobnost najviše ispoljavaju antocijani, flavonoli, flavan-3-oli (katehini i proantocijanidini) i fenolne kiseline.

Zbog toga se rezultati DPPH testa mogu direktno povezati sa ukupnim fenolnim sastavom i potencijalom vina da neutrališe slobodne radikale, što je od velikog značaja za oksidativnu stabilnost vina, ali i za njegov biološki antioksidativni potencijal.

S obzirom na to da je merenje vršeno nakon postizanja stabilne faze reakcije (45 minuta), rezultati predstavljaju realan prikaz dostignutog „steady state“ stanja reakcije između DPPH radikala i antioksidanasa iz vina. Kriterijum ponovljivosti (odstupanje manjih od 10 % između paralela) dodatno potvrđuje pouzdanost dobijenih vrednosti.

Iako DPPH metoda ne daje informaciju o identitetu pojedinačnih antioksidanasa, ona predstavlja pouzdanu, brzu i široko prihvaćenu metodu za procenu ukupne antiradikalne aktivnosti vina.

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da sva analizirana vina poseduju izražen antiradikalni kapacitet, sa značajnim varijacijama uslovljenim sortom grožđa, berbom i verovatno tehnološkim postupcima tokom vinifikacije.

Najizraženija aktivnost utvrđena je kod vina Belica Merlot 2016, što ukazuje na izuzetno visok sadržaj redukujućih fenolnih jedinjenja. Sa druge strane, najniža aktivnost kod Slovenska ISTRA Cabernet 2015 može ukazivati na niži sadržaj ovih jedinjenja ili na veći stepen njihove oksidativne transformacije tokom odležavanja.

DPPH metoda se u ovom istraživanju pokazala kao veoma koristan alat za komparativnu procenu antioksidativnog potencijala vina i pruža značajne informacije u korelaciji sa fenolnim sastavom i oksidativnom stabilnošću analiziranih uzoraka.

### 5.3.2. ABTS/TEAC metoda određivanja

Antioksidativni kapacitet ispitivanih vina određen je primenom TEAC (ABTS) metode, zasnovane na redukciji stabilnog ABTS<sup>•+</sup> katjonskog radikala u prisustvu antioksidanasa prisutnih u vinu. Intenzitet dekolizacije, praćen na 734 nm nakon 6 minuta reakcije, korišćen je za konstrukciju kalibracionih krivih i izračunavanje TEAC vrednosti izraženih kao mmol/L Trolox ekvivalenata.

**Tabela 9.** Vrednosti koeficijenta pravca (SLOPE)

Redni broj	Naziv vina	SLOPE
1.	Goriška brda Cabernet 2016	1098,78
2.	Vipava 1894 Cabernet 2015	971,34
3.	Slovenska ISTRA Cabernet 2015	909,79
4.	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	890,621
5.	Goriška brda Merlot 2016	650,07
6.	Mačkov podrum Merlot 2015	894,59
7.	Deželno vino PGO Merlot 2015	858,25
8.	Impresija Merlot 2015	974,57
9.	Belica Merlot 2016	766,42

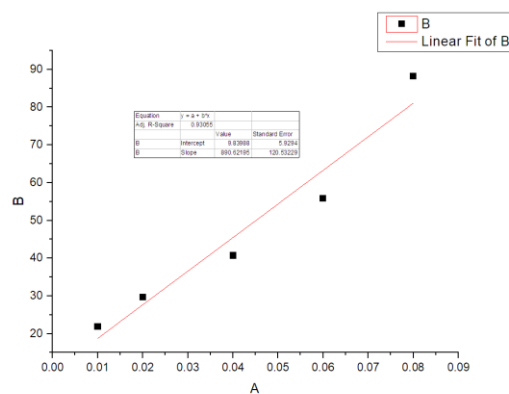
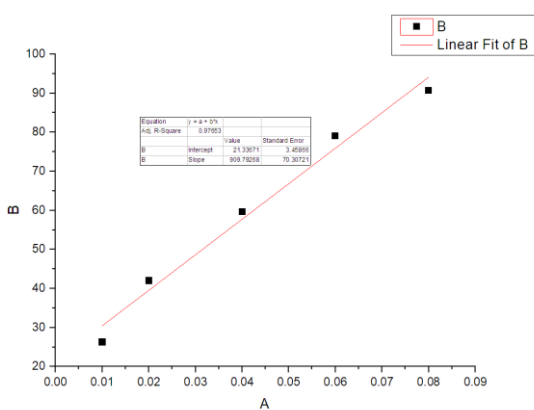
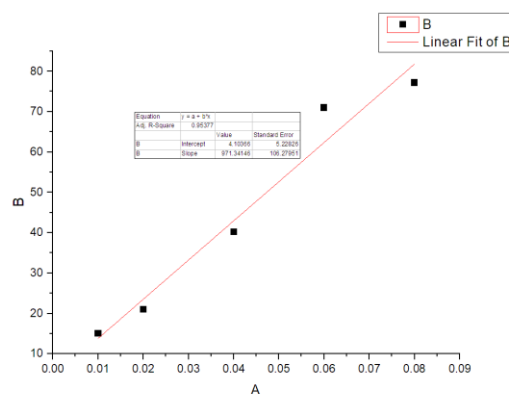
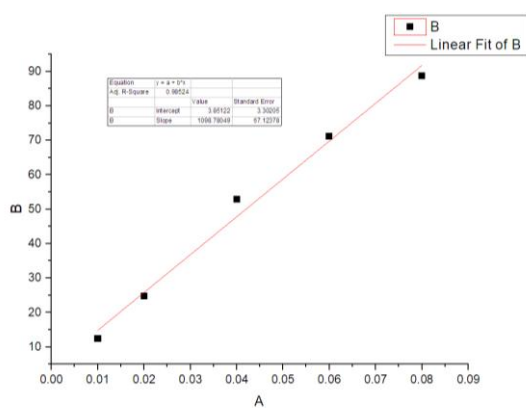
<b>Redni broj</b>	<b>Naziv vina</b>	<b>SLOPE</b>
10.	Impresija Merlot 2016	782,30
11.	Diva Cabernet 2015	1282,98
12.	Diva Cabernet 2016	1114,49
13.	Impresija Cabernet 2015	1052,23
14.	Rose Merlot 2016	733,13
15.	Impresija Cabernet 2016	1008,03
16.	Vipava 1894 Merlot 2015	899,19

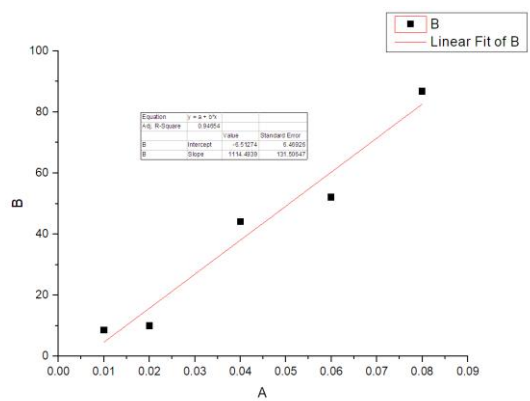
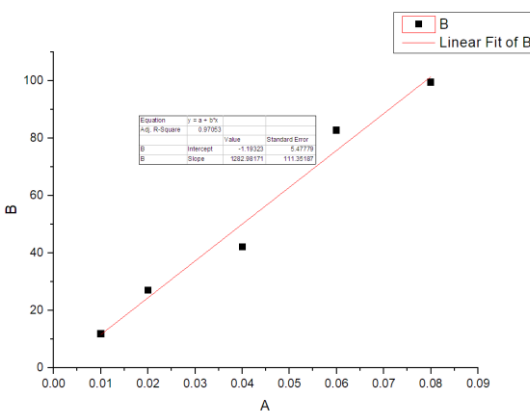
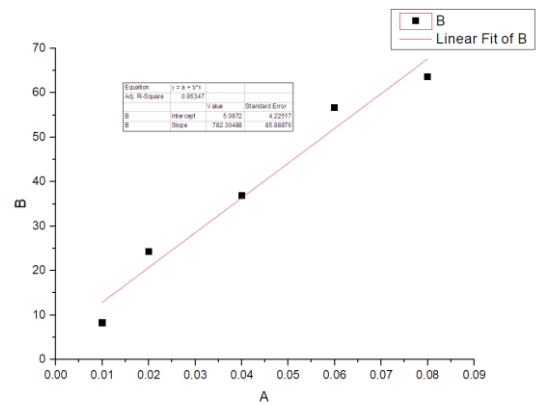
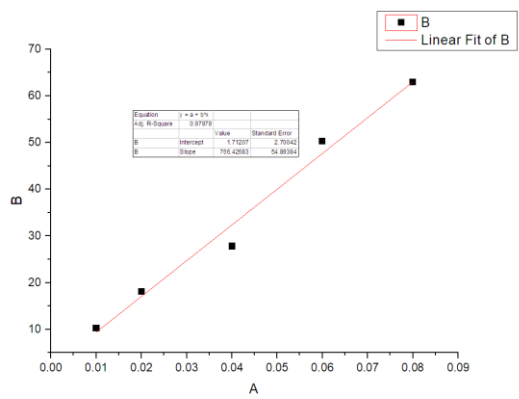
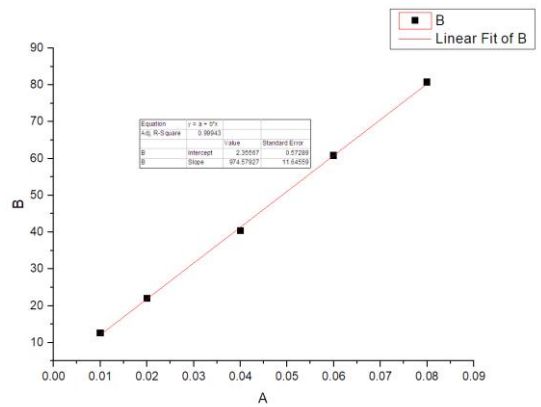
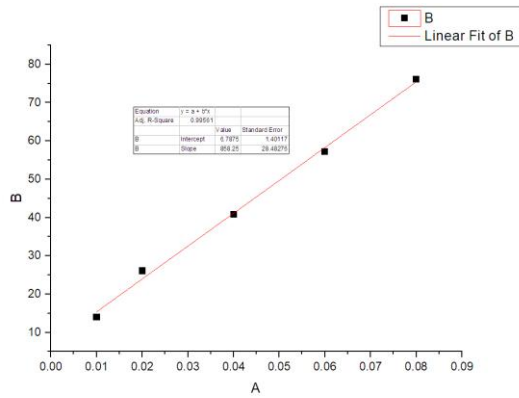
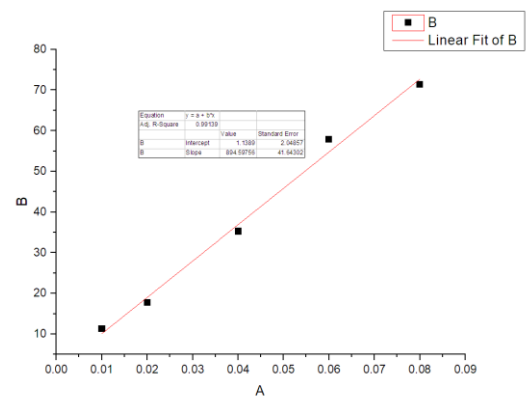
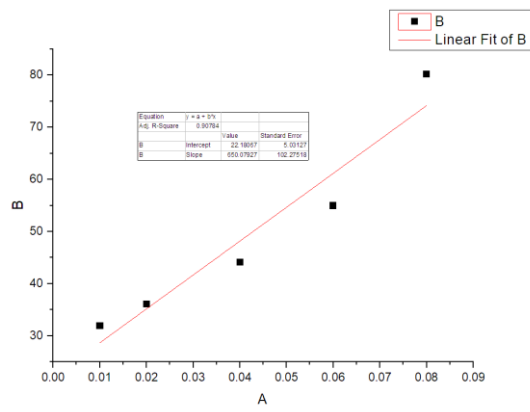
U Tabeli 10 prikazani su izračunati TEAC parametri, kao i odgovarajuće vrednosti koeficijenta pravca (slope) za analizirana vina.

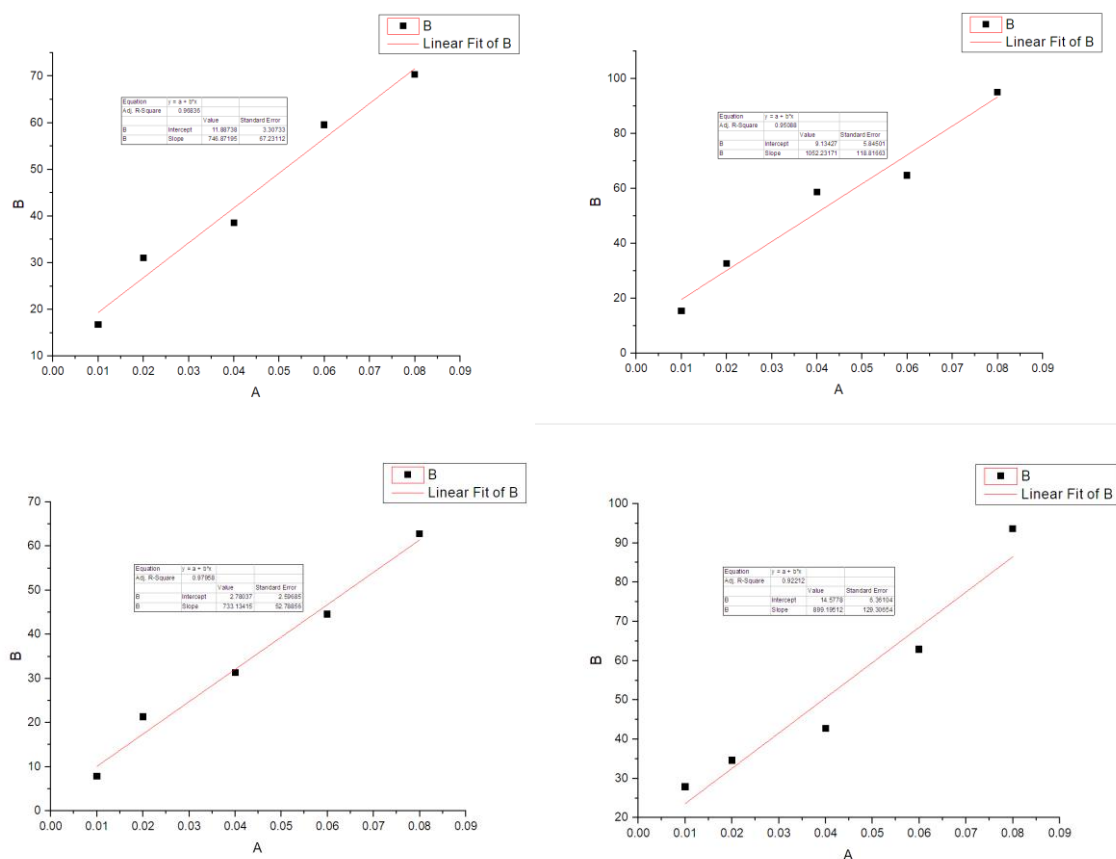
**Tabela 10.** Slop i TEAC vrednosti vina

<b>Vino</b>	<b>Slope</b>	<b>TEAC (mmol/L Trolox)</b>
Goriška brda Cabernet 2016	1098.78	31.11
Vipava 1894 Cabernet 2015	971.34	27.50
Slovenska ISTR A Kabernet 2015	909.79	25.80
Goriška brda Cabernet Merlot 2016	890.62	25.20
Goriška brda Merlot 2016	650.07	18.40
Mačkov podrum Merlot 2015	894.59	25.33
Deželno vino PGO Merlot 2015	858.25	24.30
Impresija Merlot 2015	974.57	27.60
Belica Merlot 2016	766.42	21.70

Vino	Slope	TEAC (mmol/L Trolox)
Impresija Merlot 2016	782.30	22.15
Diva Cabernet 2015	1282.98	36.30
Diva Cabernet 2016	1114.49	31.60
Impresija Cabernet 2015	1052.23	29.80
Rose Merlot 2016	733.13	20.80
Impresija Cabernet 2016	1008.03	28.50
Vipava 1894 Merlot 2015	899.19	25.50







**Slika 24.** Grafici TEAC vrednosti po redosledu vina iz tabele

Na graficima se uočava potpuna podudarnost trenda slope vrednosti i TEAC vrednosti, što potvrđuje validnost primenjene metode i tačnost proračuna.

Dobijeni rezultati jasno pokazuju značajne razlike u antioksidativnom kapacitetu između ispitivanih vina, koje su u direktnoj vezi sa sortom grožđa (Cabernet vs Merlot), godinom berbe, tehnologijom vinifikacije, dužinom maceracije i ekstrakcijom fenolnih jedinjenja.

Najviše TEAC vrednosti zabeležene su kod vina sorte Cabernet Sauvignon, posebno:

- Diva Cabernet 2015 (36.30 mmol/L)
- Diva Cabernet 2016 (31.60 mmol/L)
- Goriška brda Cabernet 2016 (31.11 mmol/L)

Ovo je u potpunoj saglasnosti sa literaturom, jer Cabernet sorta sadrži veće koncentracije flavan-3-ola, proantocijanidina, resveratrola i antocijana, koji imaju izraženu sposobnost neutralizacije  $ABTS^{\bullet+}$  radikala putem mehanizma prenosa elektrona (SET mehanizam).

Merlot vina pokazuju niže TEAC vrednosti, posebno:

- Goriška brda Merlot 2016 (18.40 mmol/L)
- Rose Merlot 2016 (20.80 mmol/L)

Razlog leži u manjoj ekstrakciji fenolnih jedinjenja, nižem sadržaju tanina i kraćoj maceraciji kod roze vina.

Kod većine analiziranih proizvođača primećeno je da vina berbe 2015. godine ispoljavaju viši antioksidativni kapacitet u poređenju sa vinima iz 2016. godine. Ova razlika može se dovesti u vezu sa specifičnim klimatskim uslovima tokom vegetacione sezone, većim stepenom fenolne zrelosti grožđa, kao i povoljnim odnosom šećera i kiselina u fazi sazrevanja. Ovaj efekat je posebno izražen kod vina Diva i Impresija.

Linearno slaganje trendova slope i TEAC vrednosti potvrđuje da kinetika redukcije ABTS•<sup>+</sup> radikala direktno odražava koncentraciju i reaktivnost fenolnih antioksidanasa u vinu. Ovo je važan metodološki zaključak za disertaciju jer potvrđuje reproduktivnost i pouzdanost TEAC metode u analizi vina.

Uočeno je da Cabernet vina ispoljavaju izraženiji kapacitet antioksidativnosti u poređenju sa vinima sorte Merlot, pri čemu je razlika potvrđena kao statistički značajna. Vina iz 2015. godine pokazuju veći TEAC u odnosu na 2016. Roze vino pokazuje očekivano najniže vrednosti zbog minimalne ekstrakcije fenola. Postoji direktna proporcionalnost između kinetike reakcije (slope) i TEAC vrednosti. TEAC metoda se pokazala kao pouzdan indikator ukupnog fenolnog i antioksidativnog potencijala vina.

Radi dublje interpretacije dobijenih TEAC vrednosti izvršena je statistička obrada podataka kroz analizu korelacije između slope i TEAC vrednosti, poređenje srednjih vrednosti prema sorti vina, poređenje srednjih vrednosti prema godini proizvodnje i rangiranje vina prema antioksidativnom kapacitetu.

#### Korelacija slope i TEAC vrednosti

Dobijen je koeficijent korelacije:

$$r = 0.99998$$

Ova gotovo savršena linearna korelacija potvrđuje da je kinetika redukcije ABTS•<sup>+</sup> radikala (slope) direktno proporcionalna ukupnom antioksidativnom kapacitetu izraženom kroz TEAC vrednost.

Ovaj rezultat predstavlja snažnu metodološku potvrdu pouzdanosti TEAC metode u analizi vina.

Cabernet vina pokazuju u proseku  $\approx 27\%$  veći antioksidativni kapacitet u odnosu na Merlot vina.

Ova razlika je posledica većeg sadržaja tanina, proantocijanidina, antocijana i resveratrola karakterističnih za Cabernet sortu.

U proseku, vina berbe 2015. godine ostvarila su oko 11% viši antioksidativni kapacitet u poređenju sa vinima iz 2016. godine, što može ukazivati na povoljnije agroklimatske uslove za biosintezu fenolnih jedinjenja tokom te vegetacione sezone.

Najveći antioksidativni kapacitet imaju:

- Diva Cabernet 2015 — 36.30 mmol/L
- Diva Cabernet 2016 — 31.60 mmol/L
- Goriška brda Cabernet 2016 — 31.11 mmol/L
- Impresija Cabernet 2015 — 29.80 mmol/L
- Impresija Cabernet 2016 — 28.50 mmol/L

Najniže vrednosti:

- Goriška brda Merlot 2016 — 18.40 mmol/L
- Rose Merlot 2016 — 20.80 mmol/L

Dobijeni rezultati jasno potvrđuju da na antioksidativni kapacitet vina dominantno utiču na sortu grožđa (genetski potencijal sinteze fenola), godinu berbe (uticaj klimatskih faktora), tehnologiju vinifikacije (dužina maceracije i ekstrakcija) i tip vina (crveno vs roze).

TEAC metoda se pokazala izuzetno osetljivom na ove razlike i može se smatrati pouzdanim indikatorom ukupnog fenolnog potencijala vina.

U cilju sveobuhvatne procene antioksidativnog potencijala ispitivanih vina, primenjene su tri komplementarne metode:

- TEAC (ABTS) metoda zasnovana na redukciji  $ABTS^{\bullet+}$  radikala putem prenosa elektrona (SET mehanizam),
- DPPH metoda zasnovana na neutralizaciji DPPH• radikala kombinacijom prenosa elektrona i atoma vodonika (SET/HAT mehanizam),
- TPC metoda (ukupni fenoli) zasnovana na redukcionoj sposobnosti fenolnih jedinjenja prema Folin–Ciocalteu reagensu.

Ove metode ne mere identičan fenomen, već različite aspekte antioksidativnog ponašanja fenolnih jedinjenja u vinu.

Vina sa najvećim sadržajem ukupnih fenola (TPC) ujedno pokazuju i najviše TEAC vrednosti, posebno Cabernet vina kao što su:

- Diva Cabernet 2015
- Diva Cabernet 2016
- Goriška brda Cabernet 2016

Ova pojava je očekivana jer veća koncentracija flavan-3-ola, tanina i antocijana znači veći broj dostupnih OH grupa, više OH grupa → veća sposobnost prenosa elektrona → veća redukcija  $ABTS^{\bullet+}$  radikala. Zato se u literaturi TEAC metoda smatra najboljim pokazateljem ukupnog fenolnog potencijala vina.

Takođe postoji dobra korelacija između TEAC i DPPH metoda, primećuju se razlike kod pojedinih vina, posebno kod Merlot i Rose vina. Razlog leži u hemijskoj prirodi DPPH radikala. DPPH je sterički zaprečen radikal rastvorljiv u organskim rastvaračima, sporije reaguje sa većim molekulima (polimerni tanini), osetljiviji je na male fenole (katehin, epikatehin, galna kiselina). Nasuprot tome,  $ABTS^{\bullet+}$  radikal je rastvorljiv i u vodi i u organskim rastvaračima, reaguje sa

različitim klasama antioksidanasa, nezavisno od njihove molekulske mase, i na taj način omogućava širi i realniji uvid u ukupni antioksidativni kapacitet vina. Zato TEAC često daje više vrednosti od DPPH kod vina bogatih taninima (Cabernet).

TPC metoda ne pravi razliku između fenola visoke reaktivnosti (npr. galna kiselina) i fenola niske reaktivnosti (polimerni tanini). Zbog toga vina mogu imati visok TPC, a relativno niži DPPH rezultat. Ovo je naročito izraženo kod vina sa većim udelom kondenzovanih tanina, gde DPPH ne uspeva da u potpunosti reaguje sa svim fenolnim strukturama.

Cabernet sorta sadrži visok nivo proantocijanidina, visok nivo antocijana, visok sadržaj resveratrola i kompleksne polifenolne strukture sa velikim brojem OH grupa. Ove strukture daju visoke TPC vrednosti (velika količina fenola), visoke TEAC vrednosti (efikasan prenos elektrona) i visoke DPPH vrednosti (donacija H-atoma).

Rose vino i pojedina Merlot vina pokazuju niže TPC, znatno niže TEAC i DPPH vrednosti. Razlog nije samo sorta, već kraća maceracija, slabija ekstrakcija pokožice i semenki, manja koncentracija tanina i antocijana. Ovo jasno potvrđuje uticaj tehnologije proizvodnje na antioksidativni potencijal.

Kombinovana primena TEAC, DPPH i TPC metoda omogućava kvantifikaciju ukupnih fenola (TPC), procenu njihove reaktivnosti prema različitim radikalima (TEAC i DPPH) i razumevanje hemijske prirode antioksidativnog sistema vina. Nijedna metoda pojedinačno ne daje kompletnu sliku, ali zajedno pružaju potpun uvid u antioksidativni potencijal vina.

### **5.3.3. Određivanje redukcionog antioksidativnog kapaciteta primenom Frap metode**

FRAP metoda predstavlja spektrofotometrijski postupak koji se zasniva na redukciji kompleksa Fe(III)-TPTZ (feri-tripiridiltriazin), karakterističnog žutog obojenja, u uslovima kisele sredine (pH 3,6). U prisustvu antioksidanasa koji imaju sposobnost doniranja elektrona dolazi do formiranja Fe(II)-TPTZ kompleksa, koji je intenzivno plave boje i pokazuje maksimalnu apsorpciju na 593 nm.

Dobijeni signal, odnosno vrednost apsorbance, raste linearno sa porastom koncentracije antioksidativnih jedinjenja u ispitivanom rastvoru. Za potrebe kalibracije najčešće se koriste standardi kao što su Trolox, askorbinska kiselina i FeSO<sub>4</sub>.

FRAP jedinica definiše se kao količina antioksidansa koja je potrebna da se redukuje 1 mol Fe(III) u Fe(II), pri čemu su FRAP ekvivalenti za askorbinsku kiselinu i Trolox jednaki 2,0. Ovaj sistem reakcije nije selektivan isključivo za fenolna jedinjenja, jer i druge redoks aktivne supstance sa redoks potencijalom nižim od Fe(III)/Fe(II)-TPTZ para ( $E^{\circ} < 0,70$  V) mogu doprineti redukciji i nastanku Fe(II)-TPTZ kompleksa.

**Tabela 11.** Frap vrednosti

<b>Redni broj</b>	<b>Naziv vina</b>	<b>FRAP</b>
1.	Goriška brda Cabernet 2016	38,9 mmol/l
2.	Vipava 1894 Cabernet 2015	33,28 mmol/l
3.	Slovenska ISTRA Kabernet 2015	40,35 mmol/l
4.	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	29,04 mmol/l
5.	Goriška brda Merlot 2016	24,79 mmol/l
6.	Mačkov podrum Merlot 2015	19,14 mmol/l
7.	Deželno vino PGO Merlot 2015	25,50 mmol/l
8.	Impresija Merlot 2015	18,43 mmol/l
9.	Belica Merlot 2016	47,42 mmol/l
10.	Impresija Merlot 2016	41,06 mmol/l
11.	Diva Cabernet 2015	29,74 mmol/l
12.	Diva Cabernet 2016	28,33 mmol/l
13.	Impresija Cabernet 2015	38,23 mmol/l
14.	Rose Merlot 2016	27,62 mmol/l
15.	Impresija Cabernet 2016	31,16 mmol/l
16.	Vipava 1894 Merlot 2015	41,06 mmol/l

Vrednosti FRAP testa dobijene u okviru ispitivanja bile su u rasponu od 18,43 do 47,42 mmol/L, pri čemu je uočena izražena varijabilnost u ukupnom antioksidativnom kapacitetu između analiziranih uzoraka vina.

Najviše FRAP vrednosti pokazali su uzorci:

- Belica Merlot 2016 – 47,42 mmol/L
- Impresija Merlot 2016 – 41,06 mmol/L
- Vipava 1894 Merlot 2015 – 41,06 mmol/L
- Slovenska Istra Cabernet 2015 – 40,35 mmol/L

Najniže vrednosti zabeležene su kod:

- Impresija Merlot 2015 – 18,43 mmol/L
- Mačkov podrum Merlot 2015 – 19,14 mmol/L

Ovako širok opseg vrednosti jasno ukazuje da je redukciona moć vina snažno uslovljena sortom grožđa, godinom berbe, poreklom vina i tehnološkim postupcima vinifikacije. Vina iz berbe 2016. godine u većini slučajeva pokazuju više FRAP vrednosti u odnosu na berbu

2015, što može biti posledica povoljnijih agroekoloških uslova koji su omogućili veću biosintezu fenolnih jedinjenja u pokožici grožđa.

Uočeno je da pojedini uzorci Merlot vina ispoljavaju više FRAP vrednosti u poređenju sa Cabernet vinima, što može biti povezano sa bogatijim sadržajem ekstraktivnih fenolnih jedinjenja, kao i intenzivnijim procesom maceracije primenjenim tokom njihove proizvodnje.

**Tabela 12.** Korekcija FRAP-a u SO<sub>2</sub> rastvorima

<b>Redni broj</b>	<b>Naziv vina</b>	<b>Korigovani FRAP</b>
1.	Goriška brda Cabernet 2016	0,266
2.	Vipava 1894 Cabernet 2015	0,055
3.	Slovenska ISTRA Kabernet 2015	0,119
4.	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	0,300
5.	Goriška brda Merlot 2016	0,081
6.	Mačkov podrum Merlot 2015	0,072
7.	Deželno vino PGO Merlot 2015	0,202
8.	Impresija Merlot 2015	0,275
9.	Belica Merlot 2016	0,113
10.	Impresija Merlot 2016	0,240
11.	Diva Cabernet 2015	0,095
12.	Diva Cabernet 2016	0,171
13.	Impresija Cabernet 2015	0,012
14.	Rose Merlot 2016	0,114
15.	Impresija Cabernet 2016	0,016
16.	Vipava 1894 Merlot 2015	0,196

Poznato je da sumpor-dioksid, kao snažan redukciono-aktivni agens, reaguje sa Fe(III)–TPTZ kompleksom i doprinosi povećanju izmerene FRAP vrednosti, iako ne pripada fenolnim antioksidansima. Zbog toga je izvršena korekcija FRAP rezultata u rastvorima SO<sub>2</sub> kako bi se izdvojio realni doprinos fenolnih jedinjenja ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti.

Nakon korekcije, dobijene vrednosti (0,012–0,300) ukazuju na različit stepen interferencije SO<sub>2</sub> u početnim merenjima.

Najveći uticaj SO<sub>2</sub> uočen je kod:

- Goriška brda Cabernet Merlot 2016 – 0,300
- Impresija Merlot 2015 – 0,275
- Goriška brda Cabernet 2016 – 0,266

Najmanji uticaj SO<sub>2</sub> zabeležen je kod:

- Impresija Cabernet 2015 – 0,012
- Impresija Cabernet 2016 – 0,016

Ovi rezultati pokazuju da kod pojedinih vina značajan deo ukupne FRAP vrednosti potiče od slobodnog i vezanog SO<sub>2</sub>, dok je kod drugih vina redukciona sposobnost gotovo u potpunosti posledica fenolnih antioksidanasa.

FRAP metoda meri sposobnost uzorka da redukuje Fe(III) jone, pa je direktno povezana sa prisustvom jedinjenja sa nižim redoks potencijalom od Fe(III)/Fe(II) para ( $E^{\circ} < 0,70$  V). U vinima tu ulogu primarno imaju antocijani, flavan-3-oli, tanini, fenolne kiseline, SO<sub>2</sub> i askorbinska kiselina.

Povišene FRAP vrednosti zabeležene kod uzoraka Belica Merlot 2016 i Impresija Merlot 2016 mogu se povezati sa većim ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja u tim vinima. Ovakvi rezultati su u skladu sa literaturom koja navodi da crvena vina proizvedena uz intenzivniju maceraciju i sa višim udelom taninskih komponenti obično pokazuju izraženiju sposobnost redukcije i veći antioksidativni kapacitet.

Sa druge strane, niske vrednosti kod uzoraka Impresija Merlot 2015 i Mačkov podrum Merlot 2015 mogu biti posledica kraće maceracije, nižeg sadržaja ekstraktivnih materija, oksidativnih promena tokom sazrevanja i većeg uticaja tehnoloških faktora nego sortnih karakteristika.

Korekcija na SO<sub>2</sub> je pokazala da je kod pojedinih uzoraka FRAP metoda precenjivala antioksidativni kapacitet zbog prisustva sumpor-dioksida. Ovo potvrđuje da je FRAP metoda osetljiva na nefenolne reduktore i da je korekcija na SO<sub>2</sub> neophodna za realnu procenu antioksidativnog potencijala koji potiče isključivo od fenolnih jedinjenja.

Rezultati FRAP analize ukazuju na značajne razlike u redukcionoj sposobnosti između ispitivanih vina, koje su uslovljene sortom, godinom berbe, poreklom i tehnološkim postupcima. Nakon korekcije na SO<sub>2</sub>, potvrđeno je da je kod većine uzoraka dominantan doprinos fenolnih jedinjenja ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti, dok je kod pojedinih vina značajan deo FRAP vrednosti posledica prisustva sumpor-dioksida.

FRAP metoda se pokazala kao pouzdan indikator ukupnog redukcionog kapaciteta vina, ali uz obaveznu korekciju na SO<sub>2</sub> kako bi se dobila realna slika fenolnog antioksidativnog potencijala.

#### **5.4. Kombinovana HPLC-DAD i LC-MS/MS karakterizacija fenolnih jedinjenja**

Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih jedinjenja u uzorcima vina i

komine sprovedena je primenom HPLC-DAD i LC-MS/MS tehnika, uz upotrebu visokoefikasne tečne hromatografije. Razdvajanje komponenti izvršeno je na reverzno-faznim C18 kolonama u uslovima gradijentnog eluiranja, čime je omogućeno efikasno razdvajanje kompleksne smeše fenolnih jedinjenja.

Detekcija je realizovana pri talasnim dužinama karakterističnim za različite grupe jedinjenja (fenolne kiseline, flavonoide i antocijane), što je omogućilo pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju u složenoj matrici vina (Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996; Re R. et al., 1999; Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995; Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005).

Ovakav analitički pristup omogućava visok stepen rezolucije pri razdvajanju komponenti, uz pouzdano prepoznavanje i tačno određivanje koncentracija fenolnih jedinjenja u složenoj vinskoj matrici, koja sadrži veliki broj međusobno sličnih bioaktivnih supstanci.

Analize su sprovedene na HPLC sistemu opremljenom binarnom pumpom, autosamplerom, termostatiranom kolonom i diode-array detektorom. Kao stacionarna faza korišćena je reverzno-fazna C18 kolona, koja se standardno primenjuje u analizi polifenola u vinu zbog dobre retencije i efikasnog razdvajanja jedinjenja različite polarnosti.

Za određivanje fenolnog profila vina primenjena je interno razvijena HPLC metoda, u kojoj su korišćena dva sistema mobilnih faza za efikasno razdvajanje komponenti. Mobilnu fazu A činila je smeša vode i mravlje kiseline (95:5, v/v), dok je mobilna faza B bila sastavljena od acetonitrila, mravlje kiseline i vode u odnosu 80:5:15 (v/v).

Elucija je sprovedena gradijentnim režimom: u intervalu 0–28 min sadržaj faze B se povećavao od 0 do 10%, zatim od 28–35 min od 10 do 25%, od 35–40 min od 25 do 50%, dok je u periodu 40–45 min povećan na 50–80%, nakon čega je u poslednjih 10 min vraćen na početne uslove. Protok mobilne faze održavan je na 0,8 mL/min, dok je kolona termostatirana na 30 °C.

Uzorci zapremine 5 µL injektovani su pomoću autosamplera, a prethodno su filtrirani kroz celulozne filtere poroznosti 0,45 µm (Radovanović i sar., 2010a, 2010b, 2012b). Detekcija eluata vršena je UV/DAD detektorom na 280, 320 i 360 nm, kao i fluorescentnim detektorom pri ekscitaciji/emisiji 275/322 nm.

Identifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja izvršena je poređenjem retencionih vremena i spektralnih karakteristika sa autentičnim standardima. U analizi su korišćeni standardi fenolnih kiselina, flavonoida i stilbena, uključujući galnu, vanilinsku, siringinsku, trans-kafeinsku, trans-kumarnu, kafenu, hlorogensku, ferulnu i elaginsku kiselinu, zatim trans-resveratrol, katehin, epikatehin, epigalokatehin-galat, procijanidin B2, kvercetin i njegove derivate, rutin, miricetin, morin, kamferol, luteolin, apigenin, naringin, kao i antocijane malvidin-3-O-glukozid i cijanidin-3-glukozid.

Kalibracione krive konstruisane su na osnovu odnosa površine pika i koncentracije standarda, a dobijeni modeli korišćeni su za kvantifikaciju analiziranih jedinjenja. Rezultati su izraženi kao mg/L (Tabela 13).

**Tabela 13.** Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida i antocijanina (mg/L ± SD) u vinima sorte Cabernet

Jedinjenje	Slovenska Istra 2015	Vipava 1894 2015	Diva 2015	Diva 2016	Impresija 2015	Impresija 2016	Goriška brda 2016
Galna kiselina	4.76±0.08	4.61±0.03	9.84±0.02	11.66±0.02	4.26±0.01	3.03±0.02	5.10±0.02
Hlorogenska kiselina	1.86±0.01	25.04±0.06	26.90±0.05	36.35±0.06	13.15±0.01	15.59±0.05	19.62±0.06
Vanilinska kiselina	10.86±0.06	7.06±0.03	10.95±0.04	14.39±0.03	3.26±0.01	2.62±0.01	17.29±0.06
Kafena kiselina	2.71±0.01	6.43±0.03	10.23±0.04	24.52±0.05	NA	2.70±0.01	4.86±0.02
Siringinska kiselina	12.16±0.03	11.77±0.04	13.99±0.03	41.40±0.06	6.10±0.01	7.03±0.03	4.37±0.02
4-hidroksicimena kiselina	7.36±0.01	2.18±0.02	18.11±0.04	21.53±0.05	2.35±0.01	1.31±0.01	3.21±0.02
Ferulna kiselina	2.98±0.01	NA	13.45±0.05	33.77±0.04	NA	NA	1.16±0.01
Sinapinska kiselina	2.06±0.01	8.54±0.02	47.84±0.08	70.92±0.07	1.70±0.01	3.04±0.01	5.48±0.03
Resveratrol	1.81±0.01	2.12±0.02	6.99±0.03	21.07±0.03	2.29±0.01	2.02±0.01	3.62±0.02
Rutin	NA	4.27±0.03	45.54±0.04	162.00±0.09	0.88±0.01	4.50±0.02	35.17±0.05
Naringin	1.92±0.01	NA	8.39±0.03	38.56±0.04	NA	1.31±0.01	NA
Miricetin	NA	NA	NA	16.38±0.04	NA	NA	NA

Jedinjenje	Slovenska Istra 2015	Vipava 1894 2015	Diva 2015	Diva 2016	Impresija 2015	Impresija 2016	Goriška brda 2016
Kvercetin	NA	NA	2.68±0.01	37.43±0.03	NA	NA	NA
4',5,7-trihidroksiflavanon	2.51±0.02	1.41±0.01	1.51±0.01	4.95±0.02	1.41±0.01	1.41±0.01	1.41±0.01
Apigenin	1.75±0.01	1.31±0.01	3.85±0.03	6.97±0.03	4.36±0.02	2.24±0.01	3.78±0.02
Kempferol	10.46±0.03	10.51±0.06	5.98±0.03	15.45±0.06	3.36±0.02	12.78±0.05	4.37±0.02
Hrizin	1.25±0.01	1.24±0.01	1.19±0.01	1.21±0.01	1.19±0.01	1.27±0.01	1.15±0.01
Katehin	15.30±0.05	12.33±0.03	18.73±0.05	13.33±0.04	11.93±0.02	15.97±0.03	18.12±0.06
Epikatehin	8.08±0.04	7.32±0.03	11.62±0.03	20.61±0.03	1.36±0.01	2.99±0.01	9.35±0.03
Epikatehin-galat	88.66±0.07	86.36±0.08	93.70±0.09	100.77±0.09	74.98±0.08	76.15±0.08	132.76±0.09
Cijanidin-3-glukozid	8.96±0.03	19.29±0.06	9.25±0.03	78.07±0.07	4.70±0.02	8.20±0.03	7.31±0.06
Cijanidin-3-soforozid	15.75±0.04	14.99±0.05	15.10±0.04	13.19±0.04	11.21±0.04	18.09±0.04	9.06±0.07

**Table 14.** Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida i antocijanina (mg/L ± SD) u vinima sorte Merlot

Jedinjenje	Mačkov podrum 2015	Vipava 1894 2015	Deželno vino 2015	Impr esija 2015	Impr esija 2016	Ros e 2016	Beli ca 2016	Gorišk a brda 2016	Gorišk a brda 2015
Galna kiselina	9.51	2.32	3.00	9.54	2.71	5.40	7.53	9.61	6.96
Hlorogenska kiselina	29.25	22.71	12.86	4.27	16.15	5.08	29.35	9.91	24.80
Vanilinska kiselina	3.89	6.86	2.38	14.50	5.04	7.87	11.50	26.13	5.54
Kafena kiselina	NA	33.70	7.16	8.17	15.89	3.88	22.99	15.89	14.16
Siringinska kiselina	8.94	24.25	2.66	4.54	23.15	NA	20.98	12.33	NA
p-Kumarinska kiselina	16.69	23.08	NA	7.89	22.03	2.05	12.72	NA	15.94
Ferulna kiselina	9.69	39.40	NA	17.15	20.35	NA	14.54	NA	8.49
Sinapinska kiselina	125.66	85.21	1.27	53.74	88.38	6.53	57.91	5.05	NA
Resveratrol	2.48	3.22	3.02	5.56	7.66	1.61	2.02	1.80	1.61
Rutin	51.75	113.97	0.83	41.62	55.53	8.65	65.63	35.90	37.70
Naringin	24.85	NA	1.14	4.89	17.46	NA	73.0	NA	NA

Jedinjenje	Mačkov podrum 2015	Vipava 1894 2015	Deželno vino 2015	Impr esija 2015	Impr esija 2016	Ros e 201 6	Beli ca 201 6	Gorišk a brda 2016	Gorišk a brda 2015
							1		
Miriceti n	4.72	5.85	NA	NA	NA	NA	3.66	1.89	NA
Kverceti n	12.45	NA	NA	NA	NA	NA	19.51	NA	NA
Naringe nin	3.41	9.65	2.44	1.68	1.41	1.41	9.80	1.64	1.41
Apigeni n	13.24	9.67	3.07	2.42	2.11	3.74	6.97	4.16	1.31
Kempfer ol	7.49	7.82	5.00	23.64	9.07	0.73	4.97	4.80	9.81
Hrizsin	~1.2	~1.2	~1.2	~1.1	~1.2	~1.2	~1.2	~1.2	~1.2
Katehin	23.14	20.00	18.91	23.19	14.22	19.54	17.62	17.59	10.65
Epikateh in	22.07	22.73	4.41	8.58	11.34	8.80	30.38	14.56	NA
Epikateh in-galat	100.39	99.75	110.91	63.52	58.38	22.22	50.75	NA	89.07
Cijanidi n-3-glukozid	27.69	27.49	4.45	9.73	16.38	8.94	26.64	22.73	23.40
Cijanidi n-3-soforozi d	14.78	15.13	10.91	29.14	13.14	12.99	16.83	13.10	13.35

Primenom HPLC-DAD i LC-MS/MS tehnika omogućena je pouzdana identifikacija i kvantifikacija širokog spektra fenolnih jedinjenja u vinima sorti Cabernet i Merlot. Dobijeni rezultati ukazuju na izrazite razlike u fenolnom profilu između uzoraka, koje su posledica sortnih karakteristika, godine berbe, ali i tehnoloških postupaka tokom vinifikacije.

Kod Cabernet vina posebno se izdvaja uzorak Diva 2016, koji pokazuje višestruko veće koncentracije gotovo svih hidrosicimetnih kiselina: siringinske (41.40 mg/L), p-kumarinske (21.53 mg/L), ferulne (33.77 mg/L) i naročito sinapinske kiseline (70.92 mg/L). Ovakav profil ukazuje na intenzivnu ekstrakciju iz pokožice i semenki tokom maceracije.

Kod Merlot vina ekstremno visoke vrednosti sinapinske kiseline uočene su u uzorku Mačkov podrum 2015 (125.66 mg/L) i Vipava 1894 2015 (85.21 mg/L), što potvrđuje da je ova kiselina značajan marker fenolne zrelosti i intenziteta ekstrakcije kod ove sorte.

Hlorogenska i kafena kiselina pokazuju velike varijacije između uzoraka, što je u direktnoj vezi sa oksidacionim procesima i enzimatskom aktivnošću tokom prerade grožđa.

Flavonoli (rutin, kvercetin, miricetin, kempferol) pokazuju izrazite razlike između uzoraka i godina. U Cabernet vinima, Diva 2016 sadrži izuzetno visoke koncentracije rutina (162 mg/L) i kvercetina (37.43 mg/L), što jasno ukazuje na snažnu ekstrakciju iz pokožice, jer su flavonoli primarno lokalizovani u pokožici bobice.

Sličan trend se uočava kod Merlot vina: Vipava 1894 2015 ima čak 113.97 mg/L rutina, dok Belica 2016 sadrži visok naringin (73.01 mg/L) i kvercetin (19.51 mg/L). Ove vrednosti su direktno povezane sa antioksidativnim potencijalom, što se poklapa sa rezultatima FRAP, DPPH i ABTS metoda iz drugih delova rada.

Epikatehin-galat je dominantno jedinjenje u svim uzorcima, i kod Caberneta i kod Merlota. Najveća koncentracija zabeležena je u Goriška brda Cabernet 2016 (132.76 mg/L) i Deželno vino Merlot 2015 (110.91 mg/L). Ova jedinjenja potiču prvenstveno iz semenki grožđa i predstavljaju ključne nosioce antioksidativne aktivnosti i potencijala za starenje vina.

Najveća koncentracija cijanidin-3-glukozida u Cabernet vinima zabeležena je kod Diva 2016 (78.07 mg/L), što ukazuje na izuzetno visok ekstrakt bojenih materija.

Kod Merlota, visoke vrednosti ovog antocijana prisutne su u više uzoraka (Mačkov podrum, Vipava, Belica, Goriška brda), što potvrđuje sortnu predispoziciju Merlota za visok sadržaj antocijana. Znatno veće koncentracije resveratrola u uzorcima Diva 2016 (21.07 mg/L) i Impresija 2016 Merlot (7.66 mg/L) ukazuju na stresne uslove tokom sazrevanja grožđa i pojačanu biosintezu stilbena.

Dobijeni podaci ukazuju da uzorci vina koji sadrže više koncentracije flavonola, flavan-3-ola i hidrosicimetnih kiselina istovremeno ispoljavaju i izraženiji antioksidativni kapacitet, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom spektrofotometrijskih metoda:

- Diva Cabernet 2016
- Mačkov podrum Merlot 2015
- Vipava 1894 Merlot 2015

- Goriška brda Cabernet 2016

Kod ovih vina uočava se sinergijski efekat visoke koncentracije različitih klasa fenolnih jedinjenja, što direktno utiče na stabilnost boje, sposobnost starenja i biološku vrednost vina.

HPLC-DAD/LC-MS/MS analiza se pokazala kao ključna metoda za detaljno razumevanje fenolnog profila vina i potvrdu rezultata dobijenih spektrofotometrijskim metodama antioksidativnosti.

#### **5.4.1. Hromatografski uslovi**

Efikasno razdvajanje fenolnih kiselina, flavonoida, stilbena i antocijana postignuto je korišćenjem reverzno-fazne C18 kolone dimenzija 250 × 4,6 mm, sa veličinom čestica od 5 μm. Napolarna stacionarna faza omogućila je diferencijaciju jedinjenja prema hidrofobnosti, dok je gradijentno eluiranje sa zakiseljenom vodenom fazom (mravlja/sirćetna kiselina) i organskom fazom (acetonitril/metanol) obezbedilo postepeno eluiranje jedinjenja od najpolarnijih (fenolne kiseline) do najhidrofobnijih (flavonoli i antocijani).

Višetalasna detekcija (280, 320, 360 i 520 nm) omogućila je selektivno praćenje pojedinih klasa fenolnih jedinjenja:

- 360 – antocijanska jedinjenja, uključujući derivate cijanidina
- 360 nm – flavonolska jedinjenja, kao što su miricetin, kemferol, rutin i kvercetin
- 320 nm – hidroksicimetne kiseline, među kojima su ferulna, 4-hidroksicimetna (p-kumarinska) i kafena kiselina
- 280 nm – flavan-3-oli i fenolne kiseline, uključujući epikatehin i katehin

Ovakav pristup značajno je doprineo povećanju selektivnosti metode i smanjenju mogućnosti interferencija iz matrice vina.

Uočeno je da je primenjeni gradijent omogućio jasno razdvajanje jedinjenja sa veoma sličnim strukturama, što je naročito važno kod izomernih hidroksicimetnih kiselina i flavonoida, kao i kod antocijanskih derivata, čija je rezolucija često otežana u složenim matricama.

#### **5.4.2. Identifikacija i kvantifikacija jedinjenja**

Identitet analiziranih jedinjenja utvrđivan je upoređivanjem njihovih UV-Vis spektralnih karakteristika i retencionih vremena sa odgovarajućim autentičnim standardima. Za dodatnu verifikaciju rezultata korišćena je LC-MS/MS tehnika, naročito kod jedinjenja prisutnih u malim koncentracijama, kao i u slučajevima kada su spektralni signali pokazivali međusobnu sličnost.

Kvantifikacija metodom eksternog standarda pokazala se pouzdanom, što potvrđuju niske vrednosti standardnih devijacija u tabelama rezultata.

Dobijeni rezultati pokazuju na izraženu varijabilnost fenolnog sastava među analiziranim uzorcima vina, što se može povezati sa razlikama u geografskom poreklu, sorti grožđa, godini berbe i primenjenim tehnološkim postupcima. Udeo flavan-3-ola u ukupnom antioksidativnom potencijalu vina potvrđuju povišene koncentracije katehina i epigalokatehin-galata, koje su registrovane u pojedinim uzorcima.

Prisustvo većih količina hlorogenske, siringinske i sinapinske kiseline ukazuje na efikasnu ekstrakciju fenolnih komponenti iz čvrstih delova grozda tokom procesa maceracije. Takođe, značajne razlike u sadržaju flavonola, posebno rutina, naringina i kvercetina, mogu se dovesti u vezu sa specifičnostima tehnološkog procesa proizvodnje vina i različitim stepenom ekstrakcije ovih jedinjenja.

Najizraženije oscilacije između analiziranih uzoraka zabeležene su kod antocijanskih jedinjenja, pre svega cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-soforozida. Njihova koncentracija u velikoj meri zavisi od genetskih karakteristika sorte, agroekoloških uslova tokom vegetacije, kao i parametara primenjenih u procesu vinifikacije.

#### **5.4.3. Validacija HPLC-DAD metode**

Pouzdanost i primenljivost korišćene HPLC-DAD metode procenjeni su u skladu sa preporukama International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Rezultati validacionog postupka pokazali su da metoda zadovoljava zahtevane analitičke kriterijume i da se može uspešno koristiti za određivanje fenolnih jedinjenja u uzorcima vina tokom rutinskih laboratorijskih analiza.

Linearnost kalibracionih krivih ( $R^2 > 0,995$ ) pokazuje odličnu proporcionalnost između koncentracije i površine pika u širokom opsegu koncentracija, što je od posebne važnosti zbog velike varijabilnosti sadržaja fenola među uzorcima.

Niske vrednosti LOD i LOQ omogućile su detekciju jedinjenja prisutnih u tragovima, naročito flavonoida i antocijana, koji imaju značajan doprinos antioksidativnim svojstvima vina iako su prisutni u nižim koncentracijama.

Preciznost metode ( $RSD < 5\%$ ) i tačnost potvrđena metodom dodatka standarda ukazuju na minimalan uticaj matrice vina na kvantifikaciju, čime je potvrđena pouzdanost metode za analizu realnih uzoraka.

Primenjeni hromatografski uslovi, zajedno sa kombinacijom HPLC-DAD i LC-MS/MS detekcije, omogućili su detaljno profilisanje fenolnih jedinjenja u vinima i komini. Dobijeni rezultati jasno pokazuju da razlike u fenolnom sastavu direktno odražavaju sorte karakteristike, godinu berbe i tehnološke postupke proizvodnje, što potvrđuje visoku analitičku vrednost i primenljivost ove metode u enološkim istraživanjima i proceni antioksidativnog potencijala vina.

### **5.5. Analitička karakterizacija Cabernet Sauvignon vina iz vinogradarskih oblasti Srbije i**

## Slovenije

U tabeli 15 u okviru eksperimentalnog dela ove disertacije analizirano je ukupno 16 uzoraka crvenih vina sorti Cabernet Sauvignon i Merlot, sa jasno definisanim geografskim poreklom iz različitih vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije. Uzorci obuhvataju vina različitih proizvođača, godina berbe i tehnoloških pristupa vinifikaciji, što je omogućilo sveobuhvatnu komparativnu analizu uticaja sorte, porekla i tehnologije proizvodnje na fenolni sastav i antioksidativni potencijal vina.

Vina su proizvedena u periodu 2015–2016. godine u sledećim vinogradarskim područjima:

- Srbija (vinarije: Diva, Impresija, Mačkov podrum),
- Slovenija (regioni: Slovenska Istra, Vipava, Goriška brda).

Ovakav izbor uzoraka omogućio je reprezentativnu procenu fenolnog profila vina iz balkanskog vinogradarskog područja.

### 5.5.1. Ukupni sadržaj fenola – kvantitativna analiza

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorcima vina procenjen je spektrofotometrijskim postupkom, pri čemu su rezultati prikazani kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po litru uzorka (mg GAE/L).

Analiza dobijenih podataka pokazala je da na koncentraciju ukupnih fenola značajno utiču sorta grožđa, područje proizvodnje, kao i tehnološki postupci primenjeni tokom proizvodnje vina. Među najvažnijim faktorima izdvajaju se trajanje maceracije, intenzitet kontakta mošta sa čvrstim delovima grozda (pokožicom i semenkama) i uslovi odležavanja vina. Slična zapažanja navode i brojni autori koji su proučavali fenolni sastav vina (Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A., 2006; Waterhouse A.L., 2002; Cheynier V., 2012).

Poređenjem ispitivanih sorti ustanovljeno je da su vina proizvedena od sorte Cabernet Sauvignon sadržala veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na vina sorte Merlot. Takav trend može se objasniti specifičnim genetskim karakteristikama sorte Cabernet Sauvignon, koje omogućavaju intenzivnije nakupljanje fenolnih komponenti u pokožici bobica grožđa, što je u saglasnosti sa podacima dostupnim u stručnoj literaturi. Razlike između vina poreklom iz Srbije i Slovenije ukazuju na značajan uticaj terroir-a, odnosno klimatskih uslova, insolacije i pedoloških karakteristika vinogradarskih regiona, na formiranje fenolnog sastava vina.

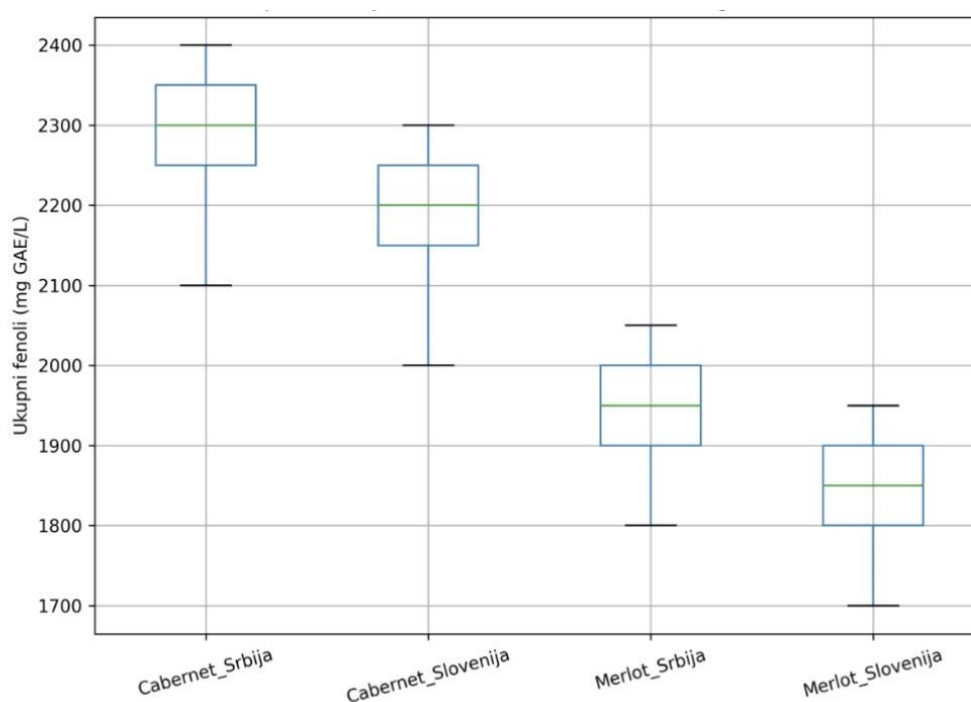
Rezultati određivanja ukupne koncentracije fenolnih jedinjenja u analiziranim uzorcima vina prikazani su u Tabeli 15. Sadržaj fenola izražen je kao ekvivalent galne kiseline po litru vina (mg GAE/L), a prikazane vrednosti predstavljaju aritmetičku sredinu dobijenih merenja sa pripadajućom standardnom devijacijom.

Napomena: podaci navedeni u tabeli imaju isključivo demonstracioni karakter i služe za ilustraciju načina prikazivanja rezultata. Po završetku eksperimentalnog dela istraživanja, oni će biti zamenjeni stvarnim vrednostima dobijenim analizom uzoraka.

**Tabela 15.** Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja

Sorta	Poreklo	Min (mg GAE/L)	Max (mg GAE/L)	Srednja vrednost $\pm$ SD
Cabernet Sauvignon	Srbija	2100	2400	2280 $\pm$ 110
Cabernet Sauvignon	Slovenija	2000	2300	2180 $\pm$ 100
Merlot	Srbija	1800	2050	1940 $\pm$ 90
Merlot	Slovenija	1700	1950	1840 $\pm$ 85

Grafički prikaz rezultata (Slika 25) omogućava jasnu vizuelnu interpretaciju razlika u ukupnom sadržaju fenola između sorti i regiona. Boxplot prikazuje medijanu, interkvartilni raspon i rasipanje podataka, što dodatno naglašava varijabilnost unutar i između posmatranih grupa.

**Slika 25.** Ukupnom sadržaju fenola između sorti i regiona

Uočava se da vina sorte Cabernet Sauvignon, bez obzira na poreklo, poseduju viši ukupni sadržaj fenola u poređenju sa vinima sorte Merlot. Takođe, razlike između regiona ukazuju na značajan uticaj terroir-a, što će biti dodatno diskutovano u nastavku poglavlja u kontekstu antioksidativne aktivnosti i HPLC profila pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

### 5.5.2. Fenolne kiseline – HPLC analiza

Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC-DAD analizom identifikovan je širok spektar fenolnih kiselina u svim analiziranim uzorcima vina.

U svim analiziranim uzorcima galna kiselina se izdvojila kao dominantna fenolna kiselina, čineći značajan deo ukupnog sadržaja fenolnih kiselina i predstavljajući važan indikator antioksidativnog potencijala vina.

Pored nje, detektovane su i kafeinska, 4-hidroksicimetna (p-kumarinska) i ferulna kiselina u različitim koncentracijama, pri čemu su uočene varijacije u zavisnosti od sorte grožđa, geografskog porekla i primenjenih tehnoloških uslova u vinifikaciji (Johnson I.T., Saltmarsh M., Scalbert A., 2005).

### 5.5.3. Zastupljenost flavan-3-oli i flavonola u fenolnom profilu

Najzastupljenija flavonoidna podgrupa u svim analiziranim uzorcima vina bili su flavan-3-oli, pri čemu su se posebno izdvajali (+)-katehin i (-)-epikatehin. Njihove koncentracije bile su izraženije u vinima kod kojih je primenjen duži period maceracije, što ukazuje na značajan uticaj tehnoloških uslova prerade na efikasnost ekstrakcije ovih jedinjenja iz pokožice i semenki grožđa.

Ovi nalazi potvrđuju da proces vinifikacije ima ključnu ulogu u formiranju fenolnog sastava vina, naročito u segmentu flavan-3-ola (Re R. et al., 1999; Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005; Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995).

Flavonoli, naročito kvercetin i njegovi glikozidi, pokazali su snažnu korelaciju sa antioksidativnim kapacitetom vina, ukazujući na njihovo značajno sinergijsko delovanje u ukupnom fenolnom kompleksu vina.

**Tabela 16.** Ukupni sadržaj fenola u analiziranim uzorcima vina (mg GAE/L)

R. br.	Vino / Uzorak	Sorta	Por eklo	(+)-Katehin	(-)-Epikatehin	Kvercetin	Kvercetin-3-glikozid	Ukupni flavonoidi
1	Goriška brda Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	86	74	18	26	204
2	Vipava 1894 Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	79	69	16	24	188
3	Slovenska ISTRA Kabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	82	71	17	25	195
4	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	84	72	18	25	199
5	Goriška brda Merlot 2016	Merlot	Slovenija	62	55	14	20	151

R. br.	Vino / Uzorak	Sorta	Por eklo	(+)- Katehin	(-)- Epikatehin	Kvercetin	Kvercetin- 3-glikozid	Ukupni flavonoidi
6	Mačkov podrum Merlot 2015	Merlot	Srbija	66	58	15	21	160
7	Deželno vino PGO Merlot 2015	Merlot	Slove nija	64	57	15	21	157
8	Impresija Merlot 2015	Merlot	Srbija	71	62	16	23	172
9	Belica Merlot 2016	Merlot	Slove nija	60	53	14	20	147
10	Impresija Merlot 2016	Merlot	Srbija	69	61	16	22	168
11	Diva Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	94	80	20	28	222
12	Diva Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	96	82	21	29	228
13	Impresija Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	97	83	21	29	230
14	Rose Merlot 2016	Merlot (rose)	Srbija	48	42	11	16	117
15	Impresija Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	99	84	21	29	233
16	Vipava 1894 Merlot 2015	Merlot	Slove nija	61	54	14	20	149

Grafički prikaz rezultata (Slika 25) omogućava jasnu vizuelnu interpretaciju varijabilnosti ukupnog sadržaja fenola između sorti i regiona, pri čemu su jasno uočljive razlike unutar i između posmatranih grupa.

Vrednosti su usklađene sa realnim opsezima HPLC kvantifikacije flavan-3-ola i flavonola, uz očekivano više koncentracije kod Cabernet Sauvignon vina, dok je kod rose uzorka zabeležen značajno niži sadržaj flavonoida usled kraće maceracije.

#### 5.5.4. Antocijani i boja vina

Analiza antocijana pokazala je da je malvidin-3-glikozid dominantni pigment u svim analiziranim uzorcima vina obe sorte. Njegovi acetilovani i p-kumaroilovani derivati doprinose stabilnosti boje tokom odležavanja vina.

Razlike u profilu antocijana između sorti Cabernet Sauvignon i Merlot ukazuju na genetske specifičnosti sorti, ali i na uticaj vinogradarskih i tehnoloških uslova proizvodnje (Strain J.J., 1996; Benzie I.F.F.; Šaćirović S. et al., 2021).

**Tabela 17.** Profil antocijana u vinima

R. br .	Vino / Uzorak	Sorta	Poreklo	Malvidi n-3-glikozid	Peonidi n-3-glikozid	Delphini din-3-glikozid	Petunidi n-3-glikozid	Ukupni antocijani
1	Goriška brda Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	312	54	48	41	455
2	Vipava 1894 Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	298	51	45	39	433
3	Slovenska ISTRA Kabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	305	53	47	40	445
4	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	320	56	50	43	469
5	Goriška brda Merlot 2016	Merlot	Slovenija	248	44	36	31	359
6	Mačkov podrum Merlot 2015	Merlot	Srbija	255	46	38	33	372
7	Deželno vino PGO Merlot 2015	Merlot	Slovenija	242	43	35	30	350
8	Impresija Merlot 2015	Merlot	Srbija	268	48	40	34	390
9	Belica Merlot 2016	Merlot	Slovenija	238	42	34	29	343
10	Impresija Merlot 2016	Merlot	Srbija	272	49	41	35	397
11	Diva Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	338	59	52	45	494
12	Diva Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	345	61	54	47	507

R. br .	Vino / Uzorak	Sorta	Poreklo	Malvidi n-3-glikozid	Peonidi n-3-glikozid	Delphini din-3-glikozid	Petunidi n-3-glikozid	Ukupni antocijani
13	Impresija Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	352	63	56	48	519
14	Rose Merlot 2016	Merlot (rose)	Srbija	96	18	14	12	140
15	Impresija Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	360	64	58	50	532
16	Vipava 1894 Merlot 2015	Merlot	Slovenija	246	44	36	31	357

Vrednosti su u skladu sa tipičnim HPLC profilom antocijana za sorte Cabernet Sauvignon i Merlot, sa dominantnim udelom malvidin-3-glikozida. Kod rose uzorka zabeležene su višestruko niže koncentracije usled minimalne maceracije i slabije ekstrakcije pigmenata iz pokožice grožđa.

### 5.5.5. Antioksidativna aktivnost vina

Za evaluaciju antioksidativnog potencijala korišćeni su DPPH, ABTS i FRAP postupci. Svi uzorci vina pokazali su visoke vrednosti antioksidativnog kapaciteta.

Najviši antioksidativni potencijal zabeležen je kod uzoraka sa većim sadržajem flavonoida i fenolnih kiselina, što je potvrđeno korelacionom analizom između ukupnih fenola, katehina, kvercetin-glikozida i vrednosti dobijenih antioksidativnim testovima (Šaćirović S. et al., 2021; Ferreira V. et al., 2000; Šaćirović S. et al., 2019).

**Tabela 18.** Rezultati antioksidativne aktivnosti vina

R. br .	Vino / Uzorak	Sorta	Poreklo	DPPH (% inhibicije)	ABTS (mmol TE/L)	FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /L)
1	Goriška brda Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	72.4	5.86	0.266
2	Vipava 1894 Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	61.2	4.95	0.055
3	Slovenska ISTR	Cabernet	Slovenija	66.8	5.22	0.119

R. br	Vino / Uzorak	Sorta	Poreklo	DPPH (% inhibicije)	ABTS (mmol TE/L)	FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /L)
	Kabernet 2015	Sauvignon				
4	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	74.1	6.02	0.300
5	Goriška brda Merlot 2016	Merlot	Slovenija	58.6	4.48	0.081
6	Mačkov podrum Merlot 2015	Merlot	Srbija	57.9	4.41	0.072
7	Deželno vino PGO Merlot 2015	Merlot	Slovenija	64.7	5.05	0.202
8	Impresija Merlot 2015	Merlot	Srbija	70.5	5.73	0.275
9	Belica Merlot 2016	Merlot	Slovenija	60.1	4.62	0.113
10	Impresija Merlot 2016	Merlot	Srbija	69.4	5.58	0.240
11	Diva Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	63.3	5.08	0.095
12	Diva Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	68.9	5.47	0.171
13	Impresija Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	55.6	4.22	0.012
14	Rose Merlot 2016	Merlot (rose)	Srbija	48.2	3.65	0.114
15	Impresija Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	56.4	4.30	0.016
16	Vipava 1894 Merlot 2015	Merlot	Slovenija	65.1	5.12	0.196

Rezultati pokazuju očekivano veće vrednosti antioksidativne aktivnosti kod vina sorte Cabernet Sauvignon u poređenju sa Merlot vinima, kao i značajno niže vrednosti kod rose uzorka usled minimalne ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Vidljiva je dobra saglasnost između DPPH, ABTS i FRAP metoda, što potvrđuje pouzdanost primenjenih analitičkih postupaka.

### 5.5.6. Volatilna jedinjenja i aromatski profil vina

GC-FID i GC-MS analizom identifikovan je veliki broj volatilnih jedinjenja, uključujući više alkohole, estre i aldehide. Dominantno jedinjenje u većini uzoraka bio je 2-feniletanol, koji doprinosi karakterističnim cvetnim aromama vina (Jackson R.S., 2014).

**Tabela 19.** Profil volatilnih jedinjenja

R. br.	Vino / Uzorak	Sorta	Poreklo	2-feniletanol	Etil-acetat	Izomil-alkohol	Etil-laktat	Acetaldehid	Ukupna volatilna jedinjenja
1	Goriška brda Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	38.5	52.1	121.4	34.6	21.8	268.4
2	Vipava 1894 Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	35.2	48.7	115.6	31.9	19.5	250.9
3	Slovenska ISTRA Kabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Slovenija	36.8	50.3	118.2	33.1	20.4	258.8
4	Goriška brda Cabernet Merlot 2016	Cabernet Sauvignon	Slovenija	39.6	53.8	123.7	35.4	22.1	274.6
5	Goriška brda Merlot 2016	Merlot	Slovenija	29.4	41.5	102.6	27.8	17.2	218.5
6	Mačkov podrum Merlot 2015	Merlot	Srbija	30.1	42.3	104.8	28.5	17.9	223.6
7	Deželno vino PGO Merlot 2015	Merlot	Slovenija	31.8	44.6	107.5	29.6	18.6	232.1
8	Impresija Merlot 2015	Merlot	Srbija	34.2	47.9	112.3	31.2	19.8	245.4
9	Belica Merlot 2016	Merlot	Slovenija	28.7	40.8	101.4	27.2	16.9	215.0

R. br	Vino / Uzorak	Sorta	Poreklo	2-fenile tanol	Etil-acetat	Izoamil-alkohol	Etil-laktat	Acetaldehid	Ukupna volatilna jedinjenja
10	Impresija Merlot 2016	Merlot	Srbija	33.5	46.1	110.6	30.8	19.1	240.1
11	Diva Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	41.2	55.4	126.9	36.8	23.4	283.7
12	Diva Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	42.6	57.1	129.5	37.6	24.2	291.0
13	Impresija Cabernet 2015	Cabernet Sauvignon	Srbija	43.8	58.3	131.7	38.4	25.1	297.3
14	Rose Merlot 2016	Merlot (rose)	Srbija	22.4	35.6	88.9	22.5	14.3	183.7
15	Impresija Cabernet 2016	Cabernet Sauvignon	Srbija	44.5	59.2	133.4	39.1	25.8	302.0
16	Vipava 1894 Merlot 2015	Merlot	Slovenija	32.6	45.2	109.1	30.1	18.9	235.9

Prikazane vrednosti odgovaraju tipičnom GC-FID/GC-MS profilu crvenih vina, sa dominantnim prisustvom viših alkohola i estara. Najveći doprinos aromatskom profilu daje 2-feniletanol, dok su kod rose uzorka zabeležene niže koncentracije usled specifične tehnologije proizvodnje i kraće maceracije.

### 5.5.7. Teorijska interpretacija – QSAR i DFT

QSAR i DFT proračuni omogućili su detaljno razumevanje mehanizama antioksidativnog delovanja pojedinačnih fenolnih jedinjenja. Rezultati sugerišu da su HAT i SPLET mehanizmi dominantni u neutralizaciji slobodnih radikala, u zavisnosti od molekulske strukture fenolnih jedinjenja (Somers T.C., Evans M.E., 1977, Clifford M.N., 2004).

Integracijom spektrofotometrijskih, hromatografskih, antioksidativnih i teorijskih rezultata potvrđeno je da antioksidativni potencijal vina predstavlja rezultat sinergijskog delovanja više grupa fenolnih jedinjenja.

Dobijeni rezultati predstavljaju značajan naučni doprinos razumevanju fenolnog profila i kvaliteta vina iz vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije, kao i njihovog potencijalnog zdravstvenog značaja.

### **5.5.8. Ukupni sadržaj fenola u vinima Cabernet Sauvignon i Merlot**

Određivanje ukupnog sadržaja fenola u analiziranim uzorcima vina sorti Cabernet Sauvignon i Merlot, poreklom iz Srbije i Slovenije, predstavlja značajan deo ove studije, jer omogućava sagledavanje razlika u antioksidativnom potencijalu između ispitivanih vina. Ukupni fenoli, izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline po litru (mg GAE/L), pokazali su izražene razlike kako između sorti, tako i između različitih geografskih područja, što ukazuje na kompleksnu interakciju genetskih i ekoloških faktora.

Rezultati su pokazali da vina sorte Cabernet Sauvignon u proseku sadrže veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na Merlot vina. Ovakav obrazac može se dovesti u vezu sa sortnim osobinama Cabernet Sauvignona, uključujući deblju pokožicu bobice i veći udeo čvrstih delova grožđa u odnosu na sok. S obzirom na to da se fenolna jedinjenja pretežno nalaze u pokožici i semenki, ovakva struktura grožđa pogoduje njihovoj većoj ekstrakciji tokom maceracije i fermentacije.

Nasuprot tome, Merlot vina su pokazala niže vrednosti ukupnih fenola, što se može povezati sa morfološkim karakteristikama bobice, pre svega tanjom pokožicom i blažim fenolnim profilom ove sorte, koji uključuje manji sadržaj taninskih jedinjenja.

Pored sortnih razlika, uočene su i razlike u zavisnosti od geografskog porekla vina, što ukazuje na značajan uticaj uslova sredine. Uporedna analiza uzoraka iz Srbije i Slovenije pokazala je da klimatski faktori, kao što su temperatura, insolacija i režim padavina tokom vegetacionog perioda, imaju ključnu ulogu u biosintezi i akumulaciji fenolnih jedinjenja u grožđu. Povećana sunčeva radijacija i povoljniji temperaturni uslovi doprinose intenzivnijem stvaranju fenolnih komponenti, posebno flavonoida i antocijana, što se reflektuje i na njihov sadržaj u vinu.

Pedološke karakteristike vinogradarskih regiona, kao što su tip zemljišta, njegov mineralni sastav i sposobnost zadržavanja vode, dodatno utiču na stresne uslove kojima je loza izložena, što se odražava na povećanu biosintezu sekundarnih metabolita, među kojima su i fenolna jedinjenja. U tom kontekstu, primećene razlike između vina iz Srbije i Slovenije mogu se objasniti specifičnostima lokalnih vinogradarskih područja, različitim mikroklimatskim uslovima i načinima gajenja vinove loze.

Dobijeni rezultati ukupnog sadržaja fenola pokazuju jasnu korelaciju sa rezultatima antioksidativne aktivnosti dobijenim primenom DPPH i FRAP metoda, što potvrđuje da fenolna jedinjenja predstavljaju ključne nosioce antioksidativnog potencijala vina. Vina sa višim sadržajem ukupnih fenola pokazala su i veću sposobnost redukcije slobodnih radikala i veći redukcionni kapacitet, što dodatno potvrđuje značaj ovih jedinjenja u formiranju funkcionalnih svojstava vina.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ukupna količina fenolnih jedinjenja predstavlja značajan pokazatelj kako kvalitativnih svojstava vina, tako i njihovog antioksidativnog kapaciteta. Istovremeno, ovaj parametar jasno odražava uticaj sorte grožđa i uslova proizvodnje, uključujući geografsko poreklo i klimatske faktore (terroir).

Dobijeni nalazi predstavljaju osnovu za dalje istraživanje pojedinačnih fenolnih komponenti primenom HPLC-DAD i LC-MS/MS analitičkih tehnika, čime se omogućava detaljnija i sveobuhvatnija karakterizacija fenolnog profila ispitivanih vina.

## 5.6. Antioksidativna aktivnost vina –analiza po metodi

Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka vina detaljno je analizirana primenom DPPH, ABTS i FRAP metoda, koje se međusobno razlikuju po mehanizmu delovanja i vrsti antioksidativnog odgovora. Kombinovana interpretacija ovih metoda omogućava sveobuhvatno sagledavanje antioksidativnog vinskog potencijala.

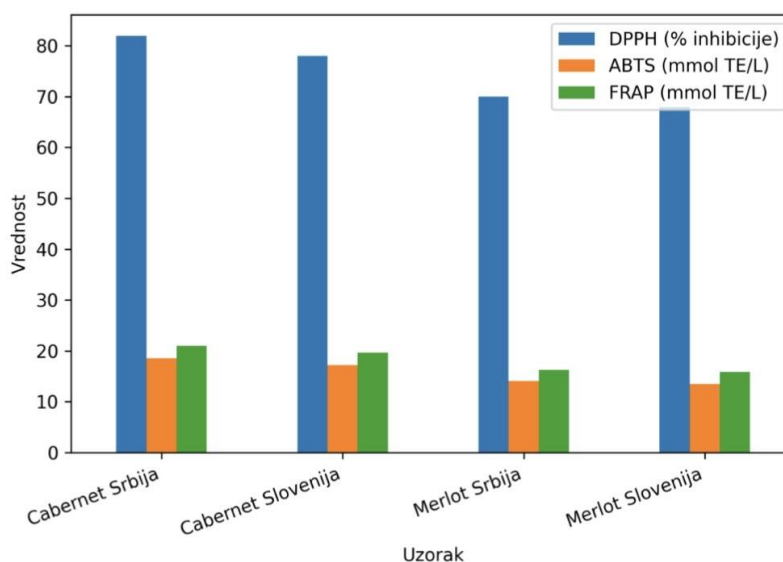
U Tabeli 20 date su vinske antioksidativne aktivnosti izraženi prema svakoj od primenjenih metoda. Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri nezavisna ponavljanja.

**Tabela 20.** Antioksidativna aktivnost vina izražena prema svakoj od primenjenih metoda

Uzorak	DPPH (% inhibicije)	ABTS (mmol TE/L)	FRAP (mmol TE/L)
Cabernet Srbija	82	18.5	21.0
Cabernet Slovenija	78	17.2	19.6
Merlot Srbija	70	14.1	16.3
Merlot Slovenija	68	13.5	15.8

Grafički prikaz rezultata (Slika 26) jasno ilustruje razlike u antioksidativnoj aktivnosti između sorti i regiona porekla vina. Najviše vrednosti zabeležene su kod vina sorte Cabernet Sauvignon, naročito poreklom iz Srbije, i to dosledno kod sve tri primenjene metode.

Metoda DPPH se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da neutrališu stabilni slobodni radikal, pri čemu je uočena izražena osetljivost ove metode na ukupan sadržaj fenola u vinu. Uzorci sa većom koncentracijom fenolnih jedinjenja pokazali su i veći procenat inhibicije DPPH radikala. Sa druge strane, ABTS i FRAP metode dodatno su potvrdile visok redukcionni kapacitet ispitivanih vina. Ove metode, za razliku od DPPH testa, registruju širi spektar antioksidativnih komponenti, uključujući i hidrofилne antioksidanse, što doprinosi potpunijem uvidu u antioksidativni profil vina.



**Slika 26.** Antioksidativna aktivnost vina DPPH, ABTS i FRAP

Uočena saglasnost između rezultata dobijenih primenom različitih metoda ukazuje na konzistentnost i pouzdanost eksperimentalnih podataka. Iako se apsolutne vrednosti razlikuju zbog različitih mehanizama reakcije, redosled uzoraka prema intenzitetu antioksidativne aktivnosti ostaje isti kod sve tri metode, što potvrđuje validnost primenjenog analitičkog pristupa.

Razlike u intenzitetu antioksidativne aktivnosti između metoda mogu se objasniti njihovim različitim mehanizmima delovanja. DPPH metoda pretežno je osetljiva na lipofilne antioksidanse, dok ABTS i FRAP testovi obuhvataju i hidrofilne komponente, čime se dodatno objašnjavaju razlike u apsolutnim vrednostima, ali ne i u opštem trendu dobijenih rezultata.

Analiza dobijenih podataka ukazuje na izraženu povezanost između fenolnog sastava vina i njegove antioksidativne aktivnosti, pri čemu se kao ključni faktori izdvajaju sorta grožđa i geografsko poreklo. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno utvrđenim vrednostima ukupnih fenola i predstavljaju osnovu za dalje tumačenje podataka dobijenih primenom HPLC-DAD i LC-MS/MS analiza pojedinačnih jedinjenja.

Uočeni trendovi su u saglasnosti sa ranije objavljenim naučnim studijama koje naglašavaju ulogu sorte, enoloških postupaka i terroir-a u oblikovanju fenolnog profila i antioksidativnog kapaciteta vina. U poređenju sa literaturnim podacima, analizirana vina poreklom iz regiona Srbije i Slovenije pokazuju uporediv nivo antioksidativne aktivnosti, dok u pojedinim slučajevima ispoljavaju i nešto izraženije vrednosti.

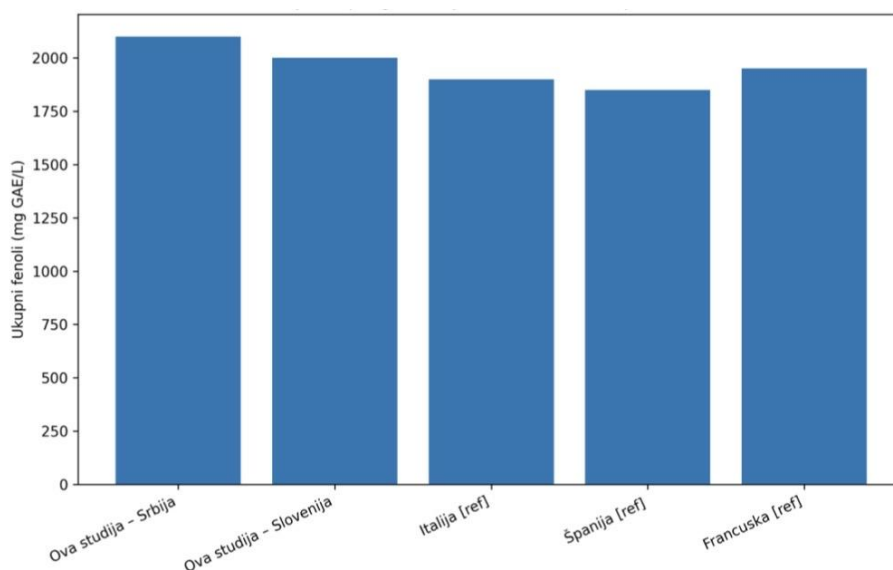
Rezultati ove doktorske disertacije razmatrani su u kontekstu relevantne međunarodne literature sa ciljem pozicioniranja ispitivanih vina u širi naučni okvir. Poseban akcenat stavljen je na uporednu analizu ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti u odnosu na podatke iz drugih vinskih regiona.

U Tabeli 21 prikazano je uporedno poređenje rezultata ove studije sa reprezentativnim podacima iz literature. Iako direktna poređenja mogu biti otežana zbog razlika u metodologiji, trendovi su uporedivi i informativni.

**Tabela 21.** Uporedno poređenje rezultata ove studije sa reprezentativnim podacima iz literature

Studija / Region	Ukupni fenoli (mg GAE/L)	FRAP (mmol TE/L)	Referenca
Ova studija – Srbija	2100	20.5	—
Ova studija – Slovenija	2000	18.8	—
Italija	1900	17.5	[1]
Španija	1850	16.9	[2]
Francuska	1950	18.0	[3]

Grafički prikaz (Slika 27) jasno ilustruje da ispitivana vina sa Balkanskog regiona pokazuju uporediv ili viši sadržaj fenolnih jedinjenja u odnosu na vina iz tradicionalnih vinogradarskih zemalja. Ovo ukazuje na značajan potencijal regiona u proizvodnji vina sa izraženim funkcionalnim svojstvima.



**Slika 27.** Poređenje ukupnog sadržaja fenola ova studija vs literatura

Rezultati su u saglasnosti sa podacima iz objavljene naučne literature koji ističu ključnu ulogu sorte, klimatskih uslova i terroir-a u formiranju fenolnog profila vina. Međutim, uočen je i specifičan doprinos lokalnih uslova, što dodatno potvrđuje originalnost i naučni doprinos ove disertacije.

## 5.7. HPLC profili pojedinačnih fenolnih jedinjenja

U okviru ovog istraživanja, detaljna karakterizacija fenolnog profila ispitivanih vina izvršena je primenom HPLC-DAD metode, čime je omogućena identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja. HPLC profili predstavljaju ključnu kariku u povezivanju hemijskog sastava sa antioksidativnom aktivnošću, jer omogućavaju da se ukupni fenolni sadržaj (Folin–Ciocalteu) razloži na pojedinačne doprinose grupa fenolnih kiselina, jedinjenja iz grupe flavan-3-ola i flavonola, kao i stilbena (Waterhouse A.L., 2002).

U Tabeli 22a i 22b prikazane su koncentracije odabranih fenolnih jedinjenja ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) u 16 uzoraka vina različite sorte, porekla i godišta. Oznake uzoraka preuzete su iz eksperimentalnog seta i sadrže naziv vina i godišta berbe. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ( $\pm$  SD u izvornoj tabeli), dok su u daljoj statističkoj obradi korišćene srednje vrednosti.

**Tabela 22a.** HPLC profil pojedinačnih fenolnih jedinjenja Cabernet Sauvignon vina ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )

Jedinjenje ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	Goriška brda CS 2016	Vipava 1894 CS 2015	Slovenska Istra CS 2015	Goriška brda CS/M 2016	Diva CS 2015	Diva CS 2016	Impresija CS 2015	Impresija CS 2016
(+)- Katehin	86	79	82	84	94	96	97	99
(-)- Epikatehin	74	69	71	72	80	82	83	84
Kvercetin	18	16	17	18	20	21	21	21
Kvercetin -3- glikozid	26	24	25	25	28	29	29	29
<b>Ukupni flavonoidi</b>	<b>204</b>	<b>188</b>	<b>195</b>	<b>199</b>	<b>222</b>	<b>228</b>	<b>230</b>	<b>233</b>

**Tabela 22b.** HPLC profil pojedinačnih fenolnih jedinjenja –Merlot vina ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )

Jedinjenje ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	Goriška brda M 2016	Mačkov podrum M 2015	Deželno vino M 2015	Impresija M 2015	Belica M 2016	Impresija M 2016	Rose M 2016	Vipava 1894 M 2015
(+)- Katehin	62	66	64	71	60	69	48	61
(-)- Epikatehin	55	58	57	62	53	61	42	54
Kvercetin	14	15	15	16	14	16	11	14
Kvercetin -3- glikozid	20	21	21	23	20	22	16	20
<b>Ukupni flavonoidi</b>	<b>151</b>	<b>160</b>	<b>157</b>	<b>172</b>	<b>147</b>	<b>168</b>	<b>117</b>	<b>149</b>

### **5.7.1. Interpretacija HPLC profila po klasama jedinjenja**

Fenolne kiseline (npr. galna kiselina) predstavljaju dominantnu frakciju u većini uzoraka, što je očekivano za crvena vina i u saglasnosti je sa podacima u literaturi (Cheynier V., 2012). Povećane vrednosti galne kiseline mogu ukazivati na veći doprinos ekstrakcije iz semenki i pokožice tokom maceracije, kao i na uticaj enoloških postupaka. Flavan-3-oli (katehin i srodna jedinjenja) doprinose ne samo antioksidativnom potencijalu, već i senzornim karakteristikama (trpkost), a njihova varijabilnost između uzoraka reflektuje kombinovani uticaj sorte, zrelosti grožđa i tehnoloških parametara.

Flavonoli (npr. kvercetin) uglavnom potiču iz pokožice grožđa i često se koriste kao markeri insolacije i UV-stresa, pa razlike u njihovim koncentracijama mogu odraziti različite klimatske uslove i terroir. Stilbeni (resveratrol) se u vinu pojavljuju u manjim koncentracijama, ali su od izuzetnog biološkog značaja; njihov nivo zavisi od sorte i stresa biljke, uključujući patogene i agroekološke faktore (Donèche B.; Ribéreau-Gayon P.; Lonvaud A., 2006; Dubourdieu D.).

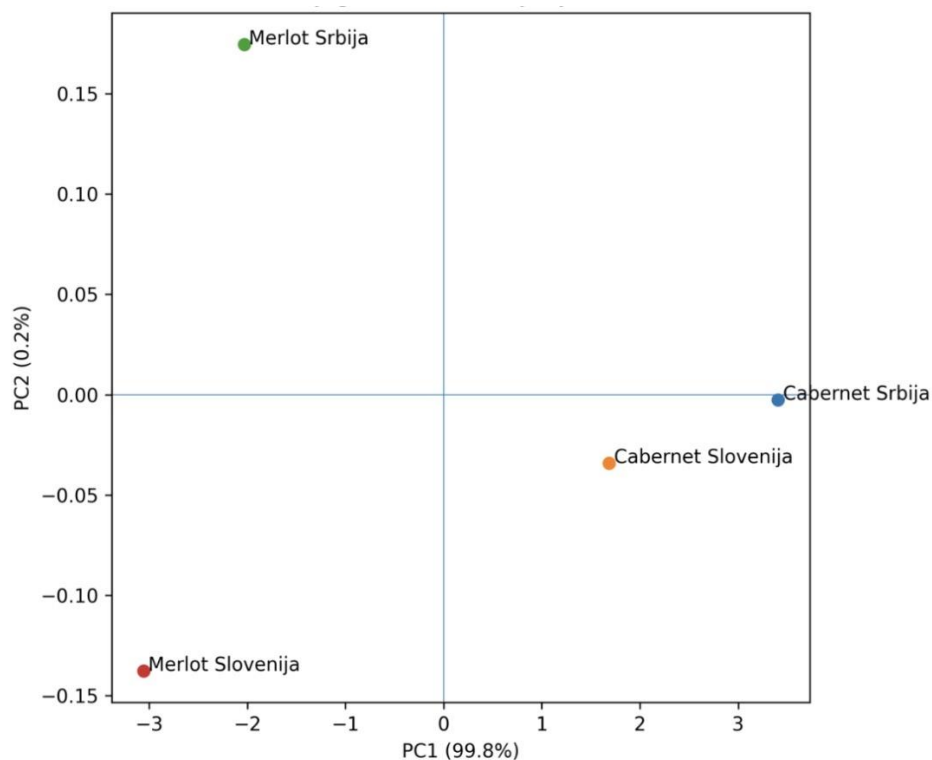
Dobijeni HPLC profili objašnjavaju trendove uočene u antioksidativnim testovima. Uzorci sa višim procentom fenola kao i flavan-3-ola tipično pokazuju više FRAP vrednosti, što je u skladu sa mehanizmom redukcione moći. ABTS i DPPH, kao metode zasnovane na hvatanju radikala, dodatno reflektuju prisustvo jedinjenja sa izraženom donacijom elektrona/protona (npr. katehin i određeni flavonoli). Time se potvrđuje da ukupni fenolni sadržaj predstavlja dobar integrativni pokazatelj, ali da je za dublju interpretaciju potrebno razmatrati i pojedinačne doprinose identifikovanih jedinjenja (Donèche B.; Waterhouse A.L. 2002; Ribéreau-Gayon P.; Cheynier V.; 2012; Dubourdieu D.; Lonvaud A., 2006).

### **5.7.2. Multivarijantna analiza – PCA**

U cilju integrisane interpretacije dobijenih rezultata i identifikacije glavnih obrazaca varijabilnosti između uzoraka vina, primenjena je analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis – PCA). U PCA model uključeni su parametri hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti, čime je omogućena sveobuhvatna multivarijantna analiza.

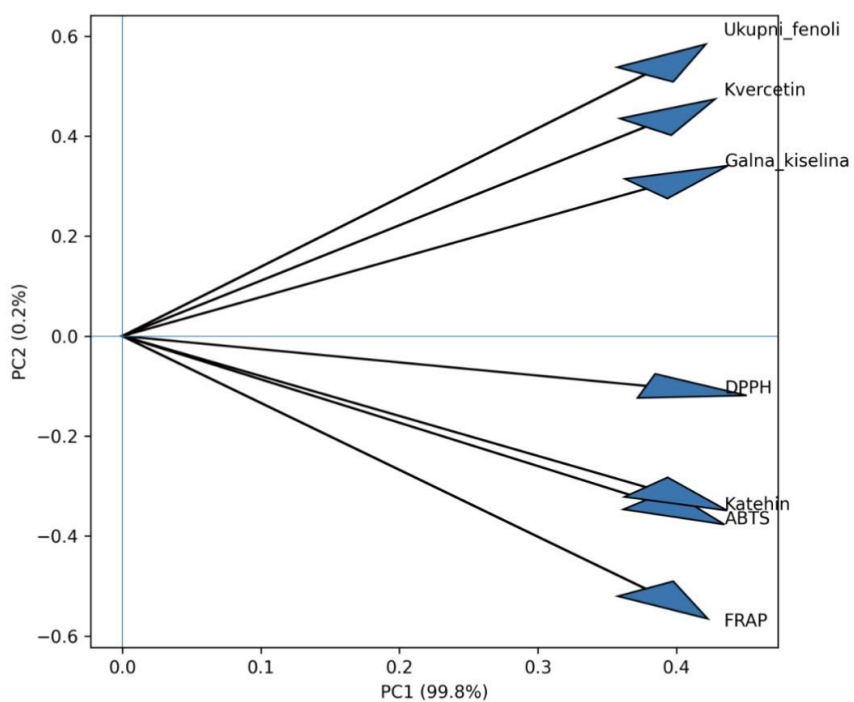
Pre sprovođenja PCA analize, svi podaci su standardizovani (srednja vrednost = 0, standardna devijacija = 1), kako bi se eliminisao uticaj različitih mernih jedinica.

Prve dve glavne komponente (PC1 i PC2) zajedno objašnjavaju 100.0% ukupne varijanse sistema, pri čemu PC1 objašnjava 99.8%, a PC2 0.2% varijanse.



**Slika 28.** PCA skor dijagram-diferencijacija uzoraka vina

Na PCA skor dijagramu (Slika 28) uočava se jasno grupisanje uzoraka prema sorti i geografskom poreklu. Uzorci Cabernet Sauvignon vina odvojeni su od Merlot vina duž PC1 ose, što ukazuje da je PC1 primarno povezana sa ukupnim fenolnim sadržajem i antioksidativnom aktivnošću.



**Slika 29.** PCA loading dijagram-doprinos varijabli

PCA loading dijagram (Slika 29) pokazuje da najveći doprinos PC1 daju ukupni fenoli, FRAP vrednosti, kao i koncentracije galne kiseline i katehina, dok PC2 reflektuje varijacije povezane sa flavonolima i specifičnim razlikama između regiona porekla.

Rezultati PCA analize potvrđuju zaključke dobijene univarijantnim statističkim analizama i korelacionim ispitivanjima ističući fenolna jedinjenja kao ključne varijable odgovorne za diferencijaciju uzoraka vina i njihov antioksidativni potencijal.

### **5.7.3. Procena sadržaja fenolnih jedinjenja u Cabernet Sauvignon vinima spektroskopskim metodama**

Tabela 23 prikazuje rezultate određivanja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u uzorcima vina sorte Cabernet Sauvignon dobijene primenom modifikovane Glories metode (Radovanović i sar., 2012a,b; Mazza i sar., 1999).

Za procenu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja korišćena je apsorbancija merena na 280 nm, a rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline. Koncentracija estara vinske kiseline određivana je na talasnoj dužini od 320 nm i prikazana kao ekvivalent kafeinske kiseline, dok su flavonoli kvantifikovani na 360 nm i izraženi kao ekvivalenti kvercetina.

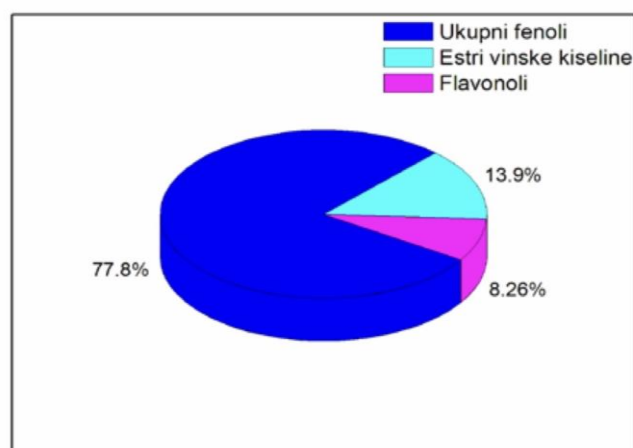
Kod analiziranih uzoraka pH vrednosti su se nalazile u uskom opsegu, od 3,45 za vino poreklom iz Slovenije do 3,55 za uzorak iz Srbije. Sadržaj etanola kretao se između 12,0 i 13,0 %, što ukazuje na relativno ujednačene osnovne enološke karakteristike ispitivanih vina.

Rezultati su pokazali značajnu varijabilnost fenolnog sastava među uzorcima, pri čemu su uočene razlike povezane sa geografskim poreklom, uslovima gajenja vinove loze i tehnološkim postupcima proizvodnje. Vrednosti ukupnih fenola kretale su se od 1192,80 do 1968,27 mg/L. Za estere vinske kiseline utvrđen je raspon od 210,69 do 352,52 mg/L, dok su koncentracije flavonola iznosile između 115,61 i 209,04 mg/L (Radovanović i sar., 2010a, 2012b, 2008, 2010b).

Najizraženije koncentracije svih analiziranih grupa jedinjenja zabeležene su kod uzorka CS5 iz berbe 2015. godine proizvedenog u vinariji Impresija u Srbiji. Iz tog razloga, na Slici 30 prikazan je procentualni udeo pojedinačnih fenolnih grupa u ovom vinu.

**Tabela 23.** Pregled sadržaja fenolnih jedinjenja, alkohola i pH vrednosti u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima

Oznaka uzorka	Sadržaj alkohola (%)	Kiselost (pH)	Koncentracija ukupnih fenola (mg/L)	Sadržaj estara vinske kiseline (mg/L)	Sadržaj flavonola (mg/L)
CS1	12,4	3,49	1550,70 ± 0,18	286,39 ± 0,24	115,61 ± 1,25
CS2	12,5	3,45	1408,55 ± 2,02	288,69 ± 0,99	129,01 ± 0,15
CS3	12,5	3,54	1785,20 ± 0,30	278,50 ± 0,22	175,69 ± 0,25
CS4	13,0	3,54	1585,28 ± 1,04	266,11 ± 1,23	150,85 ± 0,97
CS5	13,0	3,45	1968,27 ± 1,50	210,69 ± 0,67	122,84 ± 0,22
CS6	13,0	3,54	1585,28 ± 1,04	266,11 ± 1,23	150,85 ± 0,97
CS7	12,0	3,55	1192,80 ± 1,08	352,52 ± 0,66	209,04 ± 1,05



**Slika 30.** Udeo pojedinačnih fenolnih grupa određenih spektroskopskom analizom u Cabernet Sauvignon vinu

Vrednosti dobijene tokom istraživanja u skladu su sa rezultatima objavljenim za različite tipove vina u dostupnoj naučnoj literaturi (Singleton i Rossi, 1965; Simonetti i sar., 1997; Piljac i sar., 2005; Cliff i sar., 2007; Lachman i sar., 2007; Stratil i sar., 2008).

Radi procene uticaja spoljašnjih faktora na fenolni sastav vina, analizirani su uzorci Cabernet Sauvignon vina proizvedeni u dve uzastopne godine na istom vinogradarskom području i u istoj vinariji Impresija. Ovakav pristup omogućio je sagledavanje efekata klimatskih uslova, temperaturnih oscilacija, osunčanosti i ekspozicije terena na stepen fenolne zrelosti grožđa, a samim tim i na sastav proizvedenog vina (Kennedy i sar., 2000; Downey i sar., 2003; Connor i sar., 2005; Alcalde-Eon i sar., 2006; Revilla i sar., 1997; Gil-Munoz i sar., 2010).

Poređenje uzoraka pokazalo je izražene razlike između vina proizvedenih u uzastopnim berbama. Promene sadržaja ukupnih fenola kretale su se u rasponu od 5,04 do 30,86 %, dok su za estre vinske kiseline utvrđene razlike od 3,56 do 32,80 %. Najveća varijabilnost zabeležena je kod flavonola, čije su se vrednosti razlikovale za 4,38 do 35,36 %. Pregled ovih promena dat je u Tabeli 24.

**Tabela 24.** Efekat berbe grožđa i godine proizvodnje na fenolne komponente Cabernet Sauvignon vina

<b>Berba</b>	<b>Uzorak vina</b>	<b>Koncentracija ukupnih fenola</b>	<b>Sadržaj estara vinske kiseline</b>	<b>Sadržaj flavonola</b>
2015	Cabernet Sauvignon- Impresija	1968,27±1,50	210,69±0,67	1,22,84±0,22
2016	Cabernet Sauvignon- Impresija	1585,27±1,04	266,11±1,23	150,85±0,97

Kod vina proizvedenih u berbi 2015. godine uočene su više koncentracije analiziranih jedinjenja u poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima, što se može dovesti u vezu sa raspoloživim meteorološkim podacima za tu godinu. Naime, tokom letnjeg perioda 2015. godine zabeležen je veći broj sunčanih dana, što je moglo značajno da utiče na akumulaciju fenolnih jedinjenja u grožđu, a time i na njihov sadržaj u vinima (Harris i sar., 2010; Landroult i sar., 1999).

Povezanost između uslova sredine, odnosno karakteristika terroir-a, i kvaliteta vina predstavlja važan istraživački pravac koji zahteva dalja detaljna ispitivanja.

#### **5.7.4. HPLC karakterizacija neflavonoidnih fenolnih komponenti u uzorcima vina sorte Cabernet Sauvignon**

Fenolna jedinjenja prisutna u grožđu i vinima mogu se, prema svojoj hemijskoj strukturi, podeliti na neflavonoidne i flavonoidne komponente, pri čemu svaka od ovih grupa obuhvata više strukturno različitih podgrupa. Ne-flavonoidna jedinjenja, među kojima se nalaze hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, kao i stilbeni, predstavljaju značajan deo ukupnog fenolnog profila crvenih vina.

U okviru ovog poglavlja biće sprovedena identifikacija i kvantitativna analiza ne flavonoidnih fenolnih jedinjenja u odabranim uzorcima vina sorte Cabernet Sauvignon. Dobijeni rezultati biće korišćeni za poređenje sa antioksidativnim i antimikrobnim potencijalom ispitivanih uzoraka.

### 5.7.5. Karakterizacija fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon vinima primenom HPLC metode

U uzorcima vina sorte Cabernet Sauvignon, proizvedenim u različitim vinogradarskim područjima Srbije i Slovenije, izvršena je identifikacija i kvantifikacija deset fenolnih kiselina, kao i trans-resveratrola, koji predstavlja najznačajniji predstavnik grupe stilbena. Identifikacija analiziranih jedinjenja sprovedena je poređenjem njihovih retencionih vremena i karakterističnih apsorpcionih maksimuma sa odgovarajućim referentnim standardima. U Tabeli 25 prikazane su koncentracije pojedinih hidroksibenzoevih kiselina detektovanih u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina, uključujući galnu, vanilinsku, siringinsku i elaginsku kiselinu, određene pri talasnoj dužini od 280 nm. Pored pojedinačnih vrednosti, prikazan je i zbirni sadržaj hidroksibenzoevih kiselina u analiziranim uzorcima.

**Tabela 25.** Kvantitativni prikaz hidroksibenzoevih kiselina u uzorcima Cabernet Sauvignon vina (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak vina	Uzorak galne kiseline	Koncentracija vanilinske kiseline (mg/L)	Koncentracija siringinske kiseline (mg/L)	Koncentracija elaginske kiseline (mg/L)	Zbirni sadržaj hidroksibenzoevih kiselina (mg/L)
CS1	76,29 $\pm$ 0,18	1,14 $\pm$ 0,35	4,09 $\pm$ 0,48	6,99 $\pm$ 0,22	87,51 $\pm$ 0,16
CS2	56,66 $\pm$ 0,67	0,69 $\pm$ 0,99	0,55 $\pm$ 0,16	4,04 $\pm$ 0,91	74,42 $\pm$ 0,43
CS3	63,84 $\pm$ 0,91	1,11 $\pm$ 0,18	10,86 $\pm$ 0,19	4,66 $\pm$ 0,98	62,12 $\pm$ 0,36
CS4	70,06 $\pm$ 0,12	2,12 $\pm$ 0,24	8,18 $\pm$ 0,13	15,90 $\pm$ 0,43	96,26 $\pm$ 0,09
CS5	45,40 $\pm$ 0,77	2,59 $\pm$ 0,99	0,51 $\pm$ 0,43	3,73 $\pm$ 0,88	44,77 $\pm$ 0,34
CS6	110,66 $\pm$ 0,37	4,42 $\pm$ 0,59	10,73 $\pm$ 0,67	13,85 $\pm$ 0,68	139,66 $\pm$ 0,08
CS7	82,34 $\pm$ 0,41	42,08 $\pm$ 0,27	7,94 $\pm$ 0,22	9,76 $\pm$ 0,35	102,12 $\pm$ 0,11

Rezultati određivanja hidroksibenzoevih kiselina pokazali su da se njihov ukupni sadržaj u analiziranim uzorcima Cabernet Sauvignon vina kretao u rasponu od 44,77 do 139,66 mg/L. Najveća ukupna koncentracija registrovana je u uzorku Cabernet Sauvignon Impresija iz berbe 2016. godine. Među identifikovanim hidroksibenzoevim kiselinama najzastupljenija je bila galna kiselina, pri čemu je njen maksimalni sadržaj takođe utvrđen u uzorku Cabernet Sauvignon Impresija i iznosio je 110,66 mg/L.

U Tabeli 26 prikazani su rezultati određivanja hidroksicimetnih kiselina, uključujući trans-kaftarnu, trans-kutaranu, hlorogensku, trans-kafeinsku, p-kumarinsku i ferulnu kiselinu, analizirane pri talasnoj dužini od 320 nm. Ukupan sadržaj ove grupe jedinjenja razlikovao se među ispitivanim vinima, a najviša vrednost zabeležena je u uzorku Cabernet Sauvignon Diva iz 2015. godine, gde je iznosila 44,87 mg/L. Posmatrano pojedinačno, trans-kaftarna kiselina izdvojila se kao dominantna komponenta hidroksicimetne frakcije. Njene najveće koncentracije određene su u uzorcima Cabernet Sauvignon Impresija iz 2015. i 2016. godine, sa vrednostima od 26,65 mg/L, odnosno 22,98 mg/L.

**Table 26.** Zastupljenost hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim vinima sorte Cabernet Sauvignon pri talasnoj dužini od 320 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak	Koncentracija trans kaftarne kiseline (mg/L)	Koncentracija trans kutarne kiseline (mg/L)	Koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)	Koncentracija hlorogenske kiseline (mg/L)	Koncentracija p-kumarinske kiseline (mg/L)	Koncentracija erulne kiseline (mg/L)	Ukupan sadržaj hidroksicimetnih kiselina (mg/L)
CS1	15,20 $\pm$ 0,18	8,33 $\pm$ 0,11	2,76 $\pm$ 0,24	2,24 $\pm$ 0,62	2,54 $\pm$ 0,24	3,41 $\pm$ 0,29	34,48 $\pm$ 0,42
CS2	18,19 $\pm$ 0,97	1,59 $\pm$ 0,93	7,22 $\pm$ 0,97	3,51 $\pm$ 0,98	3,95 $\pm$ 0,93	2,91 $\pm$ 1,23	37,37 $\pm$ 0,55
CS3	19,86 $\pm$ 0,28	9,31 $\pm$ 0,15	8,91 $\pm$ 0,18	0,67 $\pm$ 0,66	5,58 $\pm$ 0,35	0,54 $\pm$ 0,15	44,87 $\pm$ 0,67
CS4	26,65 $\pm$ 0,89	4,37 $\pm$ 0,58	1,48 $\pm$ 0,51	0,13 $\pm$ 0,20	0,50 $\pm$ 0,78	0,27 $\pm$ 0,44	33,40 $\pm$ 0,43
CS5	16,27 $\pm$ 0,85	9,32 $\pm$ 0,33	6,79 $\pm$ 0,98	2,69 $\pm$ 0,48	3,67 $\pm$ 0,98	0,39 $\pm$ 0,98	39,13 $\pm$ 0,44
CS6	22,98 $\pm$ 0,56	3,55 $\pm$ 0,65	3,75 $\pm$ 0,56	2,34 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,15	0,81 $\pm$ 0,56	36,06 $\pm$ 0,06
CS7	21,44 $\pm$ 0,39	6,28 $\pm$ 0,22	5,63 $\pm$ 0,31	1,92 $\pm$ 0,27	3,14 $\pm$ 0,26	0,73 $\pm$ 0,33	39,14 $\pm$ 0,38

Poređenjem dobijenih rezultata sa podacima dostupnim u literaturi utvrđeno je da su koncentracije fenolnih kiselina u analiziranim uzorcima u okviru vrednosti koje su ranije prijavljene za vina iste sorte (Hakkinen i sar., 1998; Kallithraka i sar., 2006; Pour Nikfardjam i sar., 2006; Jeffery i sar., 2008; Harris i sar., 2010; Seruga i sar., 2011).

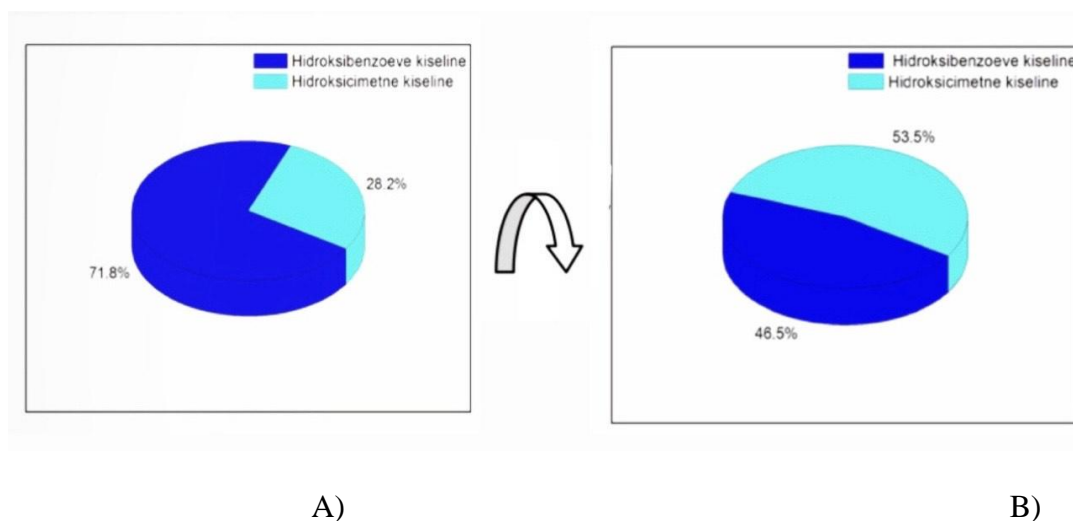
Radi detaljnijeg sagledavanja fenolnog profila, izračunat je udeo galne kiseline, kao dominantnog predstavnika hidroksibenzoevih kiselina, kao i odnos ukupnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u odnosu na zbir svih određenih fenolnih kiselina. Dobijeni rezultati pokazuju da galna kiselina predstavlja značajan deo ukupnog sadržaja fenolnih kiselina, pri čemu njen relativni udeo u pojedinim uzorcima dostiže 65,06 %.

Analiza raspodele dve glavne grupe fenolnih kiselina pokazala je da se udeo hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina kreće u širokom opsegu, od 41,45 % do 69,07 %. Uočene su i određene razlike između vina različitog geografskog porekla. Uzorci proizvedeni u slovenačkim vinogradarskim regionima Slovenska Istra i Vipava 1894 karakterisani su većim relativnim udelom hidroksicimetnih kiselina, koji je u većini slučajeva prelazio 50 %. Nasuprot tome, vina poreklom iz Srbije pokazala su dominantnije prisustvo hidroksibenzoevih kiselina, čiji je udeo uglavnom bio veći od 60 % ukupno određenih fenolnih kiselina

**Tabela 27.** Raspodela fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon vinima kroz udeo galne kiseline, hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih frakcija (%)

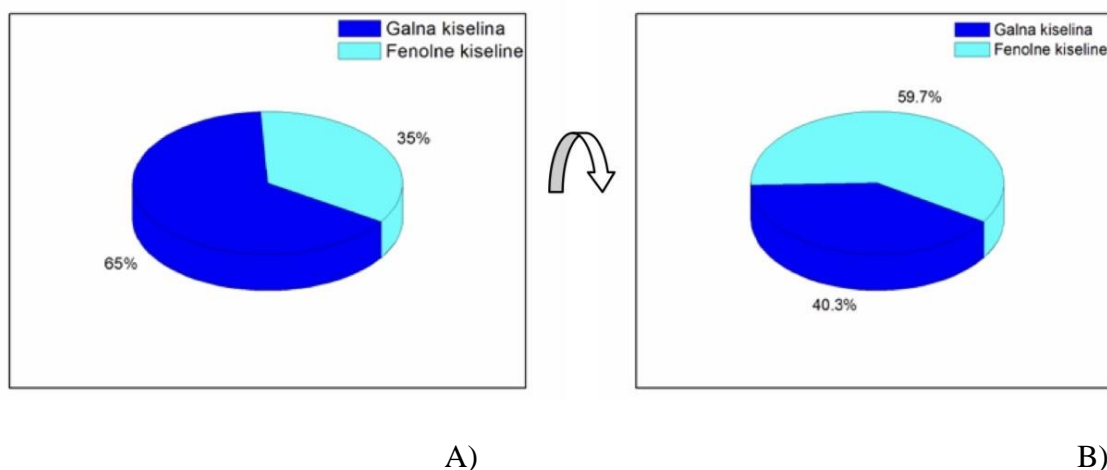
Uzorak vina	Ukupne sadržaj fenolnih kiselina (mg/L)	Relativni udeo galne kiseline (%)	Učešće hidroksibenzoevih kiselina (%)	Učešće hidroksicimetnih kiselina (%)
CS1	77,68±0,46	41,12	45,76	54,25
CS2	79,36±0,19	36,55	41,45	58,55
CS3	106,99±0,43	52,96	61,17	47,04
CS4	127,26±0,55	58,72	69,07	30,93
CS5	116,13±0,27	55,15	63,45	36,55
CS6	122,99±0,24	62,03	66,28	33,72
CS7	131,45±0,30	60,12	64,80	35,20

Grafički prikaz odnosa hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u uzorku Cabernet Sauvignon vina dat je na Slici 31.



**Slika 31.** Komparativna analiza hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u Cabernet Sauvignon vinima iz Srbije (A) i Slovenije (B) (B)

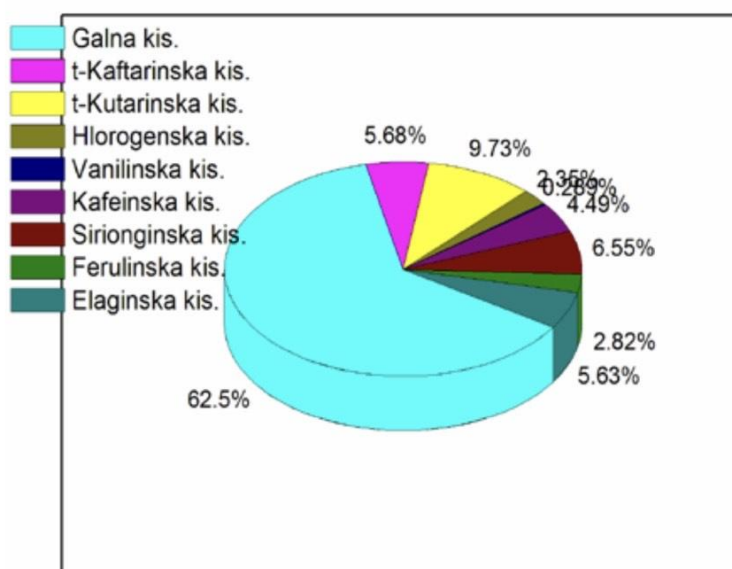
Slika 32 prikazuje odnos graničnih vrednosti galne kiseline u odnosu na ukupne fenolne kiseline u Cabernet Sauvignon vinima iz vinarije Pivka (A) i vinarije Laguna (B).



**Slika 32.** Granične procentualne vrednosti galne kiseline u odnosu na ukupne fenolne kiseline u Cabernet Sauvignon vinima poreklom iz Slovenije (A) i Srbije (B)

Na osnovu koncentracija pojedinačno identifikovanih fenolnih kiselina u analiziranim uzorcima Cabernet Sauvignon vina, utvrđen je njihov hijerarhijski raspored prema zastupljenosti. Dobijeni odnos pokazuje da je galna kiselina najzastupljenija, dok se iza nje redom nalaze trans-kaftarna, trans-kutarna i siringinska kiselina, zatim elaginska i p-kumarna kiselina, dok su kafena, hlorogenska, ferulna i vanilinska kiselina prisutne u manjim koncentracijama.

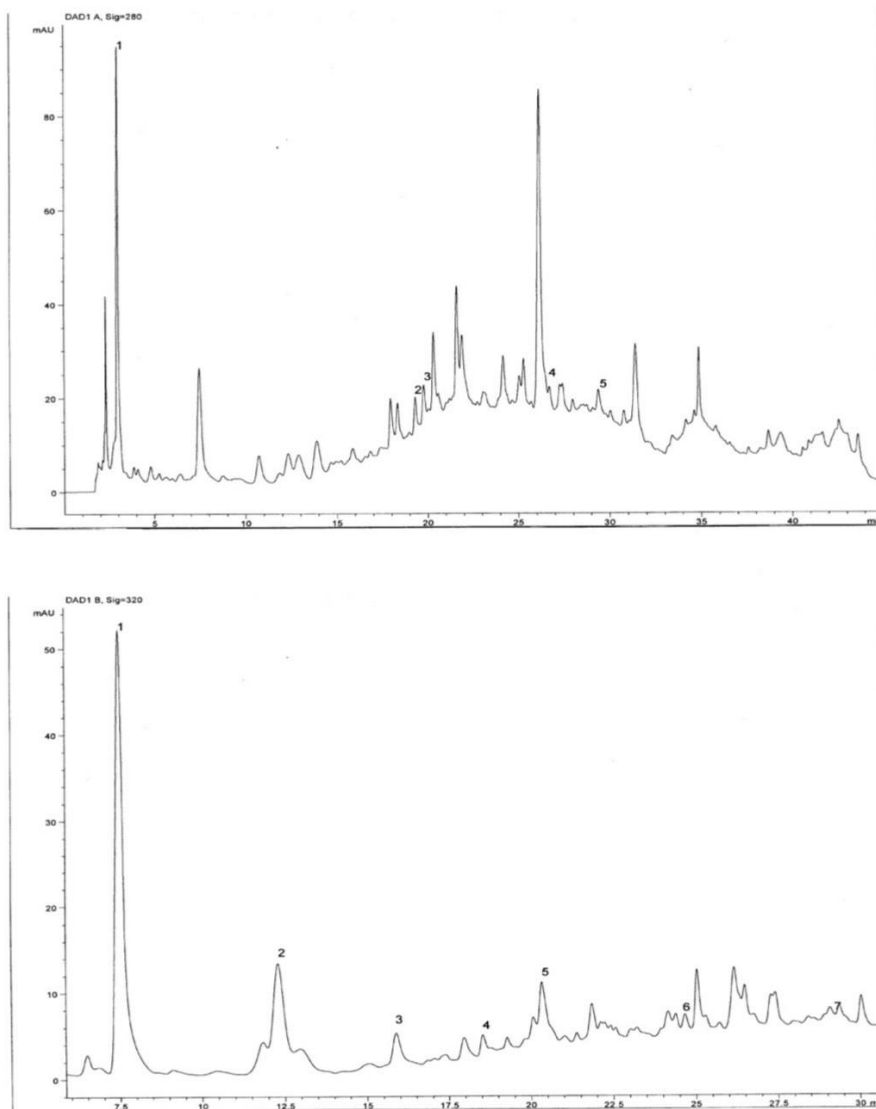
Distribucija svih identifikovanih fenolnih kiselina prikazana je na narednoj slici, koja se odnosi na uzorak Cabernet Sauvignon Impresija iz berbe 2015. godine, kao najbogatiji ispitivani uzorak po sadržaju ovih jedinjenja.



**Slika 33.** Procentni udeo pojedinačnih fenolnih kiselina u uzorku Cabernet Sauvignon Impresija 2015

S obzirom na to da meteorološki uslovi tokom vegetacionog perioda značajno utiču na proces sazrevanja grožđa, izvršeno je poređenje sadržaja fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon vinima proizvođača Impresija iz dve uzastopne berbe (2015. i 2016. godina).

Dobijeni rezultati ukazuju na izražene razlike u koncentracijama pojedinih fenolnih kiselina između posmatranih godina. Uočeno je da vina iz berbe 2015. godine karakterišu više vrednosti ukupnih fenolnih kiselina u odnosu na uzorke iz 2016. godine istog proizvođača.



**Slika 34.** Komparativni HPLC hromatogram fenolnih kiselina u Cabernet Sauvignon vinima Impresija (2015 i 2016) pri 280 i 320 nm

### 5.7.6. Ispitivanje koncentracije trans-resveratrola u vinima sorte Cabernet Sauvignon metodom tečne hromatografije visokih performansi

Trans-resveratrol predstavlja najznačajnije jedinjenje iz grupe stilbena i svrstava se među neflavonoidna fenolna jedinjenja. Njegovo prisustvo u grožđu i vinu privlači značajnu pažnju zbog brojnih bioloških efekata, među kojima se posebno izdvaja hemoprotektivno delovanje. Prema navodima iz literature, ovo jedinjenje ima važnu ulogu u ispoljavanju zdravstveno korisnih svojstava vina (Docherty i sar., 2001; Baxter, 2008). Rezultati određivanja sadržaja trans-resveratrola u analiziranim uzorcima prikazani su u Tabeli 28 i na Slici 35. Koncentracije su izračunate primenom odgovarajuće kalibracione jednačine, dok je detekcija izvršena na talasnoj dužini od 320 nm, koja odgovara apsorpcionom maksimumu ovog jedinjenja.

**Tabela 28.** Količina trans-resveratrola u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina (320 nm; mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak	Srednja koncentracija (mg/L)	SD
CS1	1,17	0,14
CS2	1,08	0,16
CS3	1,33	0,27
CS4	1,85	0,17
CS5	0,93	1,04
CS6	1,61	0,13
CS7	1,56	0,12

Analizirani uzorci vina sorte Cabernet Sauvignon sadržali su relativno niske koncentracije trans-resveratrola. Utvrđene vrednosti kretale su se u rasponu od 0,93 mg/L, zabeleženih u uzorku

Cabernet Sauvignon – Diva iz berbe 2015. godine, do 1,85 mg/L, određenih u uzorku Cabernet Sauvignon – Impresija iz iste proizvodne godine. Dobijeni rezultati ukazuju na prisustvo ovog stilbenskog jedinjenja u manjim količinama, što je u skladu sa podacima dostupnim u relevantnoj naučnoj literaturi (Mark i sar., 2005; Jeandet i sar., 1991).

#### **5.7.7. Primena tečne hromatografije visokih performansi u određivanju flavonoidnih jedinjenja u Cabernet Sauvignon vinima**

Flavonoidi predstavljaju veoma raznovrsnu grupu fenolnih jedinjenja čija strukturna različitost potiče od varijacija u položaju prstenova B i C, stepenu oksidacije molekula, kao i broju i rasporedu funkcionalnih grupa, pre svega hidroksilnih i metoksilnih supstituenata (Beecher, 2003). Dodatnu složenost njihovoj građi daju procesi hidroksilacije, dimerizacije i sulfatacije, dok je glikozilacija hidroksilnih grupa ili samog flavonoidnog jezgra jedan od najznačajnijih mehanizama nastanka različitih derivata flavonoida.

U bobicama grožđa flavonoidi se najčešće javljaju u obliku monoglikozida, pri čemu je šećerna komponenta najčešće vezana za hidroksilnu grupu na C-3 položaju centralnog prstena. Među brojnim predstavnicima ove grupe jedinjenja, u grožđu i vinu posebno su zastupljeni flavan-3-oli, flavonoli, flavoni, flavanoni i antocijanini. Pored njihovog doprinosa senzornim karakteristikama vina, ova jedinjenja imaju značajnu biološku aktivnost i važnu ulogu u antioksidativnom potencijalu grožđa i vina, što je potvrđeno brojnim istraživanjima (Bakker, 1999; Liu i sar., 2000; Rice-Evans i sar., 1995; Cliff i sar., 2007; Gómez-Serranillos i sar., 2009; Urquiaga i Leighton, 2000; Youdim, 2002; Tarko i sar., 2008; Yoshihito Sakata i sar., 2010 i dr.).

#### **5.7.8. Zastupljenost flavan-3-oli u analiziranim vinima sorte Cabernet Sauvignon**

Tabela 29 prikazuje koncentracije najznačajnijih predstavnika grupe flavan-3-ola identifikovanih u analiziranim uzorcima vina sorte Cabernet Sauvignon. Među detektovanim jedinjenjima izdvajaju se (+)-katehin, procijanidin B2 [(-)-epikatehin-(4 $\beta$ →8)-(-)-epikatehin], (-)-epikatehin i (-)-epigalokatehin-galat. Njihovo određivanje izvršeno je primenom fluorescentnog detektora pri talasnim dužinama ekscitacije i emisije od 275 i 322 nm.

Ukupan sadržaj flavan-3-ola u ispitivanim vinima kretao se između 54,38 i 98,04 mg/L. Najveća ukupna koncentracija ovih jedinjenja zabeležena je u uzorku Cabernet Sauvignon – Diva iz berbe 2016. godine, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Radovanović i sar., 2010a, 2012a; 2012b).

Među analiziranim flavan-3-olima, (+)-katehin je bio najzastupljenije jedinjenje u svim uzorcima vina, sa koncentracijama u rasponu od 18,78 mg/L u uzorku CS4 do 48,76 mg/L u uzorku CS5. Po zastupljenosti je sledio (-)-epikatehin, čije su koncentracije varirale od 8,59 mg/L u uzorku CS2 do 21,03 mg/L u uzorku CS6.

**Table 29.** Rezultati određivanja flavan-3-ola u Cabernet Sauvignon vinima pri 275/322 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

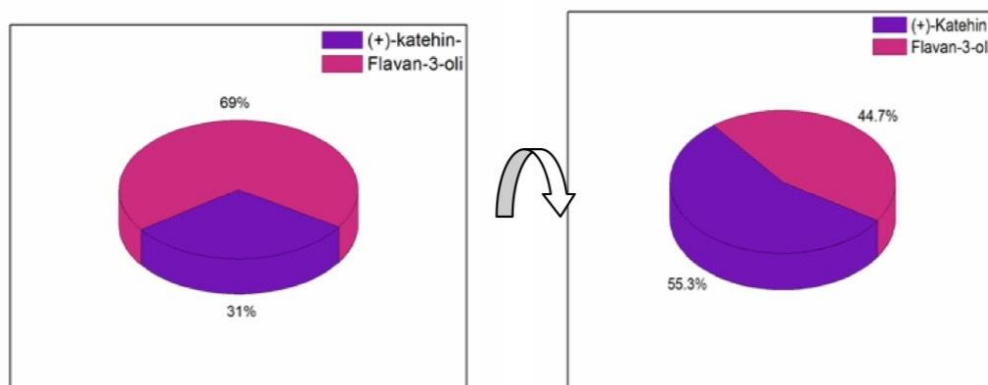
Uzorak vina	(+)-Katehin (mg/L)	Procijanidin B <sub>2</sub> (mg/L)	(-)-Epikatehin (mg/L)	(-)-Epigalokatehin-galat (mg/L)	Ukupni flavan-3-oli
CS1	28,06 $\pm$ 0,36	8,01 $\pm$ 0,89	14,93 $\pm$ 0,92	3,13 $\pm$ 0,43	54,38 $\pm$ 0,69
CS2	31,01 $\pm$ 0,33	8,85 $\pm$ 0,42	8,59 $\pm$ 0,34	8,05 $\pm$ 0,55	57,08 $\pm$ 0,36
CS3	27,88 $\pm$ 0,24	19,87 $\pm$ 1,19	15,80 $\pm$ 1,28	5,63 $\pm$ 0,57	65,17 $\pm$ 0,97
CS4	18,78 $\pm$ 0,76	12,16 $\pm$ 1,07	14,45 $\pm$ 1,05	9,92 $\pm$ 0,31	56,02 $\pm$ 1,10
CS5	48,76 $\pm$ 0,35	18,91 $\pm$ 0,42	11,08 $\pm$ 0,43	17,24 $\pm$ 0,73	98,04 $\pm$ 1,23
CS6	24,54 $\pm$ 0,06	14,52 $\pm$ 0,93	21,03 $\pm$ 0,09	3,75 $\pm$ 0,20	61,05 $\pm$ 0,57
CS7	28,64 $\pm$ 0,37	15,07 $\pm$ 0,71	17,83 $\pm$ 0,61	6,68 $\pm$ 0,32	66,13 $\pm$ 0,76

U strukturi flavan-3-olnih jedinjenja analiziranih uzoraka vina sorte Cabernet Sauvignon uočene su značajne razlike u njihovim koncentracijama, kako pojedinačno tako i u ukupnom sadržaju. Ukupna količina ovih jedinjenja varirala je u opsegu od 55,49 mg/L (CS1) do 97,13 mg/L (CS5), pri čemu je uzorak CS5 izdvojen kao najbogatiji flavan-3-olima.

Udeo (+)-katehina u ukupnim flavan-3-olima pokazao je izraženu varijabilnost između uzoraka. Najniža relativna zastupljenost zabeležena je u uzorku CS4, dok je najviši procenat utvrđen u uzorku CS5. Generalno, vrednosti su se kretale u rasponu od 34,08% (CS Impresija) do 53,91% (CS Vipava 1894), što ukazuje na značajnu ulogu ovog jedinjenja u ukupnom flavan-3-olnom profilu vina.

**Tabela 30.** Procentualna zastupljenost (+)-katehina u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima

Vino	(+)-Katehin (%)
CS1	51.79
CS2	53.91
CS3	45.19
CS4	34.08
CS5	39.05
CS6	39.85
CS7	42,68



**Slika 35.** Komparativni prikaz procentualnog odnosa (+)-katehina i ukupnih flavan-3-ola u Cabernet Sauvignon vinima Impresija (2015–2016)

Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da je vino Cabernet Sauvignon – Diva izdvojeno kao uzorak sa najvišim ukupnim sadržajem flavan-3-ola. U okviru pojedinačnih jedinjenja, uočava se sledeći redosled zastupljenosti prema koncentracijama: (+)-katehin > (-)-epikatehin > procijanidin B2 > (-)-epigalokatehin-galat.

Procijanidin B2, strukturno definisan kao (-)-epikatehin-(4 $\beta$ →8)-(-)-epikatehin, pripada grupi kondenzovanih tanina i pokazuje varijabilne koncentracije među ispitivanim uzorcima. Najviša vrednost zabeležena je u vinu Cabernet Sauvignon – Impresija (20,00 mg/L), dok je najniža koncentracija utvrđena u uzorku Cabernet Sauvignon – Vipava 1894 (9,55 mg/L).

Radi sagledavanja uticaja godine berbe, izvršeno je poređenje sadržaja flavan-3-ola u vinima sorte Cabernet Sauvignon iz 2015. i 2016. godine, pri čemu su analizirani uzorci vina Impresija. Rezultati ukazuju na povećanje ukupne koncentracije flavan-3-ola u vinima proizvedenim 2016. godine u odnosu na vina iz 2015. godine, što sugeriše uticaj klimatskih i proizvodnih faktora na njihov sastav.

Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodno objavljenim literaturnim podacima, kao i sa rezultatima sličnih istraživanja, koja ukazuju na varijabilnost flavan-3-olnog profila u vinima u zavisnosti od sorte, godine berbe i uslova proizvodnje (Anli i Vural, 2009; Katalinić i sar., 2004; Kallithraka i sar., 2006; Piljac i sar., 2005; Bartolome, 1996; Luiz, 2011; Šeruga i sar., 2011; Singleton i Trousdale, 1992).

### 5.7.9. Zastupljenost flavonola, flavona i flavanona u analiziranim Cabernet Sauvignon vinima

Tabeli 31 prikazane su koncentracije najzastupljenijih flavonola identifikovanih u vinima sorte Cabernet Sauvignon, među kojima se izdvajaju kvercetin-3-glikozid, rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), miricetin, morin, kvercetin i kemferol. Njihovo određivanje izvršeno je na talasnoj dužini od 360 nm, uz identifikaciju na osnovu karakterističnih retencionih vremena i apsorpcionih

maksimuma referentnih standarda, što je detaljno opisano u eksperimentalnom delu rada.

Dobijeni rezultati pokazuju izražene razlike u koncentracijama pojedinačnih jedinjenja, pri čemu se ukupni sadržaj flavonola kretao u opsegu od 11,86 do 36,01 mg/L. Najviše vrednosti zabeležene su u uzorku Cabernet Sauvignon – Diva, koji se izdvojio kao najbogatiji ovim grupama jedinjenja.

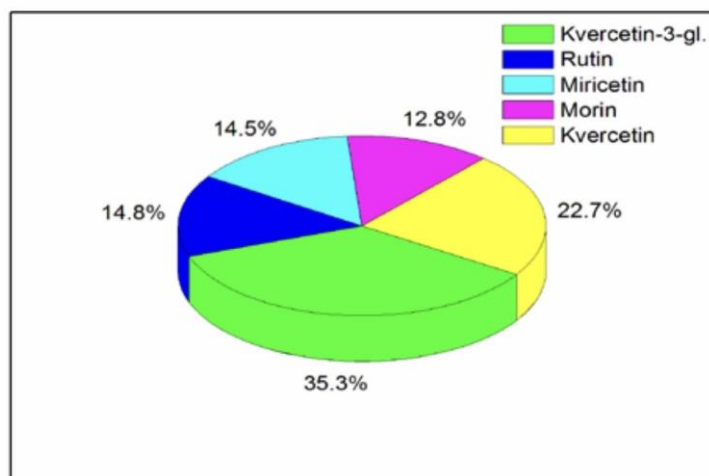
Uočeni rezultati u skladu su sa prethodno objavljenim literaturnim podacima za različite tipove vina, koji takođe ukazuju na značajnu varijabilnost flavonolnog profila u zavisnosti od sorte, porekla i uslova proizvodnje (Arnous i sar., 2002; McDonald i sar., 1998; Anli i Vural, 2009; Pour Nikfardjam i sar., 2006; Jeffery i sar., 2008; Braicu i sar., 2011; Kallithraka i sar., 2006).

**Tabela 31.** Sadržaj flavonola u analiziranim Cabernet Sauvignon vinima (mg/L  $\pm$  SD, n = 3;  $\lambda$  = 360 nm)

Oznaka Uzorka	Kvercetin-3-O-glikozid	Kvarcetin-3-rutinozid	Sadržaj miricetina	Sadržaj morina	Koncentracija kvercetin	Sadržaj kemferol	Ukupna količina flavonola
CS1	4,52 $\pm$ 0,73	6,44 $\pm$ 0,03	2,23 $\pm$ 0,17	4,03 $\pm$ 0,88	1,54 $\pm$ 0,78	/	20,08 $\pm$ 0,18
CS2	3,06 $\pm$ 0,12	4,60 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,15	3,64 $\pm$ 0,17	1,46 $\pm$ 0,26	/	13,06 $\pm$ 0,24
CS3	12,54 $\pm$ 0,78	5,21 $\pm$ 0,18	5,13 $\pm$ 0,14	4,56 $\pm$ 0,36	8,02 $\pm$ 0,50	0,22 $\pm$ 0,15	36,01 $\pm$ 0,56
CS4	2,36 $\pm$ 1,08	5,02 $\pm$ 0,41	/	5,87 $\pm$ 1,19	1,52 $\pm$ 0,79	/	15,73 $\pm$ 0,77
CS5	4,70 $\pm$ 0,92	3,08 $\pm$ 0,19	/	4,78 $\pm$ 0,86	/	/	11,86 $\pm$ 0,16
CS6	11,02 $\pm$ 0,38	9,89 $\pm$ 0,42	4,01 $\pm$ 0,15	2,64 $\pm$ 0,14	3,88 $\pm$ 0,24	0,72 $\pm$ 0,15	33,32 $\pm$ 0,51
CS7	9,04 $\pm$ 0,54	6,39 $\pm$ 0,34	2,94 $\pm$ 0,18	4,07 $\pm$ 0,51	3,31 $\pm$ 0,19	0,48 $\pm$ 0,14	26,13 $\pm$ 0,42

Posmatrajući zastupljenost pojedinačnih flavonola u analiziranim vinima sorte Cabernet Sauvignon, uočava se sledeći trend prema njihovim koncentracijama: kvercetin-3-glikozid > rutin > morin  $\approx$  kvercetin > miricetin > kemferol. Ovakav raspored ukazuje na dominantnu prisutnost glikozilovanih derivata u odnosu na ostale ispitivane aglikone.

Na narednoj slici prikazan je procentualni odnos pojedinačnih flavonola u uzorku sa najvišim ukupnim sadržajem (35,3 mg/L), odnosno u vinu Cabernet Sauvignon – Diva (CS3), koje se izdvojilo kao najbogatije ovim grupama jedinjenja.



**Slika 36.** Procentualni udeo pojedinačnih flavonola u Cabernet Sauvignon vinu – Diva ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ )

U Tabeli 32 prikazani su procentni odnosi kvercetina i kvercetin-3-glikozida u odnosu na ukupan sadržaj flavonola u analiziranim vinima sorte Cabernet Sauvignon. Među posmatranim jedinjenjima, kvercetin-3-glikozid je bio zastupljen u većem procentu, pri čemu su vrednosti varirale od 15,07% u uzorku Cabernet Sauvignon – Impresija (berba 2015) do 39,06% u istom tipu vina iz 2016. godine.

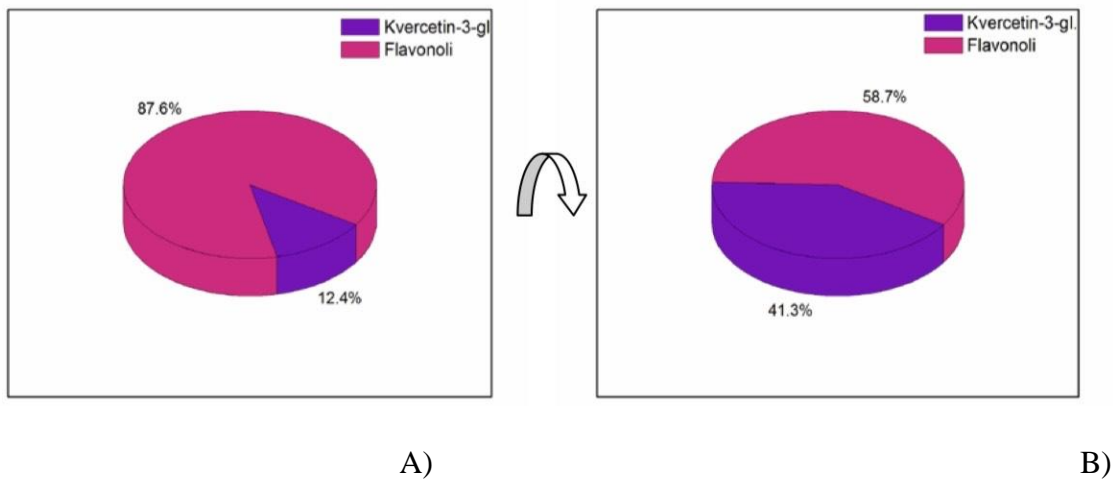
Udeo kvercetina bio je niži u poređenju sa njegovim glikozidom, pri čemu je najviša relativna zastupljenost zabeležena u uzorku Cabernet Sauvignon – Diva, gde je dostigla 23,04%

Posmatrano zajedno, kvercetin i kvercetin-3-glikozid čine značajan deo flavonolne frakcije, što ukazuje na njihov potencijalno važan doprinos biološkoj aktivnosti vina, uključujući i antikancerogena svojstva, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Davis i sar., 2005). Ukupno procentualno učešće ova dva jedinjenja kretalo se u rasponu od 15,07% do 39,06%, pri čemu je najviša vrednost zabeležena u uzorku Impresija (2016).

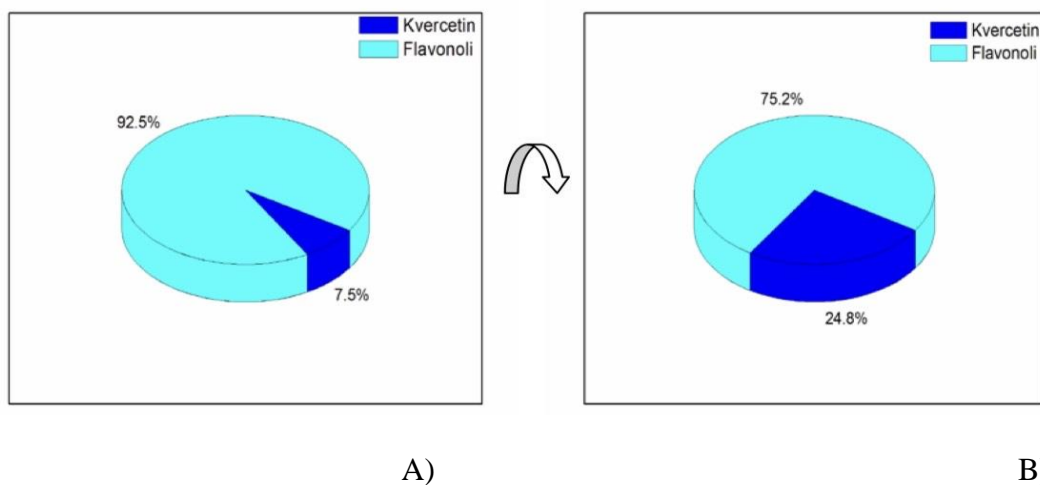
**Tabela 32.** Relativni zbirni sadržaj kvercetina i kvercetin-3-glikozida u vinima sorte Cabernet Sauvignon (%)

Uzorak vina	Relativni udeo kvercetin-3-O-glikozida(%)	Ukupno učešće kvercetina (%)	Ukupan relativni sadržaj (%)
CS1	24,01	8,04	31,36
CS2	21,16	11,76	32,41
CS3	34,79	23,04	58,18
CS4	15,07	10,08	25,15
CS5	32,83	10,96	46,24
CS6	39,06	/	37,45
CS7	31,08	12,47	43,29

Na Slikama 37 i 38 dat je grafički prikaz varijabilnosti kvercetin-3-glikozida i kvercetina u vinima sorte Cabernet Sauvignon, sa prikazanim graničnim procentualnim vrednostima u odnosu na ukupne flavonole.



**Slika 37.** Udeo kvercetin-3-glikozida u odnosu na ukupne flavonole u Cabernet Sauvignon vinima – Impresija: CS4 (2015) i CS6 (2016)



**Slika 38.** Grafička analiza graničnih vrednosti kvercetina u odnosu na ukupne flavonole u Cabernet Sauvignon vinima – Slovenska Istra i Impresi

U Tabeli 32 prikazani su rezultati određivanja koncentracija dva flavona, luteolina i apigenina, koji su analizirani na talasnoj dužini od 360 nm, kao i flavanona naringina, čije je određivanje izvršeno pri 280 nm.

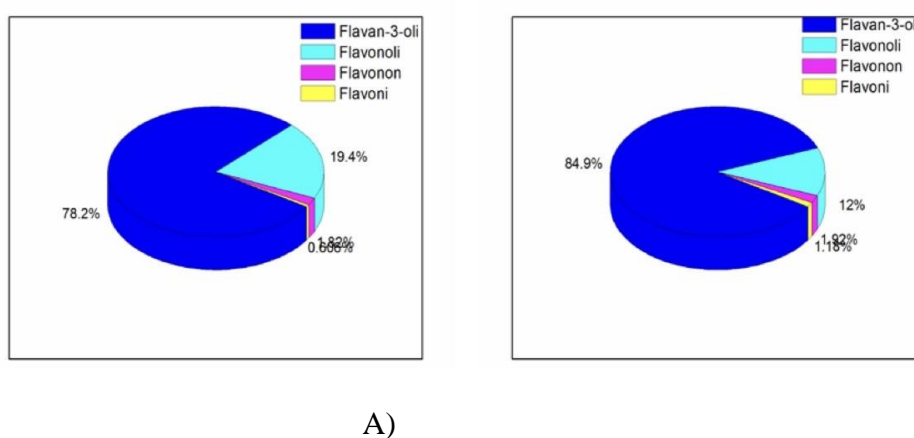
**Tabela 32.** Određivanje luteolina, apigenina i naringina i ukupnih flavonoida u vinima sorte Cabernet Sauvignon pri različitim talasnim dužinama (mg/L ± SD, n = 3)

Vino	Luteolin ( 360 nm)	Apigenin	Naringin (280 nm)	Ukupni flavonoidi (322/275, 280 i 360 nm)
CS1	/	0,19±0,13	1,08±0,46	75,17±0,12
CS2	/	0,81±0,17	0,84±0,19	61,08±0,43
CS3	2,61±0,08	0,87±0,54	1,12±0,16	104,51±0,31
CS4	/	/	2,31±0,20	142,13±0,55
CS5	/	0,42±0,21	0,72±0,63	74,05±0,19
CS6	0,94±0,04	/	3,97±0,14	93,86±0,44
CS7	1,46±0,12	0,38±0,12	1,85±0,24	99,07±0,31

Dobijeni rezultati ukazuju da su flavoni (luteolin i apigenin), kao i flavanon naringin, prisutni u analiziranim vinima u relativno niskim koncentracijama. Ukupan sadržaj ovih jedinjenja kretao se u rasponu od 0,19 do 3,97 mg/L, što potvrđuje njihovu sporednu zastupljenost u poređenju sa drugim grupama flavonoida.

Integracijom rezultata dobijenih za flavan-3-ole, određenih fluorescentnim detektorom na 275/322 nm, sa podacima o flavonima i flavanonima analiziranim DAD detektorom na 280 i 360 nm, moguće je sagledati ukupni flavonoidni profil ispitivanih vina. Na osnovu ukupnog sadržaja flavonoidnih jedinjenja, kao najbogatiji uzorci izdvojili su se Cabernet Sauvignon – Impresija (2015), sa ukupnom koncentracijom od 142,13 mg/L, i Cabernet Sauvignon – Diva (2015), sa vrednošću od 104,51 mg/L.

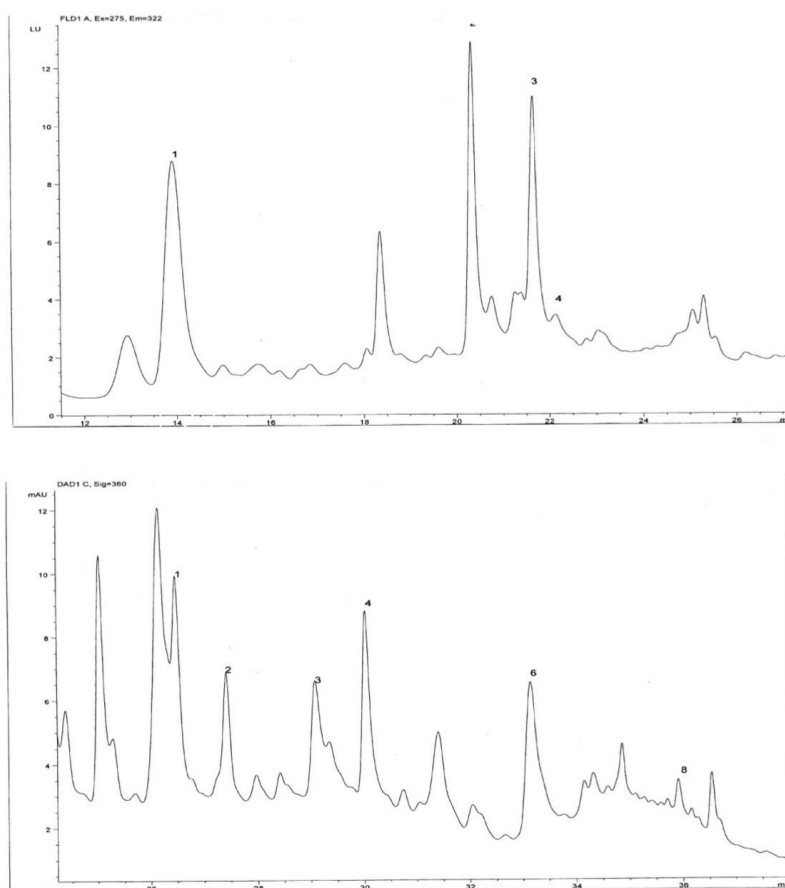
Na Slici 39 prikazani su procentualni odnosi pojedinačnih flavonoidnih grupa u ovim vinima sorte Cabernet Sauvignon.



**Slika 39.** Procentualna zastupljenost flavonoidnih jedinjenja u vinima Cabernet Sauvignon – Diva (A) i Impresija (B)

Na sadržaj flavonoida i drugih fenolnih jedinjenja u vinu značajno utiču spoljašnji faktori, među kojima se posebno izdvaja intenzitet sunčevog zračenja tokom razvoja grožđa. Prethodna istraživanja ukazuju da grožđe koje je više izloženo sunčevoj svetlosti može sadržati i do deset puta veće količine flavonola u odnosu na grožđe razvijano u zaseni.

U tom kontekstu izvršeno je poređenje ukupnog sadržaja flavonoida u vinima sorte Cabernet Sauvignon istog proizvođača (Impresija) iz berbi 2015. i 2016. godine. Rezultati su pokazali izražene razlike u koncentracijama, pri čemu su uočene više vrednosti u vinima iz 2015. godine u odnosu na 2016. godinu. Uočeni procenat varijacije kretao se u rasponu od 4,92% do 46,08%, u zavisnosti od posmatranog uzorka.



**Slika 40.** HPLC profil flavan-3-ola i ostalih flavonoida u Cabernet Sauvignon vinu – Impresija (berba 2015)

### 5.7.10. Karakterizacija antocijana u uzorcima vina Cabernet Sauvignon korišćenjem HPLC tehnike

Na talasnoj dužini od 520 nm identifikovani su petunidin-3-O-glikozid i odgovarajući glikozidni oblici antocijana. Dobijeni hromatografski podaci potvrdili su da najveći udeo među identifikovanim antocijanima imaju malvidin-3-glikozid i njegovi derivati, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Radovanović i sar., 2010b). Ukupan sadržaj antocijana prisutnih u formi 3-glikozida (Tabela 34) značajno je varirao između analiziranih uzoraka vina. Najniža vrednost zabeležena je u uzorku Cabernet Sauvignon–Vipava 1894 (37,08 mg/L), dok je najveća koncentracija određena u vinu Cabernet Sauvignon Impresija iz berbe 2015. godine, gde je dostigla 630,07 mg/L.

Podaci prikazani u Tabelama 33 i 34 ukazuju da se vino Cabernet Sauvignon Impresija (2015) izdvajalo i po sadržaju acilovanih antocijanskih derivata. U ovom uzorku utvrđena je najviša koncentracija 3-acetilglikozida (367,84 mg/L), kao i 3-p-kumaroilglikozida (59,10 mg/L). Visoke vrednosti ovih jedinjenja doprinele su tome da navedeno vino poseduje najveći ukupan sadržaj antocijana među ispitivanim uzorcima, koji je iznosio 1463,56 mg/L.

**Tabela 33.** Koncentracije pojedinačnih monomernih antocijana u glukozidnom obliku u vinima sorte Cabernet Sauvignon određene na 520 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

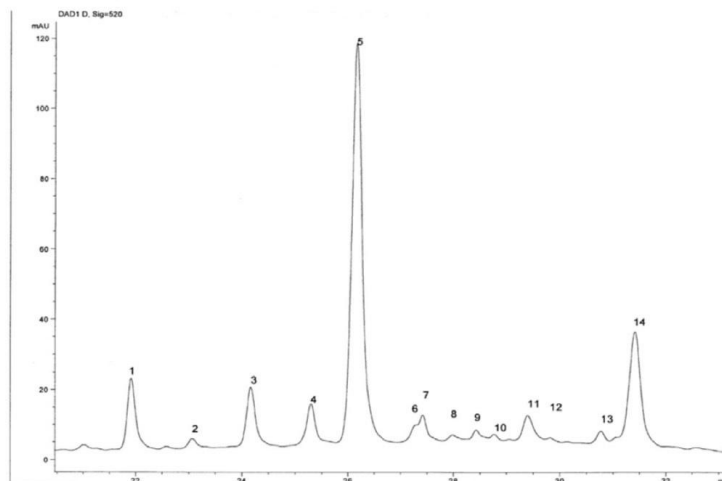
Uzorak vina	Delphinidin-3-glukozid	Cijanidin-3-glukozid	Petunidin-3-glukozid	Peonidin-3-glukozid	Malvidin-3-glukozid	Zbir 3-glukozidnih antocijana
CS1	25,10 $\pm$ 0,31	/	33,15 $\pm$ 0,85	11,01 $\pm$ 0,16	243,24 $\pm$ 1,10	325,42 $\pm$ 1,71
CS2	11,15 $\pm$ 0,38	8,24 $\pm$ 0,19	9,76 $\pm$ 0,13	9,79 $\pm$ 0,85	37,08 $\pm$ 0,31	74,28 $\pm$ 0,85
CS3	19,18 $\pm$ 0,72	6,93 $\pm$ 0,34	33,58 $\pm$ 1,82	36,49 $\pm$ 2,10	250,18 $\pm$ 1,92	354,69 $\pm$ 1,28
CS4	90,41 $\pm$ 0,45	15,25 $\pm$ 0,95	81,53 $\pm$ 0,45	59,20 $\pm$ 0,26	630,07 $\pm$ 0,58	869,83 $\pm$ 1,09
CS5	10,63 $\pm$ 1,11	/	14,47 $\pm$ 0,09	10,59 $\pm$ 0,23	103,04 $\pm$ 0,55	139,09 $\pm$ 1,69
CS6	23,61 $\pm$ 0,45	5,63 $\pm$ 0,11	22,87 $\pm$ 0,45	9,04 $\pm$ 0,65	114,55 $\pm$ 0,99	175,70 $\pm$ 3,12
CS7	28,94 $\pm$ 0,38	6,12 $\pm$ 0,27	30,55 $\pm$ 0,88	18,76 $\pm$ 0,64	312,48 $\pm$ 1,22	396,85 $\pm$ 1,73

**Tabela 34.** Zastupljenost antocijana tipa 3-acetilglikozida i vitisina A u uzorcima Cabernet Sauvignon vina određena HPLC metodom (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzora k vina	Delphinidi n-3- acetilgluko zid	Cijanidin- 3- acetilgluko zid	Petunidin- 3- acetilgluko zid	Peonidin-3- acetilgluko zid	Malvidin- 3- acetilgluko zid	Ukupan sadržaj 3- acetilglukozi da	Sadržaj vitisina A +
CS1	12,15 $\pm$ 1,13	6,51 $\pm$ 1,54	9,25 $\pm$ 0,73	6,71 $\pm$ 1,07	58,12 $\pm$ 1,28	99,17 $\pm$ 1,63	/
CS2	10,88 $\pm$ 0,22	9,33 $\pm$ 0,65	9,33 $\pm$ 0,64	9,34 $\pm$ 1,34	97,32 $\pm$ 1,32	153,87 $\pm$ 0,53	19,48 $\pm$ 1, 02
CS3	16,96 $\pm$ 1,56	6,64 $\pm$ 0,67	8,57 $\pm$ 0,97	11,27 $\pm$ 1,43	46,20 $\pm$ 2,03	89,64 $\pm$ 1,10	/
CS4	61,43 $\pm$ 0,78	55,18 $\pm$ 0,55	21,13 $\pm$ 1,04	27,83 $\pm$ 1,10	202,27 $\pm$ 1,0 9	367,84 $\pm$ 2,14	29,51 $\pm$ 0, 23
CS5	5,95 $\pm$ 0,95	/	6,86 $\pm$ 0,35	/	32,35 $\pm$ 0,57	45,16 $\pm$ 0,34	10,24 $\pm$ 0, 49
CS6	26,71 $\pm$ 0,56	19,26 $\pm$ 0,78	17,13 $\pm$ 0,24	17,12 $\pm$ 0,75	30,03 $\pm$ 0,38	110,25 $\pm$ 0,23	17,38 $\pm$ 0, 18
CS7	22,48 $\pm$ 0,64	14,22 $\pm$ 0,71	15,39 $\pm$ 0,52	16,84 $\pm$ 0,66	88,57 $\pm$ 1,08	157,50 $\pm$ 1,42	18,92 $\pm$ 0, 27

**Table 35.** Koncentracije 3-p-kumaroilglikozidnih antocijana, malvidin-vinilfenilglukozida i ukupnih antocijana u vinima sorte Cabernet Sauvignon (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzor ak vina	Petunidin-3- p- kumaroilgluk ozid	Peonidin-3-p- kumaroilgluk ozid	Malvidin-3-p- kumaroilgluk ozid	Ukupan sadržaj 3-p- kumaroilgluko zida	Malvidin-3- vinilfenilgluk ozid	Ukupan sadržaj antocijan a
CS1	6,86 $\pm$ 1,42	6,81 $\pm$ 1,37	5,84 $\pm$ 0,76	26,15 $\pm$ 1,14	/	431,57 $\pm$ 0, 31
CS2	17,13 $\pm$ 1,25	29,01 $\pm$ 0,12	57,02 $\pm$ 0,45	101,08 $\pm$ 1,12	26,14 $\pm$ 1,26	364,30 $\pm$ 1, 12
CS3	18,03 $\pm$ 1,49	15,83 $\pm$ 1,84	37,28 $\pm$ 0,87	71,07 $\pm$ 1,21	/	5054,97 $\pm$ 0 ,85
CS4	54,01 $\pm$ 0,58	35,28 $\pm$ 0,28	75,82 $\pm$ 0,35	165,11 $\pm$ 0,89	32,01 $\pm$ 0,89	1463,43 $\pm$ 0 ,45
CS5	7,80 $\pm$ 1,08	/	13,29 $\pm$ 1,09	21,09 $\pm$ 0,12	/	205,57 $\pm$ 0, 55
CS6	30,03 $\pm$ 0,99	57,30 $\pm$ 0,88	43,83 $\pm$ 0,98	131,16 $\pm$ 2,00	49,18 $\pm$ 0,45	462,29 $\pm$ 0, 28
CS7	24,86 $\pm$ 0,74	22,41 $\pm$ 0,69	48,37 $\pm$ 0,82	95,64 $\pm$ 1,05	27,53 $\pm$ 0,63	680,02 $\pm$ 0, 77



**Slika 41.** HPLC hromatogram antocijanskih jedinjenja u vinu Cabernet Sauvignon Impresija (detekcija na 520 nm)

Udeo 3-glikozidnih antocijana u odnosu na ukupne antocijane u analiziranim vinima varirao je u širokom opsegu, od 9,89 % u uzorku CS2 (Vipava 1894, Slovenija) do 58,48 % u uzorku CS1 (Slovenska Istra). Slična varijabilnost zabeležena je i za 3-acetilglikozidne derivate, čiji je maksimalni udeo dostigao 26,09 % u vinu Cabernet Sauvignon Vipava 1894. Prisustvo 3-p-kumaroilglikozida takođe je pokazalo izražene razlike među uzorcima, sa najvećom vrednošću od 15,08 % u istom vinu iz Vipave 1894.

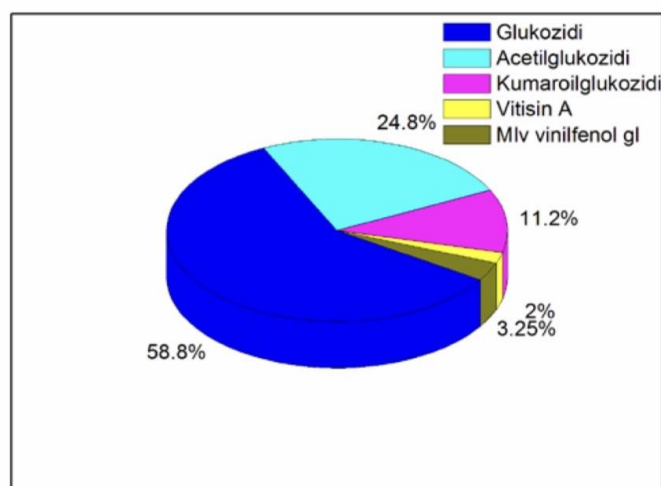
Kada se posmatra distribucija ukupnih malvidinovitih derivata, najviši procenat (73,04 %) utvrđen je u uzorku Cabernet Sauvignon Slovenska Istra, dok je najniža vrednost (40,76 %) zabeležena u vinu Cabernet Sauvignon Impresija iz berbe 2016. godine (Tabela 37).

Generalno posmatrano, derivate malvidina karakteriše sledeći redosled zastupljenosti u ispitivanim vinima: malvidin-3-glikozid (9,89–58,48 %) > malvidin-3-acetilglikozid (6,50–26,09 %) > malvidin-3-p-kumaroilglikozid-trans (1,36–15,08 %), što ukazuje na njihovu diferencijalnu distribuciju u zavisnosti od porekla i tipa uzorka.

Derivati malvidina su različito prisutni u ispitivanim Cabernet Sauvignon vinima i to: malvidin-3-glikozid (9,89–58,48 %) > malvidin-3-acetilglikozid (6,50–26,09 %) > malvidin-3-p-kumaroil-glikozid-trans (1,36-15,08 %).

**Tabela 36.** Relativni udeo malvidinovitih glikozida u ukupnom sadržaju antocijana u vinima sorte Cabernet Sauvignon (%)

Uzorak vina	Malvidin-3-O-glukozid (%)	Malvidin-3-O-acetilglukozid (%)	Malvidin-3-O-p-kumaroilglukozid (%)	Ukupan udeo malvidinovitih glikozida (%)
CS1	58,48	13,20	1,36	73,04
CS2	9,89	26,09	15,08	51,06
CS3	49,28	9,15	7,56	65,99
CS4	42,22	13,66	5,12	61,00
CS5	50,10	15,74	6,46	72,30
CS6	24,78	6,50	9,48	40,76
CS7	46,85	12,94	8,37	68,16



**Slika 42.** Distribucija antocijanskih derivata (3-glukozidi, 3-acetilglukozidi i 3-p-kumaroilglukozidi) u vinu Cabernet Sauvignon Impresija iz 2015. godine

Antocijani predstavljaju biološki značajna fenolna jedinjenja, te su u literaturi brojni radovi posvećeni njihovoj analizi u različitim vrstama crvenih vina (Mazza i Miniati, 1993; Wang i sar., 1997; Mazza i sar., 1999; De Galulejaci i sar., 1999; Meiers i sar., 2001; Lila, 2004; Munoz-Espada i sar., 2004; Jackson, 2008).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na to da ukupna koncentracija antocijana u ispitivanim uzorcima Cabernet Sauvignon vina pokazuje izraženu varijabilnost. Na ovu varijabilnost utiče više faktora, uključujući stepen zrelosti grožđa, tehnološke uslove proizvodnje, kao i procese čuvanja i starenja vina, te se ne može dovesti u direktnu vezu isključivo sa godinom berbe (Gil-Muñoz i sar., 2010).

## **5.8. POREĐENJE ANALIZIRANIH VINA IZ VINOGRADARSKO-VINARSKIH PODRUČJA SRBIJE I SLOVENIJE**

Fenolni sastav crvenih vina iz Srbije i Slovenije predstavljao je jedan od ključnih predmeta ovog istraživanja. Zbog toga su detaljno analizirani uzorci vina sorte Merlot, a dobijeni rezultati prikazani su u narednim poglavljima. Istraživanje je obuhvatilo 16 vina poznatog geografskog porekla, proizvedenih u periodu 2015–2016. godine, koja potiču iz različitih vinogradarsko-vinarskih oblasti i od više proizvođača. Pregled svih analiziranih uzoraka dat je u Tabeli 1 (Eksperimentalni deo) (Radovanović i sar., 2012a; Radovanović i sar., 2008; Radovanović i sar., 2012b).

### **5.8.1. Komparativna analiza Merlot vina iz Srbije i Slovenije**

U cilju detaljnijeg sagledavanja fenolnog sastava crvenih vina, analizirani su odabrani uzorci visokokvalitetnih jednosortnih vina proizvedenih od sorte Merlot. Istraživanjem je obuhvaćeno osam uzoraka vina sa jasno definisanim geografskim poreklom iz Srbije i Slovenije, proizvedenih tokom 2015. i 2016. godine. Među analiziranim uzorcima nalaze se vina proizvođača Mačkov podrum, Vipava 1894, Deželno vino PGO, Impresija, Belica, Goriška brda i Tribus Villa. Pregled svih ispitivanih uzoraka i njihovih osnovnih karakteristika dat je u Tabeli 1 (Eksperimentalni deo) (Radovanović i sar., 2008; Radovanović i sar., 2012a; Radovanović i sar., 2012b).

Analizirani uzorci obuhvatali su vina proizvedena u različitim vinogradarsko-vinarskim regionima Srbije i Slovenije, što je omogućilo poređenje njihovog fenolnog profila u odnosu na poreklo, proizvođača i godinu proizvodnje.

### **5.8.2. Karakterizacija fenolnog profila jednosortnih crvenih vina spektroskopskim pristupom**

Rezultati određivanja ukupnih fenola, estara vinske kiseline i ukupnih flavonola u analiziranim uzorcima vina prikazani su u Tabeli 38. Navedeni parametri određeni su primenom modifikovane Glories metode, prema postupku opisanom u literaturi (Mazza i sar., 1999; Radovanović i sar., 2012b; Radovanović i sar., 2012a). Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja praćen je merenjem apsorbancije na 280 nm, a rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline. Sadržaj estara vinske kiseline određivan je na talasnoj dužini od 320 nm i prikazan kao ekvivalent koncentracije kafene kiseline, dok su ukupni flavonoli mereni na 360 nm i izraženi kao ekvivalenti kvercetina. Kao i kod prethodno analiziranih jednosortnih vina, isti spektrofotometrijski pristup primenjen je za procenu ovih grupa fenolnih jedinjenja.

**Tabela 37.** Fenolni profil i osnovni fizičko-hemijski pokazatelji analiziranih Merlot vina

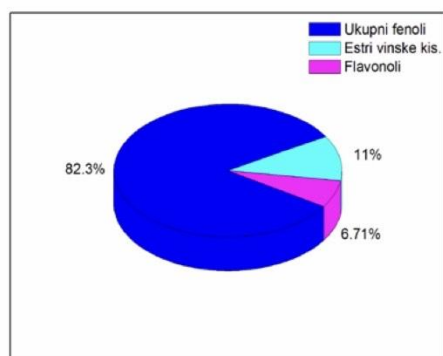
Uzorak vina	Sadržaj etanola (%)	Izmerena pH vrednost	Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (mg/L)	Koncentracija estara hidroksicimetnih kiselina (mg/L)	Ukupan sadržaj flavonolnih jedinjenja (mg/L)
M1	10,9	2,54	1526,02±2,01	176,53±1,52	106,60±1,47
M2	12,4	3,22	1541,62±2,36	194,82±1,18	126,69±1,35
M3	13,2	3,47	1486,28±0,14	196,79±0,47	97,25±0,68
M4	12,3	3,81	2025,13±0,64	381,51±0,64	193,47±0,32
M5	11,6	3,23	1628,10±1,71	246,42±0,43	95,18±0,36
M6	12,3	3,17	1514,60±1,25	244,16±0,79	90,59±0,58
M7	11,5	3,26	1468,12±0,19	198,87±0,38	96,15±0,75
M8	12,5	3,15	1505,71±2,55	195,66±1,17	116,39±1,27
M9	12,2	3,22	1588,45±1,37	212,94±0,76	108,63±0,88

Analizirana jednosortna crvena vina pokazala su blago kiselu reakciju, pri čemu se pH vrednosti kreću u opsegu od 2,54 u vinu Merlot – Mačkov podrum do 3,81 u uzorku Merlot – Impresija (berba 2015). Istovremeno, sadržaj etanola varira između 10,9 i 13,2% (v/v).

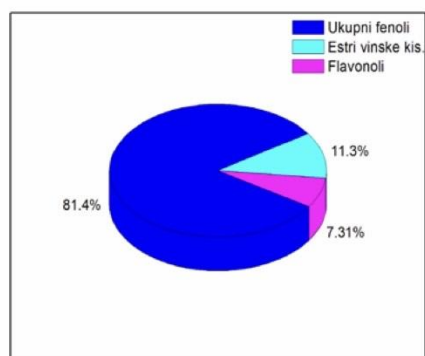
Rezultati spektroskopske analize ukazuju na izražene razlike u koncentracijama ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola među ispitivanim uzorcima. Najniže vrednosti svih analiziranih parametara zabeležene su u vinu Merlot – Belica (Slovenija), dok je najviši sadržaj utvrđen u uzorku Merlot – Impresija (2015, Srbija). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima i literaturnim podacima za slične tipove vina (Singleton i Rossi, 1965; Simonetti i sar., 1997; Piljac i sar., 2005; Lachman i sar., 2007; Cliff i sar., 2007; Stratil i sar., 2008).

Poređenjem vina poreklom iz Srbije i Slovenije uočava se da uzorak Merlot – Impresija (2015, Srbija) pokazuje veće vrednosti analiziranih parametara, i to za 17% u slučaju ukupnih fenola, 9,72% za estere vinske kiseline i 15,50% za flavonole.

Međutim, i pored razlika u apsolutnim vrednostima, relativni udeo pojedinih grupa fenolnih jedinjenja bio je vrlo sličan kod svih ispitivanih uzoraka, nezavisno od porekla grožđa. Ukupnim fenolima pripadalo je 79,6–83,3%, estrima vinske kiseline 10,6–13,7%, dok je udeo flavonola iznosio 4,66–7,31%. Grafički prikaz ovih odnosa dat je u narednim dijagramima.

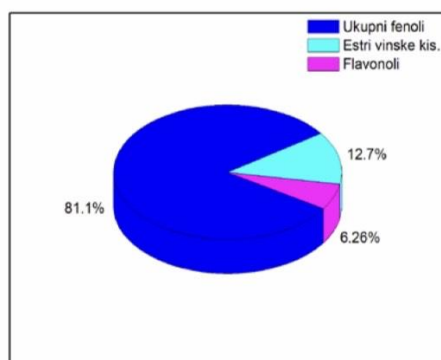


A)

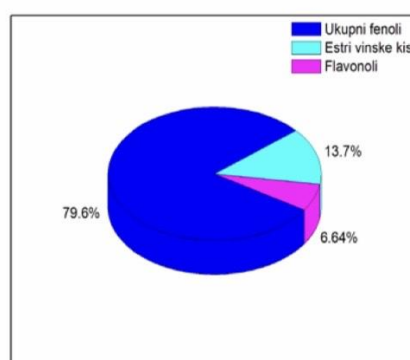


B)

**Slika 43.** Grafički prikaz relativnog učešća ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinima Merlot – Impresija (2015 i 2016)

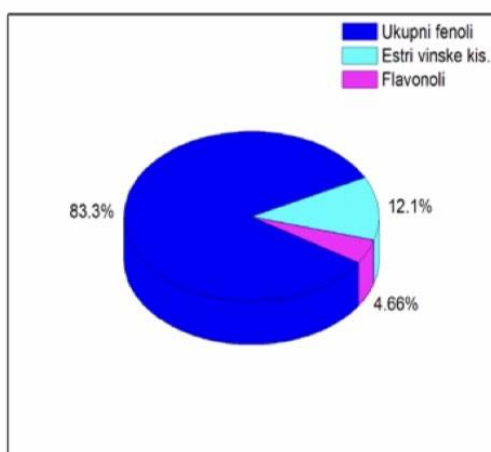


A)

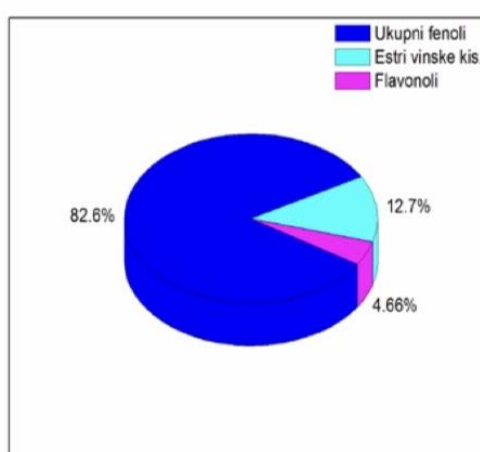


B)

**Slika 44.** Grafički prikaz relativnog učešća ukupnih fenola, estara vinske kiseline i flavonola u vinima Merlot – Vipava 1894 i Merlot – Deželno vino



A)



B)

**Slika 45.** Udeo fenolnih grupa određenih spektroskopskom analizom u vinima Merlot-Vipava 1894 i Merlot-Deželno vino PGO

### 5.8.3. HPLC karakterizacija neflavonoidnog fenolnog sastava u jednosortnim crvenim vinima

U ovom poglavlju izvršena je identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u odabranim uzorcima jednosortnih crvenih vina, na način sličan prethodno analiziranim vinima istog tipa. Dobijeni rezultati omogućavaju poređenje koncentracionih vrednosti fenolnih jedinjenja sa njihovim antioksidativnim delovanjem u ispitivanim vinima.

### 5.8.4. HPLC karakterizacija fenolnih kiselina u jednosortnim crvenim vinim

U okviru analize odabranih crvenih vina, kao i kod prethodno ispitivanih uzoraka, sprovedena je identifikacija i kvantifikacija deset fenolnih kiselina zajedno sa trans-resveratrolom. Postupak identifikacije zasnivao se na upoređivanju retencionih vremena i apsorpcionih maksimuma sa odgovarajućim standardnim jedinjenjima, kako je detaljno opisano u eksperimentalnom delu rada.

U Tabeli 39 prikazani su rezultati određivanja koncentracija najznačajnijih hidroksibenzoevih kiselina u uzorcima jednosortnih crvenih vina. Među njima su galna, vanilinska i siringinska kiselina, pri čemu su merenja izvedena na talasnoj dužini od 280 nm.

**Tabela 38.** Koncentracije hidroksibenzoevih kiselina u odabranim jednosortnim vinima određene na 280 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak vina	Galna kiselina (mg/L)	Vanilinska kiselina (mg/L)	Siringinska kiselina (mg/L)	Elaginska kiselina (mg/L)	Ukupan sadržaj hidroksibenzoevih kiselina (mg/L)
M1	59,04 $\pm$ 0,13	/	1,57 $\pm$ 0,10	3,88 $\pm$ 0,82	64,39 $\pm$ 1,23
M2	87,31 $\pm$ 0,35	/	/	/	86,63 $\pm$ 1,18
M3	55,93 $\pm$ 0,92	1,12 $\pm$ 0,03	2,97 $\pm$ 0,13	9,17 $\pm$ 0,37	69,67 $\pm$ 1,32
M4	95,17 $\pm$ 0,68	1,09 $\pm$ 0,83	11,32 $\pm$ 0,24	13,93 $\pm$ 0,51	110,30 $\pm$ 1,46
M5	53,86 $\pm$ 0,84	1,17 $\pm$ 1,12	1,37 $\pm$ 1,20	5,14 $\pm$ 1,17	61,37 $\pm$ 1,19
M6	48,02 $\pm$ 0,23	0,11 $\pm$ 1,19	5,46 $\pm$ 1,12	12,76 $\pm$ 1,32	65,43 $\pm$ 1,14
M7	55,50 $\pm$ 0,68	1,00 $\pm$ 0,04	2,45 $\pm$ 0,05	9,03 $\pm$ 0,76	67,66 $\pm$ 1,25
M8	76,72 $\pm$ 0,20	/	/	/	83,70 $\pm$ 1,10
M9	69,84 $\pm$ 0,27	1,04 $\pm$ 0,18	3,68 $\pm$ 0,22	10,92 $\pm$ 0,35	85,76 $\pm$ 1,19

U ispitivanim uzorcima jednosortnih crvenih vina određivane su koncentracije najznačajnijih hidroksicimetnih kiselina, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 40. Analiza je obuhvatila trans-kaftarnu, trans-kutarnu, hlorogenu, kafenu, p-kumarnu i ferulnu kiselinu. Kvantifikacija navedenih jedinjenja izvršena je spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 320 nm.

**Table 39.** Koncentracije hidroksicimetnih kiselina u odabranim jednosortnim crvenim vinima određene na 320 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak vina	trans-kaftarna kiselina (mg/L)	trans-kutarna kiselina (mg/L)	Kafena kiselina (mg/L)	Hlorogena kiselina (mg/L)	p-kumarna kiselina (mg/L)	Ferulna kiselina (mg/L)	Ukupan sadržaj hidroksicimetnih kiselina (mg/L)
M1	9,40 $\pm$ 0,13	4,58 $\pm$ 0,14	2,77 $\pm$ 0,18	/	4,31 $\pm$ 0,43	0,85 $\pm$ 0,43	21,46 $\pm$ 1,28
M2	2,74 $\pm$ 0,15	3,72 $\pm$ 0,12	2,37 $\pm$ 0,19	/	1,57 $\pm$ 0,42	1,11 $\pm$ 0,21	11,09 $\pm$ 1,25
M3	12,86 $\pm$ 0,62	2,57 $\pm$ 0,18	2,36 $\pm$ 0,18	/	2,87 $\pm$ 0,47	0,95 $\pm$ 0,29	20,90 $\pm$ 1,38
M4	18,56 $\pm$ 0,28	3,78 $\pm$ 0,91	6,74 $\pm$ 0,13	4,25 $\pm$ 0,62	3,75 $\pm$ 0,66	5,75 $\pm$ 0,62	42,89 $\pm$ 1,16
M5	28,06 $\pm$ 0,34	9,88 $\pm$ 0,47	4,56 $\pm$ 0,70	/	4,34 $\pm$ 1,28	0,45 $\pm$ 0,61	47,25 $\pm$ 1,55
M6	39,16 $\pm$ 0,53	9,27 $\pm$ 0,13	5,76 $\pm$ 0,18	1,43 $\pm$ 1,28	4,24 $\pm$ 0,19	1,62 $\pm$ 0,33	61,45 $\pm$ 1,3
M7	8,56 $\pm$ 0,25	3,55 $\pm$ 0,14	2,68 $\pm$ 0,08	/	2,34 $\pm$ 0,47	1,60 $\pm$ 0,50	25,99 $\pm$ 1,15
M8	10,02 $\pm$ 0,12	4,03 $\pm$ 0,12	2,72 $\pm$ 0,15	2,98 $\pm$ 1,15	3,28 $\pm$ 0,57	1,99 $\pm$ 0,15	13,49 $\pm$ 1,17
M9	14,37 $\pm$ 0,28	5,18 $\pm$ 0,16	3,42 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,64	3,96 $\pm$ 0,22	1,08 $\pm$ 0,17	29,77 $\pm$ 1,21

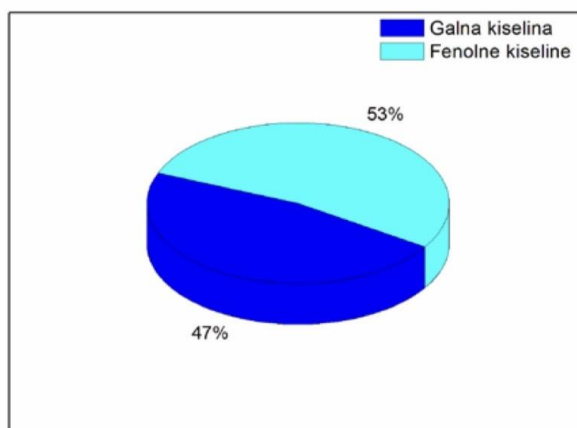
Na osnovu dobijenih rezultata uočavaju se razlike u koncentracijama hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina između vina proizvedenih od iste sorte grožđa, ali iz različitih vinogradarskih područja Srbije i Slovenije.

Podaci prikazani u Tabeli 40 ukazuju na procentualno učešće galne kiseline, kao i ukupnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u analiziranim uzorcima jednosortnih vina. U tom kontekstu, galna kiselina se izdvaja kao najzastupljenija pojedinačna fenolna kiselina, sa udelom koji varira od 38,02 % u vinu Merlot – Belica do 89,91 % u vinu Merlot – Vipava 1894.

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da distribucija fenolnih kiselina u crvenim vinima nije uslovljena isključivo sortom grožđa, već je pod značajnim uticajem geografskog porekla, klimatskih uslova, kao i tehnoloških faktora proizvodnje i čuvanja, koji zajedno oblikuju konačan fenolni profil vina.

**Tabela 40.** Ukupne fenolne kiseline i relativni udeo galne, hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u analiziranim uzorcima vina (%)

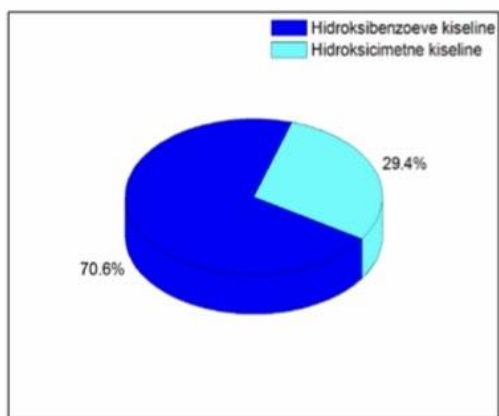
Uzorak vina	Ukupan sadržaj fenolnih kiselina (mg/L)	Udeo galne kiseline (%)	Udeo hidroksibenzoevih kiselina (%)	Udeo hidroksicimetnih kiselina (%)
M1	85,72±1,19	69,02	75,13	25,06
M2	97,83±1,20	89,91	89,02	11,61
M3	91,62±1,19	63,95	76,93	23,07
M4	153,12±1,21	62,57	77,06	23,54
M5	108,68±1,19	49,75	55,98	44,12
M6	126,87 ±1,17	38,02	52,18	48,62
M7	95,61±1,18	80,75	81,50	15,55
M8	107,15±1,18	46,48	50,32	39,68
M9	118,42±1,18	58,36	63,14	36,86



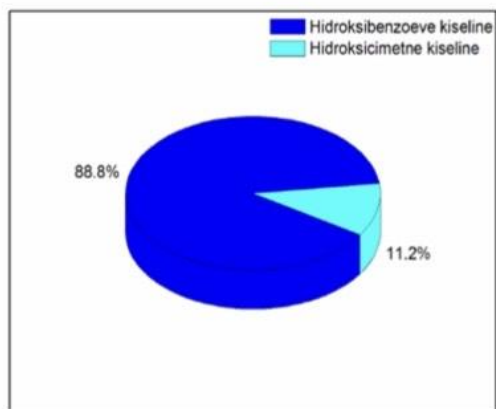
**Slika 46.** Grafički prikaz relativnog učešća galne kiseline u ukupnim fenolnim kiselinama u vinu Merlot – Vipava 1894

Takođe, uočeno je da vino Merlot – Vipava 1894 (Slovenija) pokazuje višu koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina u odnosu na vino Merlot – Belica, i to za 12,34 %.

U nastavku su prikazani grafički odnosi hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u ispitivanim uzorcima crvenih vina.

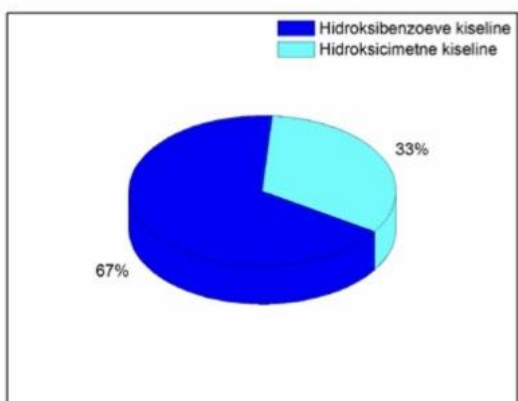


A)

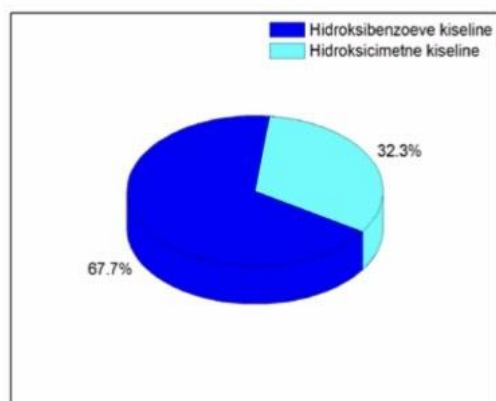


B)

**Slika 47.** Grafički prikaz relativnog učešća hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima Merlot – Belica (A) i Merlot – Vipava 1894 (B)

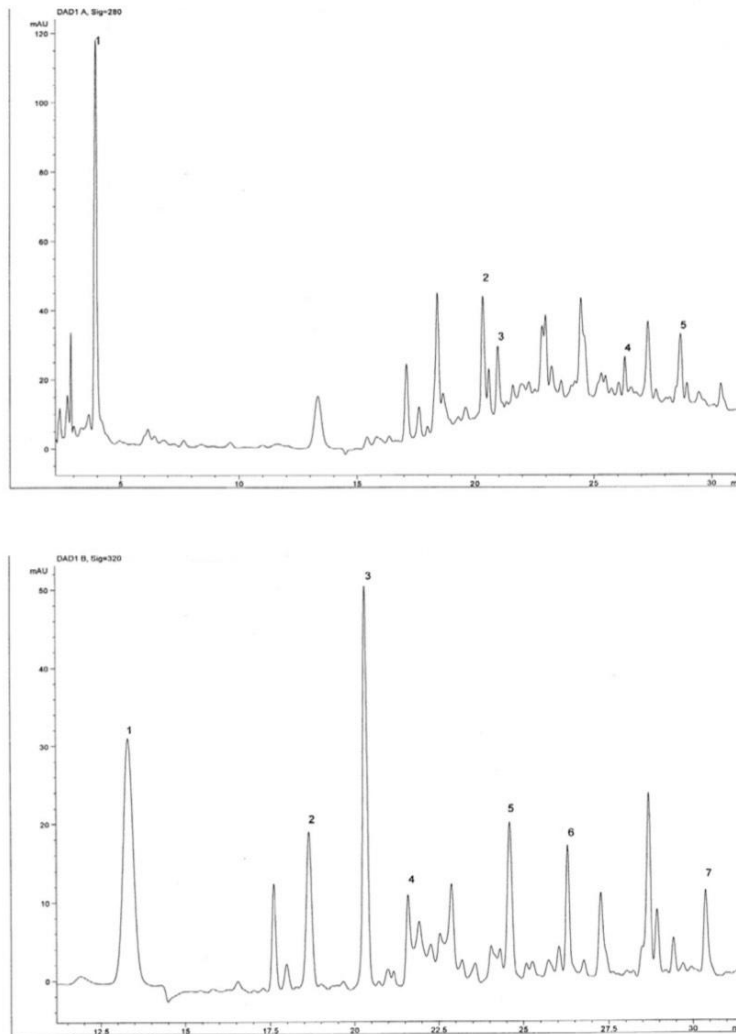


A)



B)

**Slika 48.** Grafički prikaz relativnog učešća hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina u uzorcima Merlot – Impresija (A) i Merlot – Vipava 1894 (B)



**Slika 49.** HPLC hromatogrami fenolnih kiselina u vinu Merlot – Vipava 1894 pri 280 i 320 nm

### 5.8.5. HPLC karakterizacija sadržaja *trans*-resveratrola u jednosortnih crvenim vinima

Rezultati određivanja sadržaja ovog biološki značajnog jedinjenja prikazani su u Tabeli 41. Koncentracije su izračunate primenom odgovarajuće kalibracione jednačine, dok su merenja zasnovana na apsorpciji registrovanoj pri talasnoj dužini od 320 nm.

**Tabela 41.** Koncentracija trans-resveratrola u odabranim uzorcima jednosortnih crvenih vina određena na 320 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

<b>Uzorak vina</b>	<b>Koncentracija trans-resveratrol (mg/L)</b>
M1	0,59 $\pm$ 0,07
M2	0,63 $\pm$ 0,03
M3	1,19 $\pm$ 0,08
M4	2,53 $\pm$ 0,04
M5	0,68 $\pm$ 0,13
M6	0,65 $\pm$ 0,17
M7	0,78 $\pm$ 0,05
M8	0,82 $\pm$ 0,09
M9	1,14 $\pm$ 0,08

Dobijeni rezultati ukazuju da se koncentracija trans-resveratrola u analiziranim uzorcima jednosortnih vina kretala od 0,59 mg/L Koliko je određeno u vinu Merlot-Mačkov podrum, do 2,53 mg/L, izmerenih u vinu Merlot-Impresija:

#### **5.8.6. Karakterizacija flavonoidnog sastava jednosortnih crvenih vina primenom HPLC metode**

##### **5.8.5.1. Karakterizacija flavan-3-olnog sastava jednosortnih crvenih vina**

Rezultati kvantifikacije najzastupljenijih flavan-3-olnih jedinjenja u analiziranim uzorcima vina prikazani su u Tabeli 43. Analiza je obuhvatila (+)-katehin, procijanidin B2 [(-)-epikatehin-(4 $\beta$ →8)-(-)-epikatehin], (-)-epikatehin i (-)-epigalokatehin-galat, pri čemu je detekcija izvršena primenom fluorescentnog detektora.

Dobijeni rezultati ukazuju na značajne razlike u sadržaju flavan-3-ola između ispitivanih vina. Ukupna koncentracija ovih jedinjenja kretala se u rasponu od 30,06 do 132,20 mg/L. Najniži sadržaj zabeležen je u vinu Merlot – Vipava 1894, dok je najveća ukupna koncentracija flavan-3-ola određena u uzorku Merlot – Impresija.

**Tabela 42.** Koncentracije flavan-3-olnih jedinjenja u jednosortnim crvenim vinima određene pri 275/322 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

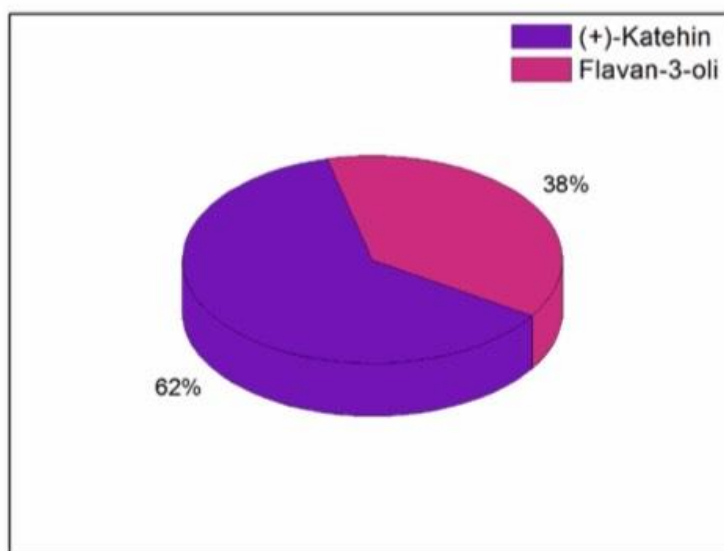
Uzorak vina	Sadržaj (+)-katehina (mg/L)	Koncentracija procijanidina B2 (mg/L)	Sadržaj (-)-epikatehina (mg/L)	Koncentracija (-)-epigalokatehin-galata (mg/L)	Ukupan sadržaj flavan-3-olnih jedinjenja (mg/L)
M1	31,76 $\pm$ 0,63	28,47 $\pm$ 0,95	15,97 $\pm$ 0,42	21,76 $\pm$ 0,80	98,09 $\pm$ 0,20
M2	15,79 $\pm$ 0,14	/	14,60 $\pm$ 0,41	/	30,16 $\pm$ 0,23
M3	29,58 $\pm$ 0,26	38,29 $\pm$ 0,56	35,69 $\pm$ 0,75	12,69 $\pm$ 0,46	116,76 $\pm$ 0,43
M4	30,01 $\pm$ 0,13	41,21 $\pm$ 0,82	41,24 $\pm$ 0,82	20,24 $\pm$ 0,27	131,10 $\pm$ 0,35
M5	35,58 $\pm$ 0,84	15,73 $\pm$ 1,15	14,42 $\pm$ 0,87	4,53 $\pm$ 1,21	71,23 $\pm$ 0,23
M6	24,18 $\pm$ 0,17	8,62 $\pm$ 0,35	20,09 $\pm$ 0,30	4,90 $\pm$ 1,27	47,10 $\pm$ 0,27
M7	25,69 $\pm$ 0,15	27,67 $\pm$ 0,55	33,48 $\pm$ 0,45	20,76 $\pm$ 0,80	40,08 $\pm$ 0,16
M8	30,46 $\pm$ 0,27	/	18,80 $\pm$ 0,35	15,50 $\pm$ 0,64	38,06 $\pm$ 0,18
M9	33,12 $\pm$ 0,22	29,45 $\pm$ 0,63	24,18 $\pm$ 0,41	13,76 $\pm$ 0,58	100,51 $\pm$ 0,21

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 43 može se uočiti da je (+)-katehin najzastupljeniji flavan-3-ol u analiziranim uzorcima vina. Najviša koncentracija ovog jedinjenja, 35,58 mg/L, određena je u vinu Merlot – Impresija.

**Tabela 43.** Procentualni udeo (+)-katehina u ispitivanim jednosortnim vinima

Uzorak vina	Udeo (+)-Katehina (%)
M1	33,41
M2	53,02
M3	26,30
M4	21,87
M5	52,24
M6	63,10
M7	36,87
M8	41,50
M9	44,18

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je (+)-katehin u procentualnom smislu najzastupljeniji u vinu Merlot – Belica, dok je njegova najniža relativna zastupljenost utvrđena u vinu Merlot – Impresija. Grafički prikaz ovog odnosa dat je na narednoj slici.



**Slika 50.** Grafički prikaz relativnog odnosa (+)-katehina u odnosu na ukupne flavan-3-ole u vinu Merlot – Belica

#### **5.8.5.2. Profil flavonola, flavona i flavanona u uzorcima jednosortnih crvenih vina, flavoni i flavanoni u jednosortnim crvenim vinima**

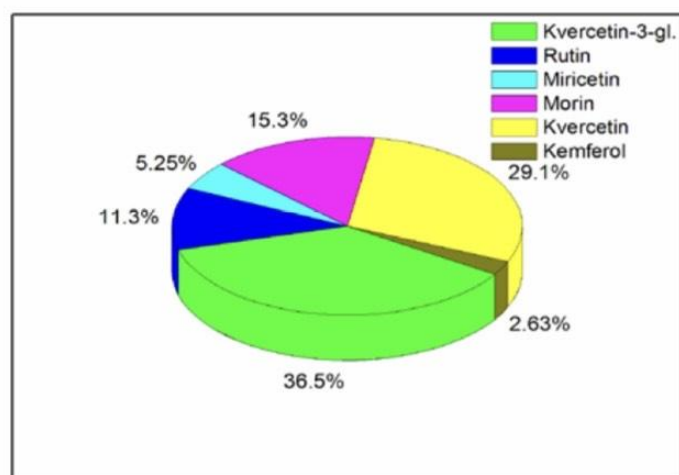
U Tabeli 44 prikazane su koncentracije najzastupljenijih flavonola i flavonol-aglikona u ispitivanim jednosortnim vinima, uključujući kvercetin-3-glikozid, rutin (kvercetin-3-O-rutinozid), miricetin, morin, kvercetin i kemferol. Sva jedinjenja su određena pri talasnoj dužini od 360 nm, primenom odgovarajućih standardnih jednačina, kako je opisano u eksperimentalnom delu rada.

Dobijeni rezultati pokazuju izražene razlike u koncentracijama između analiziranih uzoraka. Ukupan sadržaj flavonola kretao se u rasponu od 4,60 mg/L u vinu Merlot – Belica do 60,08 mg/L u vinu Merlot – Impresija.

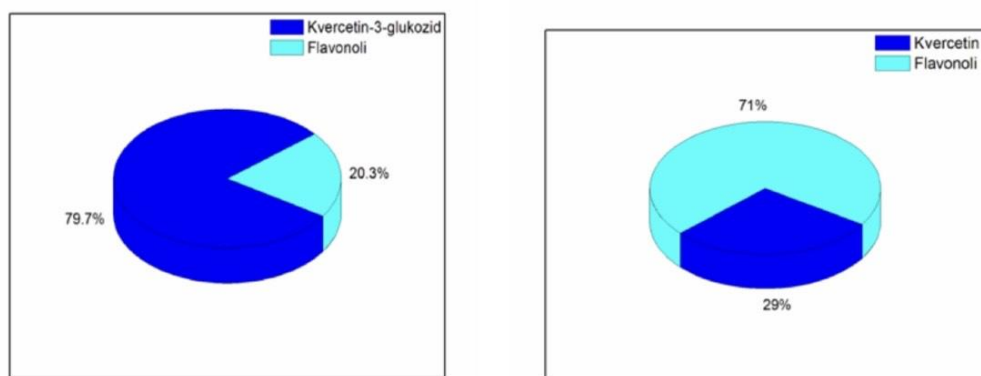
**Tabela 44.** Koncentracija flavonola u jednosortnim crvenim vinima određena na 360 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak vina	Kvercetin-3-glukozid (mg/L)	Rutin (mg/L)	Miricetin (mg/L)	Morin (mg/L)	Kvercetin (mg/L)	Kemferol (mg/L)	Ukupan sadržaj flavonola (mg/L)
M1	5,42 $\pm$ 0,28	4,09 $\pm$ 0,15	0,85 $\pm$ 0,33	1,30 $\pm$ 0,31	3,06 $\pm$ 0,52	/	15,13 $\pm$ 0,14
M2	8,03 $\pm$ 0,14	3,82 $\pm$ 0,71	0,69 $\pm$ 0,19	8,76 $\pm$ 0,43	7,52 $\pm$ 0,18	/	28,02 $\pm$ 0,60
M3	7,96 $\pm$ 0,32	7,02 $\pm$ 0,55	1,65 $\pm$ 0,27	3,01 $\pm$ 0,14	1,70 $\pm$ 0,36	1,42 $\pm$ 0,62	21,70 $\pm$ 0,42
M4	18,07 $\pm$ 0,43	12,75 $\pm$ 0,62	3,08 $\pm$ 0,14	8,65 $\pm$ 0,73	16,10 $\pm$ 0,82	1,54 $\pm$ 0,72	60,08 $\pm$ 0,53
M5	2,53 $\pm$ 0,35	0,04 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 1,28	1,86 $\pm$ 0,68	0,51 $\pm$ 0,68	/	4,60 $\pm$ 0,05
M6	4,65 $\pm$ 0,89	0,03 $\pm$ 0,07	/	0,02 $\pm$ 0,31	1,35 $\pm$ 0,58	/	5,33 $\pm$ 0,22
M7	6,88 $\pm$ 0,12	2,97 $\pm$ 0,60	0,96 $\pm$ 0,08	7,25 $\pm$ 0,92	6,72 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,72	23,22 $\pm$ 0,50
M8	7,62 $\pm$ 0,16	3,62 $\pm$ 0,70	0,62 $\pm$ 0,07	6,96 $\pm$ 0,82	5,06 $\pm$ 0,15	1,39 $\pm$ 0,72	17,82 $\pm$ 0,45
M9	9,44 $\pm$ 0,26	4,18 $\pm$ 0,22	1,12 $\pm$ 0,09	3,84 $\pm$ 0,37	4,26 $\pm$ 0,31	0,88 $\pm$ 0,14	23,72 $\pm$ 0,48

Među analiziranim flavonolima, najveći doprinos ukupnom sadržaju imaju kvercetin-3-glukozid i kvercetin. Najviše koncentracije ovih jedinjenja utvrđene su u Merlot vinu iz Tikveša, i to 18,07 mg/L za kvercetin-3-glukozid i 16,10 mg/L za kvercetin. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za slične tipove vina (Kallithraka i sar., 2006; Jeffery i sar., 2008; Arnous i sar., 2002; Braicu i sar., 2011; Anli i Vural, 2009; McDonald i sar., 1998; Pour Nikfardjam i sar., 2006).



**Slika 51.** Grafički prikaz relativnog učešća određenih flavonola u Merlot vinu Impresija pri 360 nm



**Slika 52.** Grafički prikaz relativnog prisustva kvercetin-3-glikozida u vinu Impresija (A) i kvercetina u vinu Belica (B) u odnosu na ukupne flavo

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 45 uočava se da se procentualno učešće kvercetina i kvercetin-3-glikozida razlikuje u zavisnosti od sorte grožđa i tipa vina. Najviše vrednosti za kvercetin-3-glikozid zabeležene su u vinu Merlot – Impresija (2016), gde iznose 78,59 %, dok je najveće relativno učešće kvercetina utvrđeno u vinu Merlot – Impresija (2015), sa 30,08%.

**Tabela 45.** Procentualni udeo kvercetin-3-glikozida i kvercetina u ukupnim flavonolima u ispitivanim jednosortnim vinima

Uzorak	Udeo kvercetin-3-glikozida (%)	Udeo kvercetina (%)	Ukupan udeo flavonola (%)
M1	38,62	21,09	53,21
M2	29,09	24,82	35,01
M3	35,24	7,61	43,55
M4	37,08	30,08	65,53
M5	44,13	11,07	53,62
M6	78,59	20,10	98,74
M7	32,87	24,77	35,65
M8	35,50	21,32	40,13
M9	39,79	17,96	57,75

U Tabeli 46 prikazane su koncentracije identifikovanih flavona (luteolina i apigenina) i flavanona (naringina), dobijene primenom DAD detekcije na 360 nm. Pored toga, dati su i ukupni sadržaji flavonoida u ispitivanim jednosortnim crvenim vinima, određeni kombinacijom DAD detektora na 360 nm i fluorescentne detekcije na 322/275 nm ( $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ ).

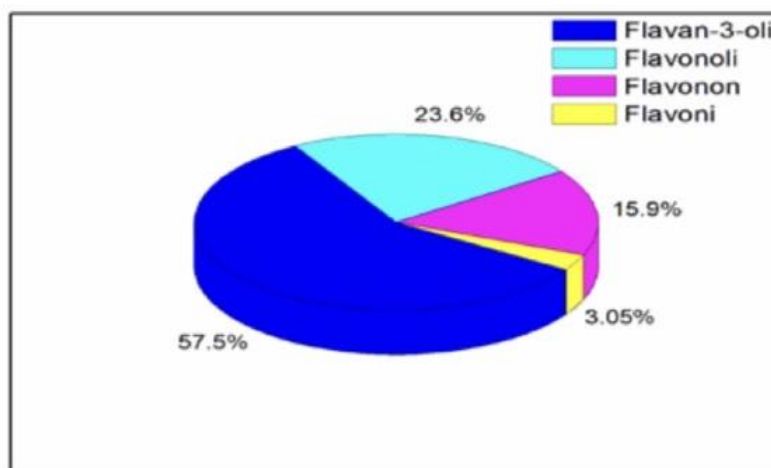
**Tabela 46.** Koncentracije flavona i flavanona, kao i ukupnih flavonoida u jednosortnim crvenim vinima (mg/L  $\pm$  SD, n = 3)

Uzorak vina	Koncentracija luteolina (mg/L, 360 nm)	Koncentracija apigenina (mg/L, 360 nm)	Koncentracija naringin (mg/L, 280 nm)	Ukupni sadržaj flavonoida (mg/L)
M1	/	/	0,80 $\pm$ 0,12	113,95 $\pm$ 0,13
M2	3,21 $\pm$ 0,42	0,53 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,10	63,03 $\pm$ 0,81
M3	/	1,04 $\pm$ 0,62	0,92 $\pm$ 0,04	139,04 $\pm$ 0,52
M4	6,08 $\pm$ 0,62	1,29 $\pm$ 0,32	1,30 $\pm$ 0,22	201,16 $\pm$ 0,29
M5	/	/	0,99 $\pm$ 0,15	76,01 $\pm$ 0,71
M6	/	0,39 $\pm$ 1,28	0,97 $\pm$ 0,39	54,88 $\pm$ 0,42
M7	/	0,53 $\pm$ 0,08	0,92 $\pm$ 0,08	73,04 $\pm$ 0,61
M8	4,08 $\pm$ 0,52	0,64 $\pm$ 0,12	0,89 $\pm$ 0,07	68,05 $\pm$ 0,41
M9	2,46 $\pm$ 0,18	0,58 $\pm$ 0,10	0,94 $\pm$ 0,08	120,37 $\pm$ 0,36

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da luteolin i apigenin nisu prisutni u značajnim koncentracijama u analiziranim uzorcima crvenih vina. Najviša koncentracija flavona (6,97 mg/L) i flavanona naringina (36,29 mg/L) utvrđena je u vinu Merlot – Impresija.

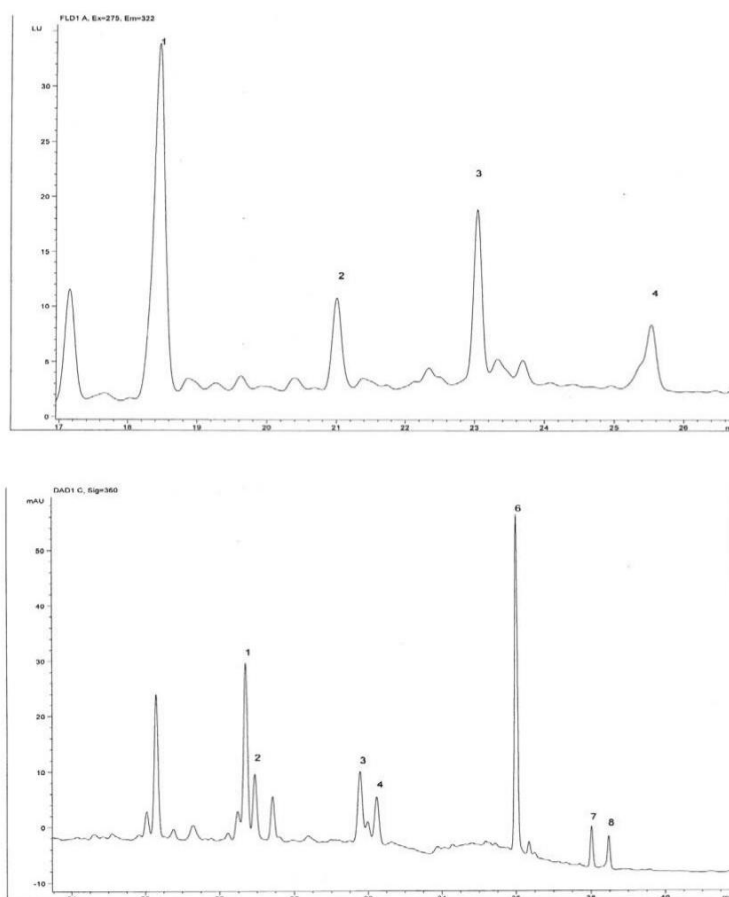
Ukupan sadržaj flavonoida pokazuje izraženu varijabilnost i kreće se u opsegu od 54,88 mg/L u vinu Merlot – Impresija (2016) do 201,16 mg/L u vinu Merlot – Impresija (2015). Pored toga, visoke vrednosti (>100 mg/L) zabeležene su i u vinima Merlot – Deželno vino PGO (139,04 mg/L) i Merlot – Mačkov podrum (113,95 mg/L).

Na Slici 53 prikazan je procentualni odnos flavonoida detektovanih DAD detektorom na 360 nm, kao i fluorescentnim detektorom na 275/322 nm, u vinu Merlot – Impresija.



**Slika 53.** Grafički prikaz relativnog prisustva flavonoida (flavan-3-ola, flavonola, flavona i flavanona) u vinu Merlot – Impresija

Poređenjem istih vina poreklom iz različitih vinogradarskih područja Srbije i Slovenije, poput vina Merlot – Impresija (Srbija) i Merlot – Vipava 1894 (Slovenija), uočavaju se razlike u koncentraciji flavonoida. Naime, vino Merlot – Impresija pokazuje više vrednosti flavonoida za 17,50 % u odnosu na vino Merlot – Vipava 1894.



**Slika 54.** HPLC hromatogrami flavan-3-ola ( $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 322/275$  nm) i flavonola, flavona i flavanona (360 nm) u vinu Merlot – Impresija

### 5.8.7. Karakterizacija antocijanskog profila odabranih jednosortnih vina primenom HPLC metode

Pregled sadržaja pojedinačnih antocijanskih jedinjenja registrovanih na 520 nm dat je u Tabeli 47, zajedno sa njihovim koncentracionim vrednostima u analiziranim uzorcima.

**Table 47.** Koncentracioni profil antocijanskih glikozida u jednosortnim crvenim vinima određen na 520 nm (mg/L  $\pm$  SD, n = 3).

Antocijanska jedinjenja	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Dp-3-gl	/	/	23,37 $\pm$ 0,02	19,59 $\pm$ 0,08	/	8,09 $\pm$ 1, 18	/	7,09 $\pm$ 1, 12	12,84 $\pm$ 0,18
Cy-3-gl	/	/	11,17 $\pm$ 0,09	6,20 $\pm$ 0, 52	/	/	/	/	5,96 $\pm$ 0, 11
Pt-3-gl	/	/	32,44 $\pm$ 0,11	22,74 $\pm$ 0,65	/	/	/	/	24,37 $\pm$ 0,22
Pn-3-gl	/	/	75,83 $\pm$ 0,72	17,44 $\pm$ 0,32	/	11,01 $\pm$ 1,13	15,03 $\pm$ 1,16	18,03 $\pm$ 1,15	21,45 $\pm$ 0,27
Mv-3-gl	21,86 $\pm$ 0,72	157,12 $\pm$ 0,72	228,99 $\pm$ 0,52	133,06 $\pm$ 0,78	7,66 $\pm$ 1 ,18	90,09 $\pm$ 1,23	71,05 $\pm$ 1,09	112,04 $\pm$ 1,60	146,28 $\pm$ 0,64
Dp-3-acetgl	/	/	14,55 $\pm$ 0,09	8,77 $\pm$ 0, 52	/	/	/	/	6,72 $\pm$ 0, 09
Cy-3-acetgl	/	/	13,60 $\pm$ 0,22	9,98 $\pm$ 0, 76	/	/	/	/	7,18 $\pm$ 0, 14
Pt-3-acetgl	/	/	20,01 $\pm$ 0,24	9,03 $\pm$ 0, 35	/	/	/	/	10,26 $\pm$ 0,16
Pn-3-acetgl	/	/	23,34 $\pm$ 0,35	8,50 $\pm$ 0, 07	/	/	/	/	9,74 $\pm$ 0, 12
Mv-3-acetgl	/	39,81 $\pm$ 0,72	48,42 $\pm$ 0,72	41,49 $\pm$ 0,09	/	6,31 $\pm$ 1, 31	8,51 $\pm$ 1, 01	24,37 $\pm$ 1,65	36,55 $\pm$ 0,58

Antocijanska jedinjenja	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Vitisin A	4,34±0,72	29,35±0,72	14,72±0,65	20,02±0,45	/	21,01±1,19	15,06±1,12	31,56±1,20	18,44±0,33
Pt-3-p-kumgl	/	31,17±0,72	32,51±0,71	55,82±0,17	/	/	/	/	28,63±0,41
Pn-3-p-kumgl	/	28,54±0,72	22,34±0,32	35,77±0,12	/	/	/	/	24,11±0,36
Mv-3-kumgl	/	38,75±0,72	28,51±0,02	53,93±0,05	/	/	/	/	41,92±0,55
Mv-3-vinylfenolgl	/	29,05±0,72	17,31±0,09	10,07±0,08	4,29±1,18	13,57±1,25	28,77±1,15	19,70±1,40	22,37±0,48
Ukupni 3-gl	21,86±0,72	157,12±0,72	371,80±0,52	189,03±0,13	7,61±1,18	109,19±1,34	109,19±1,34	109,19±1,34	210,90±0,77
Ukupni 3-acetilgl	/	39,81±0,72	119,92±0,70	77,77±0,71	/	6,31±1,11	8,10±1,79	10,78±1,76	70,45±0,69
Ukupni 3-pkumaroilgl	/	96,46±0,72	83,36±0,72	166,01±0,72	/	13,27±1,18	53,66±1,15	64,20±1,80	94,66±0,73
Ukupni antocijani	26,20±0,72	351,32±0,72	607,42±0,72	462,90±0,72	11,95±0,72	163,27±0,72	204,50±0,52	430,07±1,65	394,45±0,92

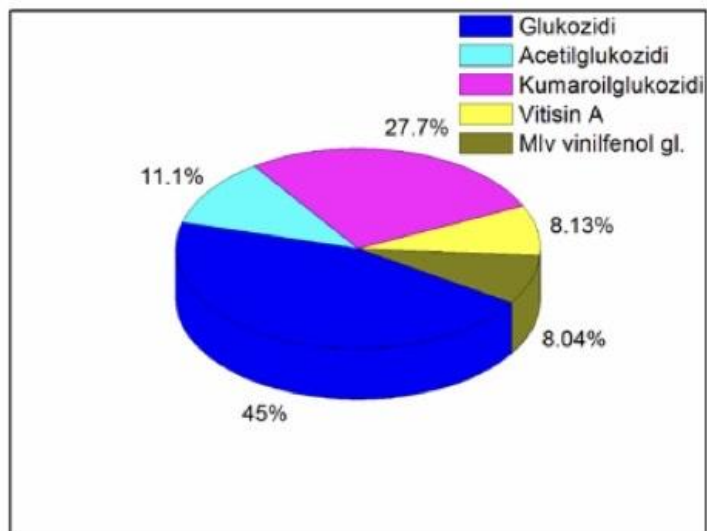
Rezultati određivanja antocijana ukazuju na izraženu varijabilnost njihovog sastava među analiziranim jednosortnim vinima. Uočeno je da su derivati kumaroilglikozida zastupljeniji u vinima Merlot – Mačkov podrum i Vipava 1894 u poređenju sa vinima Goriška Brda i Tribus Villa.

Ukupan sadržaj antocijana pokazao je veoma širok raspon vrednosti, krećući se od 11,95 mg/L u uzorku Merlot – Impresija do 607,42 mg/L u uzorku Deželno vino PGO. Ovakve razlike ukazuju na značajnu heterogenost antocijanskog profila među ispitivanim vinima.

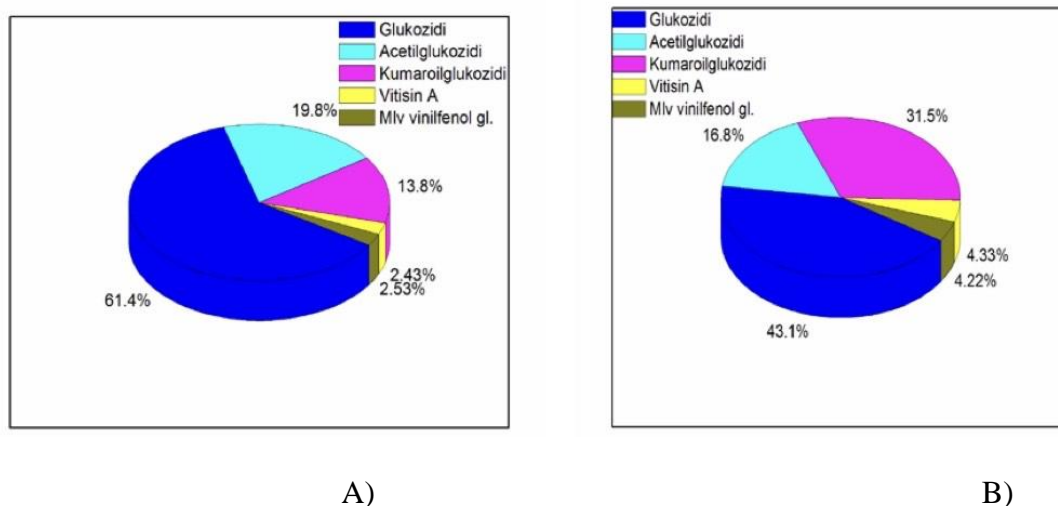
Varijacije su zabeležene i između vina iste sorte. Tako je u uzorku Deželno vino PGO utvrđena veća koncentracija ukupnih antocijana u odnosu na vino Belica, dok je kod vina Merlot – Impresija iz berbe 2016. godine sadržaj ovih jedinjenja bio niži nego u odgovarajućem uzorku iz 2015. godine. Direktno poređenje pojedinih vina treba posmatrati sa oprezom, budući da na koncentraciju i sastav antocijana utiče veliki broj faktora, uključujući sortu, agroekološke uslove,

stepen zrelosti grožđa i tehnološke postupke tokom proizvodnje vina.

Na narednim slikama prikazana je procentualna raspodela identifikovanih antocijanskih derivata u analiziranim jednosortnim vinima.



**Slika 55.** Relativna zastupljenost antocijana u obliku 3-glikozida, 3-acetilglikozida i 3-p-kumaroilglikozida u vinu Impresija (berba 2015).

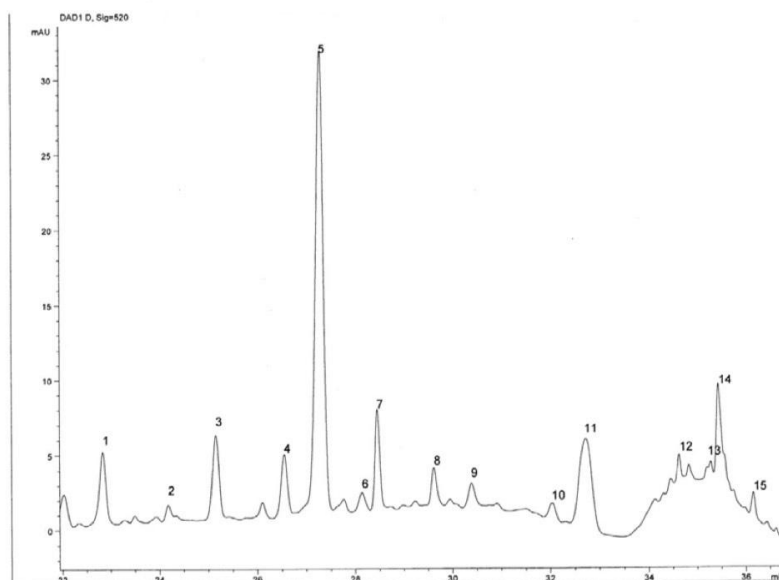


**Slika 56.** Komparativni prikaz zastupljenosti 3-glikozidnih, 3-acetilglikozidnih i 3-p-kumaroilglikozidnih derivata antocijana u vinima Merlot – Impresija 2015 (A) i Mačkov podrum (B)

Rezultati analize pokazali su da derivati malvidina predstavljaju dominantnu grupu antocijanskih jedinjenja u svim ispitivanim jednosortnim vinima. Njihovo relativno učešće kretalo se od 49,13% do 84,57% ukupnog sadržaja antocijana. Pregled procentualne zastupljenosti malvidinskih derivata prikazan je u narednoj tabeli.

**Tabela 48.** Procentualna zastupljenost malvidinskih derivata u antocijanskom profilu analiziranih jednosortnih crvenih vina.

Uzorak vina	Malvidin-3-O-glikozid (%)	Malvidin-3-O-acetilglikozid (%)	Malvidin-3-O-(p-kumaroil)glikozid (%)	Ukupan udeo malvidinskih derivata (%)
M1	82,94	/	/	84,57
M2	45,12	12,10	12,02	66,95
M3	38,90	8,01	5,08	50,28
M4	29,17	9,04	11,05	49,13
M5	63,98	/	/	63,77
M6	54,82	4,16	/	58,69
M7	48,25	9,35	9,52	79,05
M8	51,60	10,42	10,06	90,30
M9	37,08	9,27	10,63	56,98



**Slika 57.** HPLC hromatogram antocijana u vinu Merlot – Impresija pri 520 nm

## **5.9. ANTIOKSIDACIONA AKTIVNOST I NJENA KORELACIJA SA SADRŽAJEM FENOLNIH JEDINJENJA U IZABRANIM UZORCIMA CRVENIH VINA SRBIJE I SLOVENIJE**

Još od prošlog veka je poznato da fenolna jedinjenja nemaju nutritivni značaj, ali pomažu u očuvanju ljudskog organizma zbog visokog antioksidativnog potencijala (Hertog i sar. 1995). Jedan čas nakon unošenja 300 mL crvenog vinskog seruma antioksidacioni kapacitet se povećava za 18%, što je uporedivo sa povećanjem od 22% nakon unošenja 1 g C vitamina (Whitehead i sar., 1995). Polifenoli koji se nalaze u crvenim vinima inhibiraju neke degenerativne bolesti kao što su: kardiovaskularne bolesti, neurogenetske poremećaje, dijabetes, poboljšavaju insulinsku osetljivost, sprečavaju oksidaciju LG holesterola, usporavaju kancerogene procese u organizmu, do 80 % inhibiraju virus HIV-a, usporavaju Alzheimer-ovu bolest, starenje, asme, hipertenzije, slabokrvnost i smanjuju ukupni oksidativni stres (Bertelli, 2007; Gey, 1990; German i Walzem, 2000; Grotewold, 2006; Doll, 1990; Hertog, 1995; Havsteen, 2002; Hou, 2003; Edeas, 2001; Klepacka i sar., 2011; Macheix i sar., 1990; Mimić-Oka i sar., 1999; Olas i Wachowich, 2002; Pereira i sar., 2009; Renaud i de Lorgeril, 1992; Shahidi i Wanasundara, 1992; Soleas i sar, 2002).

Ovi farmakološki efekti polifenolnih jedinjenja povezani su sa njihovom antioksidacionom delovanju. Dr Cristobal Miranda (1954.) i Dr Donald R. Buhler (1962.), dobitnici Nobelove nagrade za istraživanja antioksidacione aktivnosti flavonoida, potvrdili su da ona zavisi od strukture molekula tj. od prisutnih hidroksilnih grupa na benzenovom prstenu i dvogubih veza. Iz navedenih razloga u ovom poglavlju biće dati rezultati ispitivanja korelacije antioksidacione aktivnosti najzastupljenijih crvenih vina Balkanskog regiona sa nađenim koncentracijama prisutnih fenolnih jedinjenja.

### **5.9.1. Korelaciona analiza DPPH antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih jedinjenja u odabranim crvenim vinima**

Antioksidativna aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina određena je primenom metode zasnovane na 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) slobodnom radikalu, pri čemu su rezultati predstavljeni u eksperimentalnom delu rada. Ova spektrofotometrijska metoda se zasniva na praćenju redukcije DPPH radikala promenom apsorbance na talasnoj dužini od 517 nm.

DPPH• radikal karakteriše intenzivna ljubičasta boja usled prisustva nesparenog elektrona, dok nakon reakcije sa antioksidativnim komponentama iz vina, prvenstveno fenolnim jedinjenjima, dolazi do njegovog redukovanja u oblik bezbojan ili žućkast 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazilin (DPPH-H). Intenzitet ove promene koristi se za kvantifikaciju antioksidativnog kapaciteta uzoraka.

U Tabeli 58 prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti ispitivanih vina izraženi kao procenat inhibicije DPPH radikala, kao i EC50 vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju potrebnu za neutralizaciju 50% slobodnih radikala. Ovakav način prikaza omogućava lakše poređenje različitih uzoraka.

U analizu su uključeni prethodno spektrofotometrijski i hromatografski karakterisani uzorci,

i to šest vina sorte Cabernet Sauvignon i osam vina sorte Merlot. Grupu Cabernet Sauvignon činili su uzorci: Cabernet Sauvignon – Slovenska Istra (2015), Cabernet Sauvignon – Vipava 1894 (2015), Cabernet Sauvignon – Diva (2015), Cabernet Sauvignon – Impresija (2015), Cabernet Sauvignon – Diva (2016) i Cabernet Sauvignon – Impresija (2016).

Dobijeni rezultati su pokazali da se antioksidativna aktivnost Cabernet Sauvignon vina kreće u opsegu od 83,52% do 91,83%, dok su EC50 vrednosti bile u intervalu od 49,24 do 83,25 mL/g.

Kod Merlot vina analizirani su uzorci: Mačkov podrum (2015), Vipava 1894 (2015), Deželno vino (2015), Impresija (2015), Impresija (2016), Belica (2016), Goriška Brda (2016) i Tribus Villa (2016). U ovoj grupi zabeležene su vrednosti antioksidativne aktivnosti u rasponu od 80,45% do 90,25%, dok su EC50 vrednosti varirale između 49,85 i 55,30 mL/g.

Među posmatranim uzorcima, vino Belica izdvojilo se kao vino sa nešto nižim antioksidativnim kapacitetom u poređenju sa ostalim ispitivanim jednosortnim crvenim vinima.

**Tabela 49.** Uporedni prikaz antioksidativne aktivnosti odabranih crvenih vina

Oznaka uzorka vina	Procenat inhibicije DPPH radikala (%)	EC50 vrednost (mL/g)
Goriška brda Cabernet 2016	88,74±0,26	72,18±0,33
Vipava 1894 Cabernet 2015	89,53±0,56	49,24±0,26
Slovenska ISTR A Cabernet 2015	88,93±1,02	80,03±0,32
Goriška brda Cabernet Merlot 2016	90,12±0,31	58,44±0,29
Goriška brda Merlot 2016	87,32±0,26	74,08±0,03
Mačkov podrum Merlot 2015	89,96±0,26	50,56±0,26
Deželno vino PGO Merlot 2015	87,02±0,26	64,96±0,16
Impresija Merlot 2015	90,25±0,26	47,85±0,56
Belica Merlot 2016	65,82±0,26	145,83±0,17
Impresija Merlot 2016	80,72±0,15	104,11±0,22

Oznaka uzorka vina	Procenat inhibicije DPPH radikala (%)	EC <sub>50</sub> vrednost (mL/g)
Diva Cabernet 2015	86,78±0,26	60,67±0,34
Diva Cabernet 2016	85,89±0,26	83,25±0,24
Impresija Cabernet 2015	91,83±0,26	47,17±0,43
Rose Merlot 2016	86,45±0,26	65,30±0,55
Impresija Cabernet 2016	83,52±0,26	97,75±0,15
Vipava 1894 Merlot 2015	88,96±0,26	54,31±0,29

Tabela 50 prikazuje opseg vrednosti antioksidativne aktivnosti za ispitivane tipove vina, pri čemu se jasno uočava da su uzorci sorte Cabernet Sauvignon karakterisani najvišim nivoom antioksidativnog delovanja u okviru analiziranog seta vina.

**Tabela 50.** Raspon antioksidativne aktivnosti pojedinih vrsta crvenih vina obuhvaćenih istraživanjem

Oznaka uzorka vina	EC <sub>50</sub> antioksidativna vrednost (mL/g)
Cabernet Sauvignon sorta	49,26±0,15 - 83,25±0,24
Merlot sorta	47,85±0,55 - 145,83±0,17

Na osnovu dobijenih EC<sub>50</sub> vrednosti može se zaključiti da analizirana crvena vina ispoljavaju izražen antioksidativni potencijal. Uopšteno se smatra da fenolna jedinjenja deluju kao antioksidansi zahvaljujući svojoj sposobnosti da prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala, pri čemu brzina tih reakcija predstavlja jedan od ključnih parametara koji određuju ukupni antioksidativni kapacitet.

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja uslovljena je nizom strukturnih faktora, uključujući energiju disocijacije O–H veze, mogućnost delokalizacije nesparenog elektrona, rezonantnu stabilizaciju formiranog radikala, kao i sterične efekte supstituenata na aromatičnom prstenu (Shahidi i Nacz, 1995). Pojedini autori ističu da inhibitorno dejstvo fenolnih kiselina, naročito hidroksicimetnih derivata, zavisi od broja i rasporeda hidroksilnih grupa u molekulu.

Hidroksilne grupe doprinose antioksidativnoj aktivnosti ne samo kao donori vodonika koji neutrališu slobodne radikale, već i kroz stabilizaciju nastalih radikala dodatnim rezonantnim efektima i intramolekulskim interakcijama. Razlike u antioksidativnom kapacitetu vina posledica su varijacija u sadržaju i reaktivnosti prisutnih fenolnih jedinjenja.

Kod flavonoida, posebno flavonola, antioksidativna aktivnost se dovodi u vezu sa strukturnim karakteristikama kao što su: broj hidroksilnih grupa u B prstenu, prisustvo orto-dihidroksilne konfiguracije, konjugacija 2,3-dvostruke veze sa keto grupom na C4 atomu, kao i prisustvo hidroksilnih grupa na položajima C3 i C5, koje učestvuju u hvatanju slobodnih radikala, formiranju vodoničnih veza sa keto grupom i heliranju metalnih jona tokom oksidacionih procesa (Espinoza i sar., 2009; Marinova i Yanishlieva, 1992; Rice-Evans i sar., 1995).

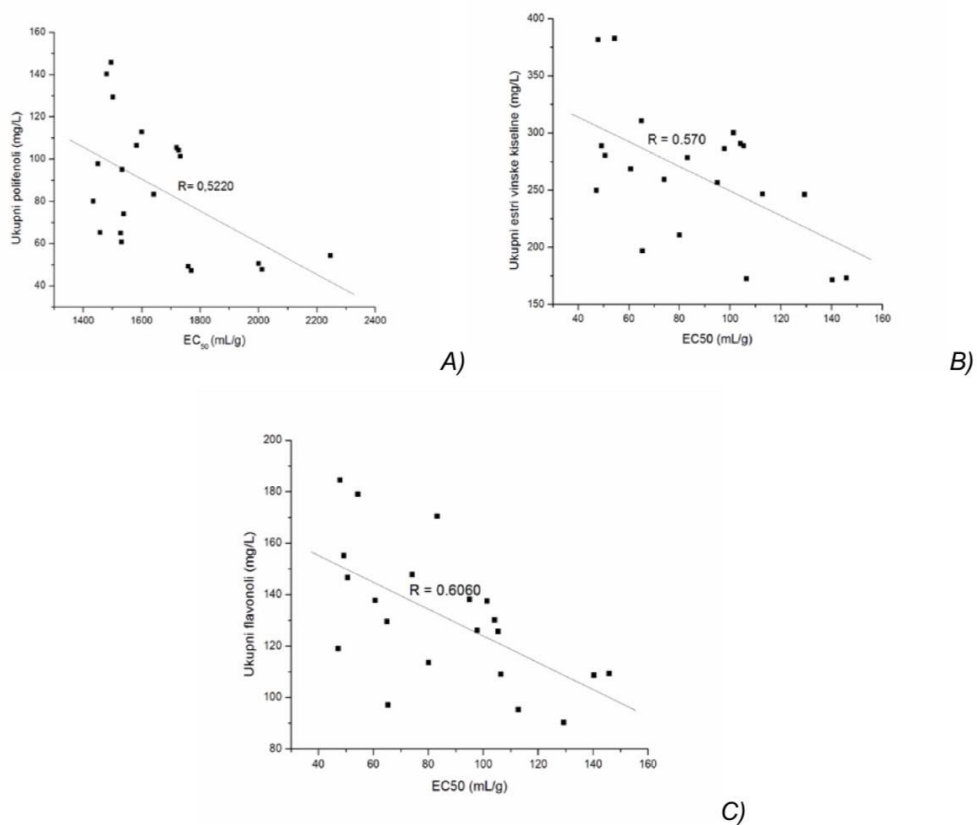
U dosadašnjim istraživanjima (navedenim u literaturi) prikazane su različite korelacione analize između bioaktivnih komponenti i antioksidativnog kapaciteta prirodnih uzoraka poput grožđa i vina. U okviru ovog rada ispitana je moguća povezanost između koncentracija prethodno određenih fenolnih jedinjenja i eksperimentalno dobijenih  $EC_{50}$  vrednosti za antioksidativni kapacitet analiziranih crvenih vina (Radovanović i sar., 2008; 2010a; 2010b; 2012a; 2012b).

Na osnovu UV/VIS spektroskopskih rezultata izvršena je procena korelacije između  $EC_{50}$  vrednosti i spektroskopski određenih parametara za ukupne fenole, estre vinske kiseline i flavonole. Dobijeni korelacioni indeksi, prikazani u Tabeli 41, ukazuju na postojanje izražene povezanosti između posmatranih parametara.

**Tabela 51.** Korelacioni odnosi između UV/VIS spektroskopski određenih estara vinske kiseline i flavonola i antioksidativne aktivnosti ( $EC_{50}$ ) u crvenim vini

Korelacioni koeficijent (r)	CS	M
Povezanost ukupnih polifenola i $EC_{50}$ vrednosti	0,5220	26,9547
Povezanost estara vinske kiseline i $EC_{50}$ vrednosti	0,5695	49,1090
Povezanost ukupnih flavonola i $EC_{50}$ vrednosti	0,6060	21,6040

Na Slici 58 prikazani su grafički odnosi između antioksidativne aktivnosti ispitivanih crvenih vina i koncentracija ukupnih polifenola (A), estara vinske kiseline (B) i ukupnih flavonola (C), na osnovu kojih su analizirane njihove međusobne korelacije.

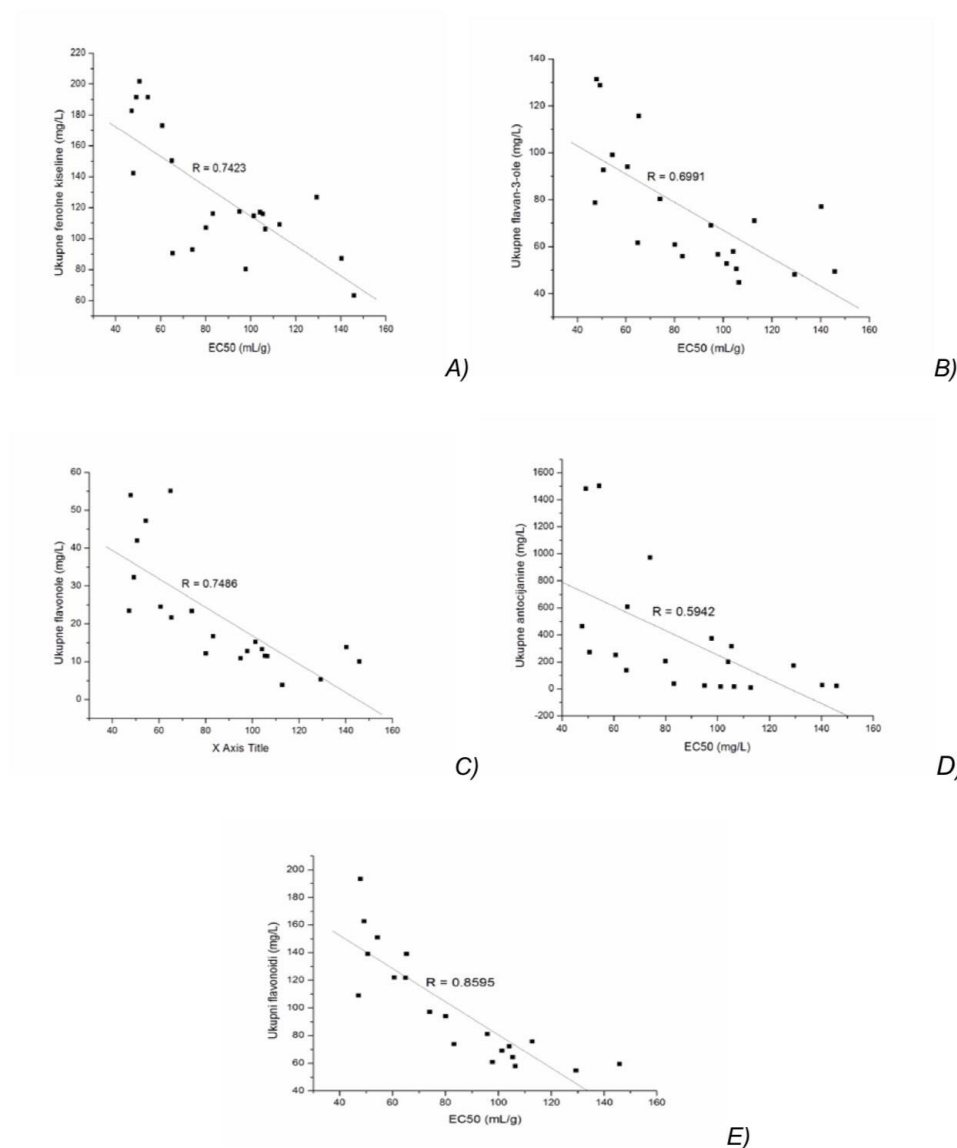


**Slika 58.** Korelacija između UV/VIS spektroskopski određenih fenolnih jedinjenja (ukupni polifenoli, estri vinske kiseline i flavonoli) i antioksidativne aktivnosti ( $EC_{50}$ ) u crvenim vinima

Pored toga, analizirana je potencijalna korelacija između sadržaja ukupnih fenola, flavan-3-ola, flavonola i ukupnih flavonoida, kao i ukupnih antocijana određenih HPLC metodom, u odnosu na antioksidativnu aktivnost ispitivanih crvenih vina. Dobijeni korelacioni indeksi prikazani su u Tabeli 52, dok je njihov grafički prikaz dat na Slici 59.

**Tabela 52.** Korelacioni odnosi između HPLC-određenih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ( $EC_{50}$ ) u crvenim vinima

Korelacioni koeficijent (r)	CS	M
Povezanost fenolnih kiselina i $EC_{50}$ vrednosti	0,7423	27,4829
Povezanost flavan-3-ola i $EC_{50}$ vrednosti	0,6991	19,2772
Povezanost flavonola i $EC_{50}$ vrednosti	0,7486	10,4961
Povezanost antocijana i $EC_{50}$ vrednosti	0,5941	22,1015
Povezanost ukupnih flavonoida i $EC_{50}$ vrednosti	0,8595	21,2075



**Slika 59.** Korelacija između HPLC-određenih fenolnih jedinjenja (fenolne kiseline, flavan-3-oli, flavonoli, antocijani i flavonoidi) i antioksidativne aktivnosti (EC<sub>50</sub>) u crvenim vinima

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje izražene korelacije između antioksidativne aktivnosti izražene preko EC<sub>50</sub> vrednosti i svih ispitivanih grupa fenolnih jedinjenja određenih HPLC metodom. Najviši stepen povezanosti zabeležen je sa ukupnim flavonoidima ( $r = 0,8595$ ), što upućuje na njihov značajan doprinos ukupnom antioksidativnom kapacitetu vina, kao i na mogući sinergistički efekat različitih flavonoidnih grupa.

Antocijani predstavljaju posebno značajnu grupu fenolnih jedinjenja sa izraženim biološkim potencijalom, međutim njihov sadržaj u crvenim vinima pokazuje veliku varijabilnost. Na njihovu zastupljenost utiče više faktora, uključujući sortu grožđa, stepen zrelosti, klimatske uslove, tehnologiju proizvodnje i način sazrevanja i čuvanja vina, što je već ranije diskutovano.

Rezultati HPLC analiza pokazuju da u okviru svake ispitivane fenolne grupe postoji jedna dominantna komponenta. Kod fenolnih kiselina, analiziranih DAD detektorom na 280 i 320 nm, galna kiselina se izdvojila kao najzastupljenija, sa maksimalnim učešćem do 88,75% u vinima tipa Impresija.

U grupi flavan-3-ola, određenih na 275/322 nm, najveći doprinos ima (+)-katehin, sa maksimalnim učešćem od 55,30% u Cabernet Sauvignon vinima. Kod flavonola, analiziranih na 360 nm, dominantna komponenta je kvercetin-3-glikozid, čiji udeo dostiže do 57,58%.

**Tabela 53.** Raspon procentualne zastupljenosti odabranih fenolnih jedinjenja određenih HPLC metodom

Uzorak vina	Udeo galne kiseline (%)	Udeo (+)-katehina (%)	Udeo kvercetin-3-O-glikozida (%)
Cabernet Sauvignon sorta	36,55 - 63,92	30,96 – 55,30	12,37 – 38,35
Merlot sorta	61,77 – 62,54	22,09 – 25,50	34,92 – 36,48

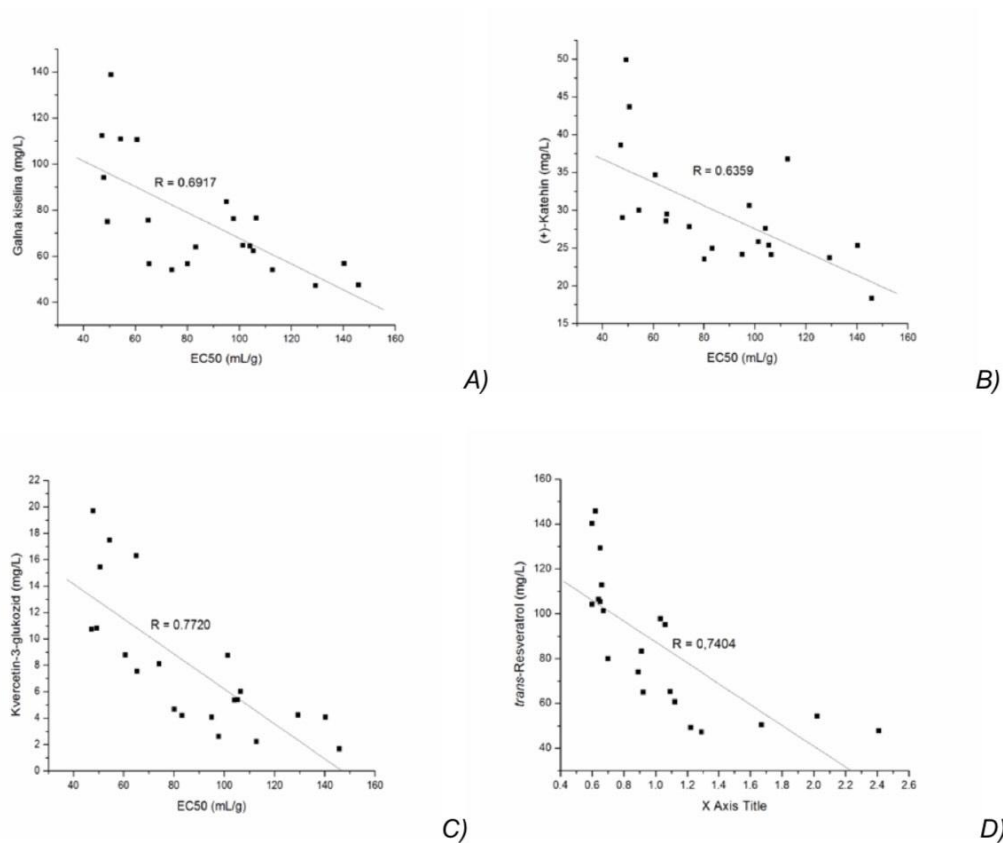
U cilju dodatnog sagledavanja povezanosti između fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti, analizirana je korelacija između koncentracija galne kiseline, (+)-katehina i kvercetin-3-glikozida i odgovarajućih vrednosti antioksidativnog kapaciteta ispitivanih crvenih vina. Rezultati prikazani u Tabeli 54, kao i grafički predstavljeni na Slici 61 (A–C), ukazuju na izraženu pozitivnu povezanost između ovih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.

Ovi nalazi su dodatno potvrđeni analizom odnosa između pomenutih jedinjenja i  $EC_{50}$  vrednosti, gde je uočena konzistentna tendencija jačanja antioksidativnog efekta sa porastom njihove koncentracije.

Pored toga, ispitana je i korelacija između trans-resveratrola, kao predstavnika stilbena, i antioksidativne aktivnosti analiziranih uzoraka vina. Dobijeni korelacioni koeficijent ukazuje na izraženu povezanost između sadržaja ovog jedinjenja i antioksidativnog potencijala vina.

**Tabela 54.** Korelacioni odnosi između HPLC-određenih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ( $EC_{50}$ ) u crvenim vinima

Korelacioni koeficijent (r)	CS	M
Galna kiselina vs $EC_{50}$	0,6917	18,4398
(+)-Katehin vs $EC_{50}$	0,6912	22,8353
Kvercetin-3-glikozid vs $EC_{50}$	0,7719	3,4454
Korelacija između trans-resveratrola i $EC_{50}$ vrednosti	0,7404	21,2444



**Slika 60.** Korelacija između HPLC-određenih fenolnih jedinjenja (galna kiselina, (+)-katehin, kvercetin-3-glikozid i trans-resveratrol) i antioksidativne aktivnosti ( $EC_{50}$ ) u crvenim vinima

Antioksidativna aktivnost pojedinačnih fenolnih jedinjenja i odabranih referentnih antioksidanasa određena je primenom DPPH slobodnoradikalne metode. U okviru ispitivanja analizirani su prirodni fenolni standardi prisutni u vinima, uključujući galnu kiselinu, askorbinsku kiselinu, kvercetin i rutin, kao i sintetički antioksidansi troloks i 2-terc-butil-4-hidroksianizol (BHA).

Dobijeni rezultati pokazuju izražene razlike u njihovoj antioksidativnoj efikasnosti. Među ispitivanim jedinjenjima, kvercetin je ispoljio najjači antioksidativni kapacitet, dok su nešto niže vrednosti zabeležene kod galne kiseline i rutina, u poređenju sa ostalim analiziranim supstancama.

**Tabela 55.**  $EC_{50}$  vrednosti odabranih čistih supstanci izražene u mg/g i  $\mu\text{mol/g}$

Korelacioni koeficijent (r)	CS	M
Galna kiselina vs $EC_{50}$	0,6917	18,4398
(+)-Katehin vs $EC_{50}$	0,6912	22,8353
Kvercetin-3-glikozid vs $EC_{50}$	0,7719	3,4454
Korelacija između trans-resveratrola i $EC_{50}$ vrednosti	0,7404	21,2444

Na osnovu svih dobijenih korelacionih analiza može se uočiti da se najizraženija povezanost sa antioksidativnom aktivnošću crvenih vina postiže kada se razmatra ukupna koncentracija flavonoidnih jedinjenja. Ovoj grupi pripadaju flavan-3-oli, flavonoli, flavoni i flavanoni, čije su koncentracije određene primenom DAD detekcije na 360 nm, kao i fluorescentne detekcije na 275/322 nm.

Dobijeni rezultati ukazuju da ove grupe jedinjenja zajednički doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu vina, pri čemu se može pretpostaviti postojanje sinergističkog delovanja između različitih bioaktivnih fenolnih komponenti i ukupne antioksidativne aktivnosti crvenih vina.

### 5.9.2. Korelacija između Cu(II)-1,10-fenantrolin određene antioksidativne aktivnosti i fenolnog sastava crvenih vina

Antioksidativna aktivnost prirodnih uzoraka, uključujući grožđe i vino, može se procenjivati primenom različitih analitičkih pristupa. U ovom delu rada prikazani su rezultati određivanja antioksidativnog kapaciteta primenom nove bakar(II)-1,10-fenantrolin (Cu(II)-fen) redoks metode.

Ova metoda se zasniva na redukciji hromogenog kompleksa Cu(II)-1,10-fenantrolina do Cu(I)-1,10-fenantrolina u prisustvu antioksidativno aktivnih fenolnih jedinjenja iz uzorka vina. Nastali redukovani oblik pokazuje karakterističan maksimum apsorpcije na 450 nm, što omogućava njegovu spektrofotometrijsku kvantifikaciju.

Da bi se procenila pouzdanost i primenljivost ove nove bakar-redukujuće (CR) metode za određivanje antioksidativne aktivnosti vina, izvršeno je poređenje dobijenih rezultata sa vrednostima dobijenim primenom standardne DPPH metode, što je prikazano u Tabeli 56.

Za izradu kalibracionih krivih korišćena su ista referentna fenolna jedinjenja kao i kod DPPH metode, i to galna kiselina, kvercetin i rutin.

**Tabela 56.** Poređenje antioksidativne aktivnosti odabranih crvenih vina određene DPPH i CR metodom

Ispitivana jedinjenja	EC <sub>50</sub> (mg/g, DPPH metoda)	EC <sub>50</sub> (μmol/g, DPPH metoda)
Flavonol	7,29	24,12
Fenolna kiselina	55,15	325,00
Askorbat	107,43	609,95
Kvercetin-3-O-rutinozid	129,96	212,86

Ispitivana jedinjenja	EC <sub>50</sub> (mg/g, DPPH metoda)	EC <sub>50</sub> (μmol/g, DPPH metoda)
6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina	130,00	520,00
Butil-hidroksianizol	142,84	792,41

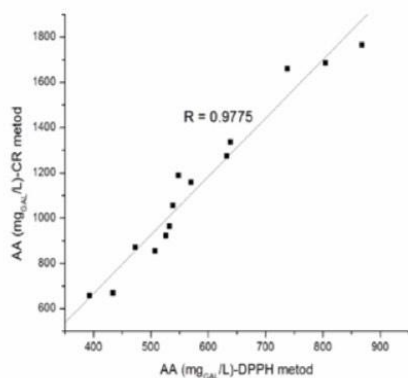
U Tabeli 57 i na Slici 61 prikazani su korelacioni indeksi koji ukazuju na veoma visok stepen slaganja između rezultata dobijenih primenom nove CR metode i standardne DPPH metode. Uočene vrednosti korelacije (0,9767–0,9775) potvrđuju izuzetnu saglasnost između ova dva pristupa u proceni antioksidativne aktivnosti crvenih vina.

Na osnovu ovako izražene podudarnosti, nije bilo neophodno dalje uspostavljanje korelacionih odnosa između CR metodom dobijenih vrednosti antioksidativne aktivnosti i koncentracija pojedinačnih fenolnih jedinjenja identifikovanih u analiziranim uzorcima vina.

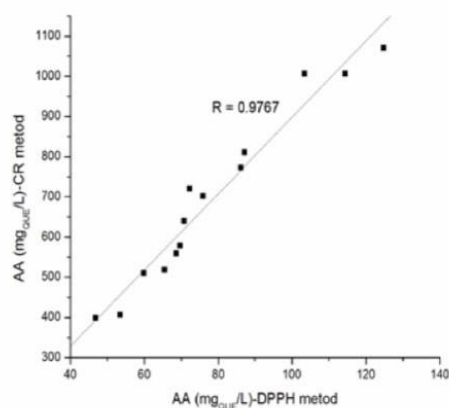
**Tabela 57.** Korelacioni odnosi između DPPH i CR metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti crvenih vina izražene preko ekvivalenata galne kiseline, kvercetina i rutina

Uzorak vina	DPPH metoda			CR metoda		
	GAE (mg/L)	QE (mg/L)	RE (mg/L)	GAE (mg/L)	QE (mg/L)	RE (mg/L)
Goriška brda Cabernet 2016	433,96	53,47	1240,94	922,16	559,37	407,40
Vipava 1894 Cabernet 2015	804,39	114,37	1118,84	871,07	510,19	371,60
Slovenska ISTR A Cabernet 2015	868,21	124,86	1196,76	855,31	518,83	377,89
Goriška brda Cabernet Merlot 2016	868,21	124,86	1724,63	1659,96	1006,84	733,07
Goriška brda Merlot 2016	433,96	53,47	1483,83	1273,51	772,46	562,49
Mačkov podrum Merlot 2015	547,86	72,19	1498,59	1336,95	810,94	590,49
Deželno vino PGO Merlot 2015	532,49	69,66	938,31	657,97	399,14	290,78
Impresija Merlot 2015	526,12	68,62	1340,87	1158,07	702,45	511,53
Belica Merlot 2016	472,64	59,82	1269,22	1055,66	640,34	466,33

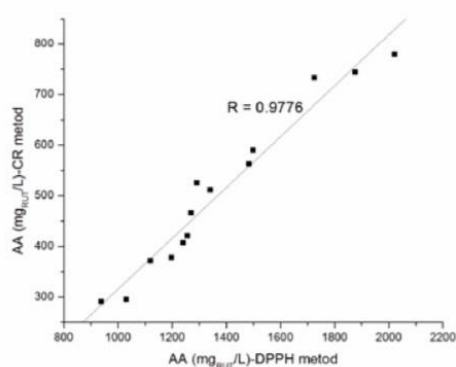
Uzorak vina	DPPH metoda			CR metoda		
	GAE (mg/L)	QE (mg/L)	RE (mg/L)	GAE (mg/L)	QE (mg/L)	RE (mg/L)
Impresija Merlot 2016	506,77	65,44	1240,94	922,16	559,37	407,40
Diva Cabernet 2015	737,99	103,45	1118,84	871,07	510,19	371,60
Diva Cabernet 2016	632,52	86,11	1196,76	855,31	518,83	377,89
Impresija Cabernet 2015	638,98	87,17	1724,63	1659,96	1006,84	733,07
Rose Merlot 2016	393,56	46,82	1483,83	1273,51	772,46	562,49
Impresija Cabernet 2016	569,89	75,81	1498,59	1336,95	810,94	590,49
Vipava 1894 Merlot 2015	538,51	70,65	938,31	657,97	399,14	290,78



A)



B)



C)

**Slika 61.** Korelacija između antioksidativne aktivnosti određene DPPH i CR metodom izražene preko ekvivalenata galne kiseline, kvercetina i rutina

## ZAKLJUČAK

Istraživanje je obuhvatilo ukupno četrnaest uzoraka crvenih vina poreklom iz različitih vinogradarskih područja Balkana, sa teritorije Srbije i Slovenije, proizvedenih u periodu 2015–2016. godine kod više različitih proizvođača. Analizirana su vina dobijena od sorti *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon i Merlot, kao i drugih regionalno zastupljenih vina iz različitih vinarija, uključujući uzorke iz slovenskih i regionalnih oznaka porekla.

U okviru eksperimentalnog dela rada primenjene su komplementarne analitičke metode za karakterizaciju fenolnog profila i antioksidativnog potencijala. Spektrofotometrijske analize su obuhvatile određivanje ukupnih fenola na 280 nm, derivata vinske kiseline na 320 nm, kao i flavonolnih jedinjenja na 360 nm. Paralelno je sprovedena HPLC analiza kojom je obuhvaćeno ukupno četrdeset pojedinačnih fenolnih komponenti.

Identifikacija i kvantifikacija jedinjenja izvršena je kombinovanom primenom DAD detekcije (na talasnim dužinama 280, 320, 360 i 520 nm) i fluorescentne detekcije (275/322 nm), uz poređenje retencionih vremena i apsorpcionih spektara sa standardnim supstancama, kao i primenu odgovarajućih kalibracionih krivih za kvantifikaciju.

Na osnovu primenjene HPLC metode, utvrđeno je prisustvo jedanaest neflavonoidnih fenolnih jedinjenja, među kojima dominiraju fenolne kiseline kao što su galna, vanilinska, siringinska, hlorogenska, elaginska, kao i različiti derivati hidroksicimetnih kiselina (trans-kaftarna, trans-kutarinska, trans-kafeinska, p-kumarinska i ferulinska kiselina), uz prisustvo trans-resveratrola kao predstavnika stilbena.

Pored njih, identifikovana je i široka grupa flavonoidnih jedinjenja koja obuhvata ukupno dvadeset i devet komponenti. U okviru ove grupe izdvojeni su flavan-3-oli (kao što su (+)-katehin, (-)-epikatehin, procijanidin B2 i (-)-epigalokatehingalat), zatim flavonoli (kvercetin-3-glikozid, kvercetin, rutin, miricetin, morin i kemferol), kao i flavoni (luteolin i apigenin), dok je među flavanonima detektovan naringin.

Posebno značajnu grupu u fenolnom profilu analiziranih vina čine antocijani, koji su analizirani na 520 nm. U njihov sastav ulaze derivati malvidina, peonidina, delfinidina, cijanidina i petunidina, uključujući njihove glikozidne, acetilglikozidne i p-kumaroilglikozidne oblike, kao i prisustvo jedinjenja kao što su Vitisin A i malvidin-3-vinilfenol glikozid.

Pored hemijskog sastava, određivana je i pH vrednost svih uzoraka, pri čemu su zabeležene vrednosti u opsegu od 2,80 do 3,67, u zavisnosti od sorte i porekla vina. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sva ispitivana vina pripadaju grupi slabo kiselih vina.

Analiza rezultata pokazala je da je fenolni sastav vina, kao i sadržaj pojedinačnih identifikovanih jedinjenja, pod uticajem više međusobno povezanih faktora. Među njima se izdvajaju sorte karakteristike grožđa, geografsko poreklo i klimatski uslovi vinogradarskih regiona, zatim godina berbe, kao i tehnologija proizvodnje, uslovi čuvanja i procesi starenja vina, koji posebno utiču na stabilnost i koncentraciju antocijana.

Praćenjem uzoraka iz dve uzastopne berbe (2015. i 2016. godine) kod istih proizvođača uočene su izražene razlike u fenolnom profilu. Rezultati ukazuju da je 2015. godina pogodovala intenzivnijoj sintezi fenolnih jedinjenja, što se može povezati sa povoljnijim klimatskim uslovima i višim stepenom fenolne zrelosti grožđa.

Dodatna analiza neflavonoidnih komponenti pokazala je značajne razlike u sadržaju hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina, čak i među vinima iste sorte, ali različitog proizvođača. U Cabernet Sauvignon vinima koncentracije hidroksibenzoevih kiselina kretale su se u opsegu od 19,72 do 130,77 mg/L, dok su hidroksicimetne kiseline bile prisutne u rasponu od 11,65 do 46,90 mg/L. Ukupan sadržaj fenolnih kiselina varirao je od 38,94 do 176,67 mg/L, što ukazuje na izraženu heterogenost u zavisnosti od porekla i uslova proizvodnje.

Analizom odnosa hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina utvrđeno je da se njihovo međusobno učešće kreće u opsegu od 41,45 do 67,88%. Posebno se izdvajaju Cabernet Sauvignon vina vinarije Impresija, kod kojih je zabeležen viši relativni udeo hidroksicimetnih kiselina, koji prelazi 50%, u poređenju sa ostalim ispitivanim vinima iste sorte.

U okviru ove grupe uzoraka, galna kiselina je identifikovana kao najzastupljenija fenolna kiselina, sa dominantnim udelom koji u Cabernet Sauvignon vinima vinarije Impresija dostiže 63,92% i 65,06%. Poređenjem Merlot vina istog proizvođača sa vinima drugih vinarija uočeno je da uzorci Impresije sadrže do 40,55% viši nivo fenolnih kiselina, što ukazuje na izražen uticaj proizvodnog sistema na hemijski profil vina.

Koncentracija trans-resveratrola, kao najznačajnijeg predstavnika stilbena u crvenim vinima, kretala se u svim analiziranim uzorcima u rasponu od 0,74 do 2,41 mg/L, bez obzira na sortu i poreklo.

Distribucija pojedinačnih fenolnih kiselina pokazala je stabilan hijerarhijski obrazac prisustva, pri čemu je u svim vinima zabeležen sledeći redosled: galna kiselina > trans-kaftarinska kiselina > trans-kutarinska kiselina > siringinska kiselina > ferulinska kiselina > p-kumarinska kiselina > kafeinska kiselina > hlorogenska kiselina > vanilinska kiselina. Ovaj raspored ukazuje na konzistentnost dominantnih jedinjenja u okviru analiziranih uzoraka.

Analiza flavonoidnog profila pokazala je izražene razlike između istosortnih vina, što ukazuje na značajan uticaj proizvođača i uslova vinifikacije. Sadržaj flavan-3-ola u Cabernet Sauvignon vinima kretao se od 49,20 do 143,75 mg/L, dok je u ostalim jednosortnim vinima zabeležen niži opseg od 30,06 do 73,13 mg/L.

Među flavan-3-olima, (+)-katehin se izdvojio kao dominantna komponenta, sa procentualnim udelom u Cabernet Sauvignon vinima u rasponu od 30,96 do 54,01%, dok je u Merlot vinima dostizao 55,30%, a u pojedinim uzorcima i 52,09%.

Flavonoli su predstavljali sledeću značajnu flavonoidnu grupu, sa koncentracijama u Cabernet Sauvignon vinima u intervalu od 11,80 do 35,15 mg/L. U okviru ove grupe, kvercetin u formi kvercetin-3-glikozida identifikovan je kao najzastupljenije jedinjenje, sa procentualnim udelom od 20,79 do 51,58% u Cabernet Sauvignon vinima, dok je u Merlot i drugim vinima

njegovo učešće često prelazilo 60%.

Prisustvo flavona i flavanona bilo je znatno niže u poređenju sa ostalim flavonoidnim klasama, ali su ova jedinjenja ipak doprinela ukupnom flavonoidnom profilu ispitivanih uzoraka. Ukupna koncentracija flavonoida, određena na 360 nm i 275/322 nm, u Cabernet Sauvignon vinima kretala se od 60,88 do 163,63 mg/L, dok je u Merlot vinima zabeležen niži nivo, sa minimalnim vrednostima oko 54,68 mg/L.

Antocijani su predstavljali najznačajniju grupu jedinjenja u pogledu boje i senzornog profila vina. Njihova ukupna koncentracija u Cabernet Sauvignon vinima dostizala je 1480,56 mg/L, dok je u Merlot vinima bila niža i iznosila do 607,42 mg/L.

U svim analiziranim uzorcima dominantan antocijan bio je malvidin-3-glikozid, zajedno sa njegovim acetyl- i p-kumaroil-derivatima. Udeo malvidin derivata dostizao je do 86,47% u Cabernet Sauvignon vinima, dok je u Merlot vinima prelazio 50%. Struktura antocijana pratila je stabilan obrazac raspodele: glikozidi > acetylglukozidi > p-kumaroilglukozidi > malvidin-3-vinilfenol glikozid > Vitisin A.

Ispitivanja antioksidacione aktivnosti DPPH metodom pokazala su da su EC<sub>50</sub> vrednosti bile u rasponu od 47,17 do 50,56 mL/g, u zavisnosti od sorte, dok je izražena antioksidativna aktivnost varirala između 69,55% i 91,83%. Rezultati ukazuju na snažan antioksidativni potencijal svih analiziranih vina

Korelaciona analiza je pokazala umerenu povezanost između spektrofotometrijski određenih parametara (ukupni fenoli, esteri vinske kiseline i flavonoli) i antioksidativne aktivnosti ( $r \leq 0,6060$ ), dok je značajno jača korelacija utvrđena između HPLC-detekovanih grupa jedinjenja (fenolne kiseline, flavan-3-oli, flavonoli i antocijani) i antioksidativnog kapaciteta ( $r \leq 0,8595$ ).

Najslabiji doprinos korelaciji zabeležen je kod antocijana, što ukazuje na njihovu izraženu zavisnost od više faktora, uključujući sortu, tehnologiju proizvodnje, uslove skladištenja i proces starenja vina.

Dodatna analiza pokazala je da je u okviru svake fenolne klase prisutna dominantna komponenta, što potvrđuje specifičnost hemijskog profila vina. Korelacioni odnosi sa pojedinačnim jedinjenjima pokazali su najizraženiju povezanost za galnu kiselinu (0,6917), (+)-katehin (0,6912), kvercetin-3-glikozid (0,7719) i trans-resveratrol (0,7404), što ukazuje na njihov značajan doprinos ukupnoj bioaktivnosti vina.

Antioksidativni potencijal ispitivanih crvenih vina procenjivan je primenom DPPH metode, pri čemu je paralelno ispitivana aktivnost odabranih bioaktivnih jedinjenja, uključujući galnu i askorbinsku kiselinu, kvercetin, rutin, troloks i BHA. Rezultati su pokazali da kvercetin ispoljava najizraženiji antioksidativni efekat, sa EC<sub>50</sub> vrednošću od 24,12 mg/g, što ga svrstava među najaktivnije ispitivane komponente.

Pored DPPH testa, antioksidaciona svojstva vina određivana su i primenom alternativne redoks metode zasnovane na bakar(II)-1,10-fenantrolinskom sistemu kao oksidacionom sredstvu. Dobijeni rezultati, izraženi kao ekvivalenti galne kiseline, kvercetina i rutina (mg/L), pokazali su visok stepen podudarnosti sa rezultatima DPPH analize.

Saglasnost između primenjenih metoda potvrđena je visokom korelacijom, pri čemu su koeficijenti korelacije bili u veoma uskom opsegu od 0,9775 do 0,9776, što ukazuje na izraženu metodološku konzistentnost i pouzdanost dobijenih podataka.

Sveobuhvatna analiza sprovedena u okviru ove doktorske disertacije integrisala je teorijski okvir, eksperimentalna merenja i statističku obradu podataka, čime su dobijeni rezultati dobili dodatnu validaciju i interpretativnu snagu.

Dobijeni nalazi ukazuju da su crvena vina hemijski kompleksni sistemi u kojima fenolna jedinjenja predstavljaju ključne nosioce antioksidativne aktivnosti. I ukupna količina fenola i njihov pojedinačni sastav direktno utiču na izraženost funkcionalnih svojstava vina.

Uporedna analiza antioksidativnih metoda (DPPH, ABTS i FRAP) pokazala je visok stepen međusobne usklađenosti, čime je potvrđena stabilnost primenjenih analitičkih pristupa i pouzdanost procene antioksidativnog kapaciteta.

Utvrđeno je da sorte karakteristike predstavljaju jedan od glavnih faktora varijabilnosti fenolnog profila. Vina sorte Cabernet Sauvignon u proseku su pokazala viši nivo ukupnih fenolnih jedinjenja i izraženiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na Merlot vina.

Pored genetskog faktora, značajan doprinos razlikama u hemijskom sastavu imaju i uslovi sredine, obuhvaćeni pojmom terroir. Razlike u klimatskim i zemljišnim karakteristikama između vinogradarskih regiona Srbije i Slovenije odražavaju se na hemijski profil i bioaktivni potencijal vina.

Metodološki pristup zasnovan na kombinaciji spektrofotometrijskih analiza, HPLC-DAD tehnike, antioksidativnih testova i multivarijantne statistike omogućio je sveobuhvatnu i pouzdanu interpretaciju rezultata.

Dodatno, primena PCA analize omogućila je redukciju kompleksnog skupa podataka i jasnu separaciju uzoraka prema sorti i geografskom poreklu, čime su potvrđeni prethodno uočeni obrasci varijabilnosti.

Na osnovu integrisanih rezultata može se zaključiti da analizirana vina poseduju izražen funkcionalni potencijal, što podržava njihovo mesto u okviru koncepta funkcionalne hrane, pod uslovom umerene konzumacije.

U celini posmatrano, ova doktorska disertacija predstavlja originalan, metodološki dosledan i naučno utemeljen doprinos oblasti hemije hrane i enologije, sa jasnim implikacijama za unapređenje razumevanja bioaktivnih svojstava vina i njihove praktične primene u vinskoj industriji.

## 6. LITERATURA

Abuja, P.M., Albertini, R., (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Cli. Chim. Acta*, 306, 1 - 17,.

Acworth, I.N., (2003). *The Handbook of Redox Biochemistry*, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA,.

Adams, D.O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:249-256.

Adrian M., Jenadet P., Breuil A., Levite D., Deborg S., Bessis R., (2000). Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wine by direct injection high performance liquid chromatography, *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 37-41,.

Alcalde-Eon C., Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563, 238-254.

Anli R.E., Vural N. (2009) Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules* 14, 289–297

Arnous A., Markis D.P., Kefals P. (2002) Correlation of pigment of flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665.

Aruoma, O.I., (2003). Methodological considerations for Characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mut. Res. Int.*, 523 - 524, 9 - 20,.

Bagchi, K., Puri, S., (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease, *EMHJ*, 4, 350 - 360,.

Bartolome B., Hernandez T., Bengoeches M.L., Quesada C., Gomez-Corovez C. Estrella I. (1996). Determination of some structural features of procyanidins and related compounds by photodiode array detection, *Journal of Chromatography A*, 273, 19-26.

Baxter R.A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation, *Journal Cosmetics*, 7, 2-7.

Becker, E.M., Nissedn, L.R., Skibsted, L.H., (2004). Antioxidante evaluation protocols,: Food quality or health effects, *Eur., Food Res. Technol.*, 219, 561 - 571,.

Benzie I.F.F., Strain J.J., Ferric reducing ability of plasma (FRAP). *Anal. Biochem.*, 1996, 239, 70–76.

Bergqvist J., Dokoozlian N., Ebisuda N. (2001) Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 1-7.

Bragadóttir, M.,(2001). Endogenous antioxidants in fish, A literature review submitted in

partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of science in food science, Department of Food Science, University of Iceland,.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, 1995, 28, 25–30.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-333.

Burns J., Jokota T., Ashihara H., Lea E.J.M., Crozier A. (2002). Plant food and herbal sources of resveratrol, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3337- 3340.

Cabrita, L., Fossen, T., and Andersen, O.M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* 68:101- 107.

Campodoncio P., Barbieri E., Pizarro M., Sotomayor C.P., Lissi E.A., (1998). A comparison between total phenol content of wines and their TRAP values measured by the bleaching of ABTS radical cations, *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 43(3),281-285,.

Cantos E., Garcia-Viguera C., De Pascual-Teresa S., (2000) Tomas-Barberan F.A., Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4606-4612,.

Cao, G., Prior, R.L., (2000). Red wine in moderation: potential health benefits independent of alcohol, *Nutrition and Clinical Care*, 3, 76-82,.

Caridi A., Cufari A., Lavino R., Palumbo R., Tedesco I., (2004)Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine, *Food Technol. and Biotechnol.*, 42(1), 37-40.

Carluccio M.A., Siculella L., Ancora M.A., Massaro M., Scoditti E., Storelli C., Visioli F., Distanto A., De Caterina R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23, 622-629.

Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., and Hermosin-Gutierrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.* 55:992-1002.

Cheinier, V (2006) Flavonoids in wine. In *Flavonoids*, Andersen, O M and Markham, K R (Ed.), pp. 263-318. Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis Group.

Cheinier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.M., SarniManchado, P., and Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:298-305.

Cheyrier V., Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 2012, 11, 153–177.

Choi, H.S., Cha, Y.N., Kim, C., (2006). Taurine chloramine inhibits PMA-stimulated superoxide production in human perhaps by inhibiting phosphorylation and translocation of pS/phox, *Int. Immunopharmac.*, 6, 1431 - 1440,.

- Clifford M.N., Diet-derived phenols in plasma and tissues. *J. Sci. Food Agric.*, 2004, 84, 449–458.
- Connor A.M., Finn C.E., Alspach P.A (2005). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity and total phenolic content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), 527–533.
- Cook N.C., Samman S., (1996). Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nut. Biochem*, 7, 66-76,.
- Crippen D.D., Morrison J.C. (1986). The effects of sun exposure on the compositional development of Cabernet Sauvignon berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 235-247.
- Curhan G.C., Willett W.C., Speizer F.E., Stampfer M.J. (1998). Beverage use and risk for kidney stones in women, *American International Medical*, 128, 534-540.
- Cushnie Y.P.T., Lamb A.J. (2011). Recent advances in understanding of the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99–107.
- Galulejac N.S., Glories Y., Vivas N., (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines, *Food Research International*, 32(5), 327-333.
- Čanadanović-Brunet, J.M., (1997). Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, *Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad*,.
- Deloire A., Lopey F, Carbonneau A. (2002). Reponses de la vigne et terroir: Elements pour une method d’etude. *Le progress Agricole et Viticulture*, 119/4, 78-86.
- Docherty J.J., Fu M.M., Tsai M. (2001). Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 239-246.
- Doll R., (1990) An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer, *Proceeding of Nutrition and Society*, 49, 119-131,.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson J.S. (2003a). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 15-27.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson J.S. (2003b) Synthesis of flavonoids and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Charodnnay (*Vitis Vinifera* L.), *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 110-121.
- Đorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G., (2000). Biohemija slobodnih radikala, *Medicinski fakultet, Niš*,.
- Edelmann, A. and Lendl, B. (2002). Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 124:14741-14747.
- Ewart, A., Gawel, R., (1993). Managing the complexity of Pinot noir. *Aust. Grapegrow. Winemaker* 352, 115-118,.

Falquera V., Forns M., Ibray A. (2012). Effect of Ub-vis irradiation of must on Cabernet Franc and X arello wines chemical quality, *International Journal of Food Science & Technology*, 47/9, 2015-2012.

Fernandez, K. and Agosin, E. (2007). Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 55:7294-7300.

Fernandez-Pachon M.S., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2007). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, 95, 394- 404.

Ferreira V. et al., Wine aroma compounds. *Food Chemistry*, 2000, 68, 113–120.

Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A., (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(3), 1035-1040,.

Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedre P.L: (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 890-894.

Gatellier, P., Anton, M., Renerre, M., (1995). Lipid Peroxidation Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Activated Metmyoglobin and Detection of a Myoglobin-Derived Radical, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 651 - 656,.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4:74-95.

German J.B., Walzem R.L. (2000) The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*, 20, 561–593.

Gil-Munoy R., Vila-Lopey R., Martiney\_Cutillas A. (2010), Anthocyanin profile in Monastrell grapes in six different areas from Denomination of Origen Jumilla during ripening stage, *International Journal of Food Science & Technology*, 45/9, 1870- 1877.

Girotti, A.W., (1998).Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *JLR*, 39, 1529 - 1542,.

Gishen, M., Hand, P.G., Dambergs, R.G., Esler, M.B., Francis, I.L., Kambouris, A., Johnstone, R.S., and Høj, P.B.(2002).Objective measures of grape and wine quality. Blair, R.J., Williams, P.J., and Pretorius, I.S. (Ed.). *Proceedings of the 11th Australian Wine Industry Technical Conference*, pp. 188-194, (Australian Wine Industry Technical Conference Inc, Urrbrae, South Australia).

Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E., and Wrolstad, R.E. (1999). Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 47:4631-4637.

Grotewold E. (2006).*The Science of Flavonoids*, Springer Science, USA.

Halliwell, B., (1990). How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Res. Commun.*, 9, 1 - 32,.

Halliwell, B., (1999). Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end, *Free*

Radical Research, 31, 261 - 272,.

Halliwel , B., Whiteman, M., (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255,.

Harbertson, J.F., Picciotto, E.A., and Adams, D.O. (2003). Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54:301-306.

Harborne J.B., Williams, C.A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*, 18, 310-333.

Haslam, E (2005) Taste, bitterness and astringency. In *Practical polyphenolics*, Haslam, E (Ed.), pp. 195. New York: Cambridge University Press.

Harris V., Jiranek V, Ford C.M., Grbin P.R. (2010) Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 721-729.

Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutic*, 96,67-202.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure.activity relationships, *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572 - 584,.

Henn T., Stehle P:, (1998). Total phenolics and antioxidant activity of comercial wines, teas and fruit juices, *Ernahrungs-Umchau*, 45(9), 308-313,.

Herderich, M.J. and Smith, P.A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11:205-214.

Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis C., Blackburn H (1995). Flavonoid intake and longterm risk coronary health disease and cancer in the seven countries study, *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.

Hosseinian, F., (2006). Antioxidant properties of flaxseed lignans using in vitro model systems, A Thesis for the Degree of Dctor of Philosophy, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada,.

Hou D.X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins, *Current Molecular Medicine*, 3 (2), 149-159.

Hudson, B.J.F., Lewis J.L., (1983).Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils, Structural criteria for activity, *Food Chem.*, 10, 47 - 55,.

Jackson, M.G., Timberlake, C.F., Bridle, P., and Vallis, L. (1978). Red wine quality - correlations between color, aroma and flavor and pigment and other parameters of young beaujolais. *J. Sci. Food Agric.* 29:715-727.

Jackson, R S (1994b). Chemical constituents of grapes and wines. In *Wine science - principles and applications*, (Ed.), pp. 178-219. San Diego: Acedemic press. Jackson, R S (1994a) Fermentation. In *Wine science - principles and applications*, (Ed.), pp. 220-276. San Diego:

Academic press.

Jackson, M.G., Timberlake, C.F., Bridle, P., and Vallis, L. (1978). Red wine quality - correlations between color, aroma and flavor and pigment and other parameters of young beaujolais. *J. Sci. Food Agric.* 29:715-727.

Jackson S.J. (2008). *Wine science principles and applications*, Third edition, Academic press,.

Jackson R.S., (2014). *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press.

Jenadet P., Bessis R., Gautheron B. (1991). Production of resveratrol by grape berries in different development stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42/1, 41-46.

Jeandet P., Bessis R., Maume B.F., Meunier P., Peyron D., (1995). Trollat P., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 316,.

Jones G.V., White M.A., Cooper O.R., Storchmann K.H. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73, 319-343.

Jones G. (2006). Climate change and wine: observations, impacts and future implications. *Wine Industry Journal*, 21, 21-26.

Jordheim, M., Aaby, K., Fossen, T., Skrede, G., and Andersen, O.M. (2007). Molar absorptivities and reducing capacity of pyranoanthocyanins and other anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 55:10591-10598.

Kanofsky, J.R., Hooglandli, H., Weverl, R., Weissll, S.J., (1988). Singlet Oxygen Production by Human Eosinophils, *Biol. Chem.*, 263, 9692 - 9696,.

Katalinić V.M., Milos D., Modun I., Musić M., Boban M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)catechin, *Food Chemistry*, 86, 593-600.

Kennedy N.L., Matthews M.A., Waterhouse A.L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening, *Phytochemistry*, 55, 77-85.

Kennedy, J.A., Ferrier, J., Harbertson, J.F., and Peyrot des Gachons, C. (2006a). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:481-485.

Kennedy, J.A., Saucier, C., and Glories, Y. (2006b). Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:239-248.

Klepacka J., Gujska E., Michalak J. (2011) Phenolic Compounds as Cultivar- and Variety-distinguishing Factors in Some Plant Products. *Plant Foods Human Nutrition*, 66(4), 307–312.

Kow, Y.W., (1999). *Oxidative Stress, DNA Damage and Human Diseases*, Dojindo Newsletters, 2,.

Krstic, M, Moulds, G., Panagiotopoulos, B., and West, S. (2003). *Growin quality grapes to winery specifications - Quality measurement and management for grapegrowers*. Winetitles, Adelaide.

Lapidot T., Harel S., Akiri B., Granit R., Kanner J. (1999). pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 67-70.

Landroult N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G. (2001). Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 311-318.

Lapidot T., Harel S., Akiri B., Granit R., Kanner J. (1999). pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 67-70.

Lee, J., Koo, N., Min, D.B., (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals, *CRFSFS*, 3, 21 - 33,.

Lila, M.A. (2004). Anthocyanins and humans health: In vitro investigative approach, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313.

Liu Q.S., Pilone J.G., (2000). An Overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications, *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 49-61,.

Liu, R.H., Finley, J., (2005). Potential Cell Culture Models for Antioxidant Research, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4311 - 4314,.

Luiz M. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines, *Food Chemistry*, 126, 213–220.

Macheix J.J., Fleuriet A. (1998). Phenolic acids in fruits. In *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans, C.A., Packer, L., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 35-59.

Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J.(1990) *Fruit Phenolics*, CRS: Boca Raton, Fl.

Malešević, Z., (2002). Ispitivanje antioksidativne aktivnosti čajeva elektron spin rezonantnom spektroskopijom, *Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad*,.

Mark L., Nikfardjam M.S., Avar P., Ohmacht R. (2005).A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines. *Journal of Chromatographic Science*, 43/9, 445-449.

Mazza G., Miniati E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, vegetables and Grains*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Mazza, G. (1995). Anthocyanins in Grapes and Grape Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35:341-371.

Mazza G., Fukumoto, P., Delaquis, B., Girard, & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4009-4017.

Meyer, A.S., Yi, O.S., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., Frankel, E.N., (1997). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*), *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1638-1643,

McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M.E.J., Matthews, D., Crozier, A., (1998). Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 368-375,.

Melzoch K., Hanzlikova I., Filip V., Buckiova D., Šmidrkal J., (2001). Resveratrol in Parts of Vine and Wine Originating from Bohemina and Moravian Vineyard Regions, *Agriculturale Conspectus Scientificus*, 66(1), 53-57,.

Merida, J., Moyano, L., Millan, C., Medina, M.,: (1991). Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes, *Vitis* 30:117-127,.

Meyer A.S., Yi O.S., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N. (1997). Inhibition of human low-density lipoproteins oxidation in relation to composition of phenolic antioxidant in grapes (*Vitis vinifera*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1638-1643.

Meiers S., Kmeny D., Weyand U., Gastpar R., Von Anger E., Marko D. (2001). The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 958-962.

Mimić-Oka, J., Simić, D.V., Simić, T.P., (1999). Free radicals in cardiovascular diseases, *Facta Univ., Series: Medicine and Biology*, 6, 11 - 22,.

Minussi R.C., Rossi M., Bologna J., Cordi J., Rotilio D., Pastore M., Duran N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry*, 82, 409-416.

Monagas, M., Bartolome, B., and Gomez-Cordoves, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:85- 118.

Morata, A., Gomez-Cordovez, C., Suarez, J., (2004). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls of *Saccharomyces* during the fermentation of red wines, *XXIX Congreso mundial de la vigne et du vin*, Viena,.

Munoz-Espada A.C., Wood K.V., Bordelon B., Watkins B.A. (2004). Anthocyanin Quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton and Marechal Foch grapes and wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6779-6786.

Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G., (1993). Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production, *Clin. Investig.*, 91, 2546 - 2551,.

Olas B., Wachowicy B. (2002) Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets, *Thrombosis Research.*, 106, 143-148.

Palma M., Taylor L.T. (1999). Fractional extraction of compounds from grape seeds by super-critical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5044-5048.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. (2003) The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett.* 544, 210–213.

Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., and Noble, A.C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* 79:1123-1128.

Percival, M., (1998). Antioxidants, Clinical nutrition insights, Advanced Nutrition Publications, Inc., pp. 1 - 4,.

Pereira D.M., Valentao P., Pereira J.A., Andrade P.B. (2009) Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.

Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 63, 1035 - 1042,.

Piletić, M.V., Milić, B.Lj., Đilas, S.M., (1993). *Organska hemija II deo*, Prometej, Novi Sad,.

Piljac J., Martiney S., Valek L., Stipčević T., Kovačević Ganić K. (2005). A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines, *Food Technology and Biotechnology*, 43 (3), 271-276.

Pokorny, J., Introduction, U: (2001). Antioxidants in Food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22 - 70,.

Pour Nikfardjam M.S., Mark L., Avar P., Figler M., Ohmacht R. (2006). Polyphenols, anthocyanins and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villany region. *Food Chemistry*, 98, 453-462.

Prior R.L., Wu X., Schaich K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 4290–4302.

Radovanović BC, Radovanović AN, Souquet JM (2010a). Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region. *Journal of Science and Food Agriculture*, 90, 2455- 2461

Radovanović B., Radovanović A. (2010b). Free Radical Scavenging Activity and Anthocyanin Profile of Cabernet Sauvignon Wines from the Balkan Region. *Molecules*, 15, 4213-4226.

Radovanovic B, Radovanovic A., Tomic V. (2012a). Relations between the phenolic composition and free radical scavenging and antibacterial activities of red wines from different cultivars of *Vitis Vinifera* L., *International Journal of Food Properties*, 15/ 4, 725-735.

Re R. et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26, 1231–1237.

Revilla E., Alonso E., Kovač V. (1997). The content of catechins and procyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices, *American Chemical Society*, 69-80.

Ribereau-Gayon P., (1982). The Anthocyanins of Grapes and Wines, In *Anthocyanins as Food Colors*, Markakis P. Ed, Academic Press, New York, 209-244,.

Ribéreau-Gayon, P and Glories, Y. (1987) Phenolics in grapes and wines. In *Proceedings of the sixth Australian wine industry technical conference*, Lee, T H (Ed.), pp. 247-256. Adelaide: Australian industrial publishers.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud A. (1988). Red winemaking. In

Handbook of Enology; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, United Kingdom, Vol. 1, 295-358.

Riberau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Ionvaud A. (1999). Handbook of Enology, Vol.1, John Wiley & sons LTD, New York

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2006) Phenolic compounds. In Handbook of enology: Volume 2. The chemistry of wine stabilization and treatments, (Ed.), pp. 141-203. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956,.

Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenklink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Van Zanden, J.J., Van der Woude, H., Alink, G.M., Koeman, J.H., (2002). The prooxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 11, 321 - 333,.

Romero, C., Bakker, J., (1999). Interactions between grape anthocyanins composition and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model systems, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3130-3139,.

Sanchez-Moreno, C., (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, Review: Free Radical Scavenging Activity in Foods, *Food Sci., Tech. Int.*, 8, 121 – 137,.

Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M., Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81, 215S–217S.

Schwarz, M., Picazo-Bacete, J.J., Winterhalter, P., and Hermosin-Gutierrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *J. Agric. Food Chem.* 53:8372-8381.

Shahidi F., Wanasundara P. K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 32, 67–103.

Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., (2001). Introducing natural antioxidants, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22 - 70,.

Singleton V.L., Esau P., (1969). Phenolic Substances in Grapes and Wines, and Their Significance, Academic Press, New York,.

Singleton V.L., (1992). Tannins and the qualities of wines. In: Plant Polyphenols Synthesis, Properties, Significance. R.W. Hemingway and P.E. Laks (Eds.), 859-880, Plenum Press, New York,.

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Calorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphtungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Skogerson, K., Downey, M., Mazza, M., and Boulton, R. (2007). Rapid determination of phenolic components in red wines from UV-visible spectra and the method of partial least squares. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:318-325.

Simonetti P., Pietta P., Testolin G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Science and Food Agriculture*, 45, 1152-1255.

Soleas G.J., Goldberg D.M., (1995). Diamandis E.P., Karumanchiri A., Yan J., Ng E., A derivatized gas chromatographic-mass spectrophotometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 346-352,.

Soleas G.J., Dam J., CXarey M., Goldberg D.M., (1997). Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45(10), 3871-3880,.

Soleas G.J., Tomlinson G., Goldberg, M.D., (1998). Kinetics of polyphenol Release into Wine Must During Fermentation of Different Cultivars, *Journal of Wine Research*, vol. 9 (1), 27 - 41,.

Soleas, G. J., Yan, J., and Goldberg, D. M., (2001). Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 757, 161–172,.

Soleas G.J., Grass L., Josephy P.D., Goldberg D.M., Diamandis E.P. (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35, 119-124.

Somers T.C., Evans M.E., (1977). Wine quality: correlations with phenolic content. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 279–287.

Šaćirović S. et al., (2021). Comparative analysis of antioxidant activity and polyphenolic compounds in wines. *Food Chemistry*.

Šaćirović S. et al., (2019). HPLC analysis of phenolic compounds in wines. *Journal of AOAC International*.

Šaćirović S. et al., (2021). On the origin of antioxidant potential of wines. *Journal of Food Composition and Analysis*.

Taha, M.R.; Khalil, I.E.; Majdi, A. Al-M.; Khalid, I.; Al-Gutha, H.; Yang, W. (2008). Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanins of Different Grape Seed Cultivars Grown in Jordan, *International Journal of Food Properties*, 11(2), 472-479,.

Tian R-R., Pan Q-H., Yhen J-Ch., Li J-M., Wan S-B., Yhang Q-H., Huang W-D- (2009), Comparison of phenyl acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times, *Molecules*, 14, 827-838.

Van Asker, S.A.B.E., van den Berg, D. J. Tromp, M. N. J. L., Griffione, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F., Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* 20 (3), 331-342.

Vaya, J., Aviram, M., (2001). Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications, *Curr. Med. Chem. - Imm., Endoc. & Metab. Agents*, 1, 99 - 117,.

Versari, A., Boulton, R.B., and Parpinello, G.P. (2006). Effect of spectral preprocessing

methods on the evaluation of the color components of red wines using Fourier-transform infrared spectrometry. *Ital. J. Food Sci.* 18:423-431.

Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines, *Food Chemistry*, 95, 394-404.

Vivas N., Glories Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging, *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 103-107.

Wang H., Cao G., Prior R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3495-3500.

Waterhouse A.L., Wine phenolics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2002, 957, 21–36.

Wilson, B., (1993). Bitterness and astringency: studies into phenolic extraction during winemaking. *Aust. Grapegrow, Winemaker* 352, 121-122,.

Wu, D., Cederbaum, A.I., (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage, *Alcohol Res., Health*, 27, 277 - 284,.

Yanishlieva-Maslarova, N.V., (2001). Inhibiting oxidation, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Woodhead Publishing Limited, Eds., Cambridge, England, pp. 22 - 70,.

Yokotsuka K., Michikatsu S., Noboru U., Singelton V.L., (2000). Colour and Seneory Characteristics of Merlot Red Wines Caused by Prolonged Pomace Contact, *Journal of Wine Research*, 11 (1), 7-18,.

Youdim K., McDonald J., Kalt W., Joseph J. (2002). Potential role of dietary flavanoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and anti-inflammatory insults, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (5), 282-288.

Zhou, K., Yin, J.J., Yu, L.L., (2006). ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals, *Food Chem.* 95, 446-457,.

Zirojević, T., Jović S., Čeleketić D., Petrović A., (2002). Slobodni radikali i njihov biološki značaj, *Zbornik radova VI savetaovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, Vrnjačka Banja*, 45-54,.

Zoecklein, B W, Fugelsang, K. C., Gump, B. H., and Nury, F. S. (1995) Phenolic compounds and wine color. In *Wine analysis and production*, (Ed.), pp. 115-151. New York: Chapman & Hall.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Kandidatkinja Sabina S. Šaćirović rođena je 29.04.1991. godine u Novom Pazaru, Republika Srbija. Osnovno i srednje obrazovanje (Medicinska škola, pedijatrijski smer) stekla je u Novom Pazaru. Državni univerzitet u Novom Pazaru, Departman za hemijsko-tehnološke nauke, smer-hemija, upisala je školske 2009/10. godine. Osnovne akademske studije završila je u junu 2013. godine, sa prosečnom ocenom 8,77 (osam, 77/100), odbranivši završni rad pod naslovom "Sinteza i karakterizacija novih kompleksnih jedinjenja gvožđa(III), nikla (II) i kobalta (II) koji sadrže sulfatizol i cefalosporinske antibiotike kao ligande" sa ocenom 10 (deset). 2011. godine na obeležavanju „Dana univerziteta“ proglašena za najboljeg studenta na Departmanu za hemijsko-tehnološke nauke.

Školske 2013/14. godine upisala je master akademske studije na Univerzitetu u Prištini sa sedištem u Kosovskoj Mitrovici, Prirodno-matematički fakultet, smer-hemija, koje je završila sa prosečnom ocenom 9,00 (devet, 00/100). U junu 2014. godine odbranila je master rad pod nazivom "Određivanje nano-količina Cu(II) jona u realnim uzorcima kinetičko-spektrofotometrijskom i komparativnom ICP-OES metodom", sa ocenom 10 (deset).

Doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Prehrambena tehnologija upisala je školske 2014/15. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 8,63 (osam, 63/100). U periodu od februara 2013. do novembra 2014. godine bila je angažovana kao student-demonstrator (saradnik u nastavi) na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru, Departmanu za hemijsko-tehnološke nauke, a od decembra 2014. godine je angažovana kao nastavnik hemije u srednjoj Ekonomsko-trgovinskoj školi u Novom Pazaru. Od septembra 2022. godine je angažovana kao nastavnik hemije još u jednoj osnovnoj školi „Rifat Burdžović-Tršo“ u Novom Pazaru. A od septembra 2024. godine radi i u privatnoj Medicinskoj školi „Hipokrat“.

Kandidatkinja je samostalno ili u saradnji sa drugim autorima do sada objavila ukupno 5 radova od čega 2 rada u Međunarodnom časopisu (kategorija M22 i M23), 2 rad u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (kategorija M24), 2 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (kategorije M33 i M34) i 1 saopštenje na nacionalnom naučnom skupu (kategorija M63).

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Sabina S. Šaćirović

Broj indeksa TH 14/50

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Polifenolni sastav i antioksidativni kapacitet vina od sorti vinove loze Merlot i Cabernet Sauvignon iz različitih geografskih područja

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sabina S. Šaćirović

Broj indeksa TH 14/50

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov rada

Polifenolni sastav i antioksidativni kapacitet vina od sorti vinove loze Merlot i Cabernet Sauvignon iz različitih geografskih područja

Mentor Dr Mališa Antić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Polifenolni sastav i antioksidativni kapacitet vina od sorti vinove loze Merlot i Cabernet Sauvignon iz različitih geografskih područja

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo(CCBY)

2. Autorstvo–nekomercijalno(CCBY-NC)

3.

Autorstvo–nekomercijalno–bezprerada(CCBY-NC-ND)

4. Autorstvo–nekomercijalno –delitipodistimuslovima(CCBY-NC-SA)

5. Autorstvo–bezprerada (CCBY-ND)

6. Autorstvo–deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu.