



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu  
životne sredine



**PROCENA KVALITETA MEDA I  
EKSTRAKCIJA  
HIDROKSIMETILFURFURALA IZ  
MEDA JONSKIM TEČNOSTIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Slobodan Gadžurić

Dr Pavle Jovanov

Kandidat:

Aleksandar Marić

Novi Sad, 2023. godine





КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА<sup>1</sup>

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Александар Марић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Слободан Гацурић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду  Др Павле Јованов, научни саветник, Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Процена квалитета меда и екстракција хидроксиметилфурфурала из меда јонским течностима
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 167 Поглавља 7 Референци 311 Табела 19 Слика 31 Графикона 0 Прилога 3
Научна област:	Хемија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Аналитичка хемија и хемија хране
Кључне речи / предметна	Мед, квалитет меда, антиоксидативни капацитет, антибактеријска активност, антипролиферативна активност,

<sup>1</sup> Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истовестности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

одредница:	јонске течности, екстракција хидроксиметилфурфурала
Резиме на језику рада:	<p>Циљ ове докторске дисертације је сагледавање квалитета узорака меда сакупљених у региону Републике Србије, са подручја Западног Балкана и из неких суседних земаља током три узастопне године (2016–2018) праћењем физичко-хемијских показатеља квалитета, као и неких терапеутских својстава меда (антиоксидативна, антибактеријска и антипролиферативна активност). На основу антиоксидативне и антибактеријске активности узорака меда, сакупљених током друге године, одређени су нови параметри, индекс релативног антиоксидантног капацитета (relative antioxidant capacity index – RACI) и индекс релативне антибактеријске активности (relative antibacterial index – RAI), који су послужили за одређивање новодефинисаног својства – <i>Моћи меда</i>, намењеног за предвиђање здравственог потенцијала меда на основу лако одредивих параметара квалитета меда. Чињеница да до данас не постоје литературни записи о екстракцији 5-хидроксиметилфурфурала (ХМФ) из меда применом јонских течности створила је простор да се испита утицај биодеградибилних холинских јонских течности на формирање двофазних водених система и примена ових система за екстракцију ХМФ из меда. Испитан је утицај анјона синтетисаних јонских течности на грађење двофазних система, код којих је средство за изољавање коришћена неорганска со. Потом, испитана је екстракција ХМФ у овим системима, а применом рачунарских симулација објашњени су механизми екстракције ХМФ применом јонских течности.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	12.09.2019. (Сенат 26.09.2019.)
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	

<p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник: др Маријана Сакач, научни саветник, Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан (ментор): др Слободан Гаџурић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан (ментор): др Павле Јованов, научни саветник, Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Татјана Тртић-Петровић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке Винча, Универзитет у Београду</p> <p>Члан: др Милан Вранеш, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p>
<p>Напомена:</p>	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES**

**KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>**

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Aleksandar Marić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr Slobodan Gadžurić, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad  Dr Pavle Jovanov, Principal Research Fellow, Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad
Thesis title:	Assessment of honey quality and extraction of hydroxymethylfurfural from honey using ionic liquids
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 167 Chapters 7 References 311 Tables 19 Illustrations 31 Graphs 0 Appendices 3
Scientific field:	Chemistry
Scientific subfield (scientific discipline):	Analytical chemistry, Food chemistry
Subject, Key words:	Honey, honey quality, antioxidant capacity, antibacterial activity, antiproliferative activity, ionic liquids, hydroxymethylfurfural extraction

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

<p>Abstract in English language:</p>	<p>The aim of this doctoral dissertation is to review the quality of honey samples collected in the region of the Republic of Serbia, from the Western Balkans and from some neighboring countries during three consecutive years (2016–2018) by monitoring physico-chemical parameters of quality, as well as some therapeutic properties of honey (antioxidant, antibacterial and antiproliferative activity). Based on the antioxidant and antibacterial activity of honey samples collected during the second year, new parameters were determined, the relative antioxidant capacity index (RACI) and the relative antibacterial index (RAI), which were used to determine the newly defined property – <i>Power of honey</i>, intended for predicting the health potential of honey based on easily determined honey quality parameters. The fact that until today there are no literature data on the extraction of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) from honey using ionic liquids directed the investigation of the influence of biodegradable cholinium ionic liquids on the formation of aqueous two-phase systems and the application of these systems for the extraction of HMF from honey. The influence of anions of synthesized ionic liquids on the construction of two-phase systems, in which inorganic salt was used as salting agent, was investigated. Then, the extraction of HMF in these systems was examined, and the mechanisms of HMF extraction using ionic liquids were explained using computer simulations.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on:</p>	<p>12/09/2019 (Senat 26/09/2019)</p>
<p>Defended: (Filled by the faculty service)</p>	
<p>Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)</p>	<p>President: dr Marijana Sakač, Principal Research Fellow, Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>Member (Supervisor): dr Slobodan Gadžurić, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member (Supervisor): dr Pavle Jovanov, Principal Research Fellow, Institute of Food Technology in Novi Sad, University of Novi Sad</p>



	<p>Member: dr Tatjana Trtić-Petrović, Principal Research Fellow, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade</p> <p>Member: dr Milan Vraneš, Full Professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p>
Note:	

# Sadržaj

REZIME.....	1
SUMMARY .....	2
<b>1. UVOD.....</b>	<b>3</b>
<b>2. OPŠTI DEO.....</b>	<b>5</b>
2.1. MED.....	5
2.2. HEMIJSKI SASTAV MEDA .....	6
2.2.1. Šećeri .....	7
2.2.2. Voda.....	9
2.2.3. Proteini.....	9
2.2.4. Organske kiseline .....	12
2.2.5. Vitamini .....	13
2.2.6. Minerali .....	14
2.2.7. Polifenolna jedinjenja .....	15
2.2.8. Isparljiva jedinjenja .....	16
2.3. PARAMETRI KVALITETA MEDA .....	17
2.3.1. Šećeri .....	17
2.3.2. Voda i aktivitet vode.....	18
2.3.3. Slobodna kiselost i pH.....	19
2.3.4. Pepeo i električna provodljivost .....	20
2.3.5. Boja.....	21
2.3.6. 5-Hidroksimetilfurfural .....	22
2.3.7. Aktivnost dijastaze .....	22
2.4. FIZIČKE OSOBINE MEDA .....	23
2.4.1. Viskoznost .....	23
2.4.2. Kristalizacija.....	24
2.4.3. Higroskopnost.....	24
2.4.4. Optička aktivnost.....	25

2.5. STABILNOST MEDA.....	25
2.5.1. Neenzimsko tamnjenje .....	25
2.5.2. 5-Hidroksimetilfurfural .....	28
2.5.3. Ostale promene komponenti meda .....	30
2.6. FARMAKOLOŠKO DELOVANJE MEDA .....	31
2.7. AUTENTIČNOST MEDA.....	35
2.8. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH JEDINJENJA .....	35
2.8.1. Jonske tečnosti.....	37
2.8.1.1. <i>Primena jonskih tečnosti</i> .....	41
2.8.1.2. <i>Ekstrakcije jonskim tečnostima</i> .....	42
2.8.1.3. <i>Jonske tečnosti na bazi holina</i> .....	45
2.8.2. Dvofazni vodeni sistemi .....	47
2.8.3. Ekstrakcije HMF.....	52
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>54</b>
3.1. HEMIKALIJE I RASTVORI.....	54
3.2. MATERIJAL.....	55
3.3. METODE .....	55
3.3.1. Određivanje fizičko-hemijskih parametara meda.....	55
3.3.1.1. <i>Određivanje sadržaja vlage</i> .....	55
3.3.1.2. <i>Određivanje slobodne kiselosti</i> .....	55
3.3.1.3. <i>Određivanje električne provodljivosti</i> .....	56
3.3.1.4. <i>Određivanje pH vrednosti</i> .....	56
3.3.1.5. <i>Određivanje sadržaja pepela</i> .....	56
3.3.1.6. <i>Određivanje sadržaja glukoze i fruktoze</i> .....	56
3.3.1.7. <i>Određivanje sadržaja 5-hidroksimetilfurfurala</i> .....	57
3.3.1.8. <i>Određivanje boje</i> .....	58
3.3.1.9. <i>Određivanje sadržaja minerala</i> .....	58
3.3.1.10. <i>Određivanje sadržaja aminokiselina</i> .....	59
3.3.2. Određivanje antioksidativnog potencijala meda.....	59
3.3.2.1. <i>Određivanje sadržaja ukupnih fenola</i> .....	59
3.3.2.2. <i>Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida</i> .....	60
3.3.2.3. <i>Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida</i> .....	60

3.3.2.4. <i>Određivanje antiradikalske aktivnosti na DPPH</i> .....	60
3.3.3. <i>Određivanje antibakterijske aktivnosti meda</i> .....	61
3.3.4. <i>Određivanje antiproliferativne aktivnosti meda</i> .....	62
3.3.4. <i>Određivanje indeksa relativnog antioksidantnog kapaciteta i indeksa relativne antibakterijske aktivnosti</i> .....	63
3.3.5. <i>Statistička obrada podataka</i> .....	63
3.3.6. <i>Modelovanje veštačke neuronske mreže</i> .....	64
3.3.7. <i>Analiza osetljivosti</i> .....	65
3.3.8. <i>Sinteza jonskih tečnosti</i> .....	65
3.3.9. <i>Određivanje faznih dijagrama</i> .....	66
3.3.10. <i>Priprema ternarnih smeša</i> .....	66
3.3.11. <i>Računarske simulacije</i> .....	66
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	68
4.1. <b>ISPITIVANJE KVALITETA I TERAPEUTSKIH SVOJSTAVA MEDA</b> .....	68
4.1.1. <i>Kvalitet uzoraka meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine</i> .....	69
4.1.1.1. <i>Fizičko-hemijski pokazatelji kvaliteta meda</i> .....	69
4.1.1.2. <i>Analiza glavnih komponenti (PCA) uzoraka meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine</i> .....	76
4.1.1.3. <i>Aminokiselinski profil uzoraka meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine</i> ....	78
4.1.2. <i>Kvalitet uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja</i> .....	82
4.1.2.1. <i>Fizičko-hemijski pokazatelji uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja</i> .....	82
4.1.2.2. <i>Antioksidativni kapacitet uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja</i> .....	86
4.1.2.3. <i>Antibakterijska aktivnost uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja</i> .....	88
4.1.2.4. <i>Korelacije između fizičko-hemijskih parametara, antioksidativnih i antibakterijskih svojstava meda</i> .....	90
4.1.2.5. <i>Izbor parametara modela veštačke neuronske mreže</i> .....	92
4.1.2.6. <i>Parametri RACI, RAI i Moć meda</i> .....	93
4.1.2.7. <i>Analiza glavnih komponenti (PCA)</i> .....	93
4.1.2.8. <i>Model veštačke neuronske mreže (ANN)</i> .....	95
4.1.2.9. <i>Analiza osetljivosti</i> .....	96
4.1.3. <i>Kvalitet uzoraka meda sa područja Zapadnog Balkana</i> .....	97
4.1.3.1. <i>Fizičko-hemijski pokazatelji uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana</i> .....	98
4.1.3.2. <i>Sadržaj ukupnih fenola i antioksidantni potencijal uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana</i> .....	100

4.1.3.3. Antibakterijska aktivnost uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana...	102
4.1.3.4. Antiproliferativna aktivnost uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana .....	105
4.1.3.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana .....	105
4.2. Ekstrakcija HMF iz meda primenom jonskih tečnosti .....	108
4.2.1. Određivanje tečno-tečne ravnoteže dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti sa različitim anjonima.....	109
4.2.2. Primena ispitanih dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti za ekstrakciju HMF iz meda.....	112
4.2.3. Računarske simulacije interakcija jonskih tečnosti sa HMF .....	115
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>120</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>122</b>
<b>7. PRILOG.....</b>	<b>148</b>
BIOGRAFIJA .....	154
BIBLIOGRAFIJA NAUČNIH RADOVA .....	155
PLAN TRETMANA PODATAKA .....	161

## **REZIME**

Cilj ove doktorske disertacije je sagledavanje kvaliteta uzoraka meda sakupljenih u regionu Republike Srbije, sa područja Zapadnog Balkana i iz nekih susednih zemalja tokom tri uzastopne godine (2016–2018) praćenjem fizičko-hemijskih pokazatelja kvaliteta, kao i nekih terapijskih svojstava meda (antioksidativna, antibakterijska i antiproliferativna aktivnost). Na osnovu antioksidativne i antibakterijske aktivnosti uzoraka meda, sakupljenih tokom druge godine, određeni su novi parametri, indeks relativnog antioksidantnog kapaciteta (relative antioxidant capacity index – RACI) i indeks relativne antibakterijske aktivnosti (relative antibacterial index – RAI), koji su poslužili za određivanje novodefinisanog svojstva – *Moći meda*, namenjenog za predviđanje zdravstvenog potencijala meda na osnovu lako odredivih parametara kvaliteta meda. Činjenica da do danas ne postoje literaturni zapisi o ekstrakciji 5-hidroksimetilfurfurala (HMF) iz meda primenom jonskih tečnosti stvorila je prostor da se ispita uticaj biodegradibilnih holinskih jonskih tečnosti na formiranje dvofaznih vodenih sistema i primena ovih sistema za ekstrakciju HMF iz meda. Ispitan je uticaj anjona sintetisanih jonskih tečnosti na građenje dvofaznih sistema, kod kojih je sredstvo za isoljavanje korišćena neorganska so. Potom, ispitana je ekstrakcija HMF u ovim sistemima, a primenom računarskih simulacija objašnjeni su mehanizmi ekstrakcije HMF primenom jonskih tečnosti.

## SUMMARY

The aim of this doctoral dissertation is to review the quality of honey samples collected in the region of the Republic of Serbia, from the Western Balkans and from some neighboring countries during three consecutive years (2016–2018) by monitoring physico-chemical parameters of quality, as well as some therapeutic properties of honey (antioxidant, antibacterial and antiproliferative activity). Based on the antioxidant and antibacterial activity of honey samples collected during the second year, new parameters were determined, the relative antioxidant capacity index (RACI) and the relative antibacterial index (RAI), which were used to determine the newly defined property – *Power of honey*, intended for predicting the health potential of honey based on easily determined honey quality parameters. The fact that until today there are no literature data on the extraction of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) from honey using ionic liquids directed the investigation of the influence of biodegradable cholinium ionic liquids on the formation of aqueous two-phase systems and the application of these systems for the extraction of HMF from honey. The influence of anions of synthesized ionic liquids on the construction of two-phase systems, in which inorganic salt was used as salting agent, was investigated. Then, the extraction of HMF in these systems was examined, and the mechanisms of HMF extraction using ionic liquids were explained using computer simulations.

# 1. UVOD

Med i drugi pčelinji proizvodi prate čoveka kroz istoriju kao verski simboli, hrana i izvor lekovitih materija. Med bi se mogao smatrati prvim funkcionalnim proizvodom koji se koristi u neprerađenom stanju, a sadrži ugljene hidrate (70–80%), vodu (oko 20%) i proteine (1%), ali i niz drugih blagotvornih komponenti – aminokiseline, organske kiseline, enzime, vitamine (dominantno iz grupe B kompleksa), minerale, karotenoide i polifenolna jedinjenja.

Hemijski sastav meda obezbeđuje njegovu visoku hranljivu vrednost, ali i lekovito dejstvo. Naime, terapijska svojstva meda primarno su vezana za delotvornost polifenola, pre svega flavonoida i fenolnih kiselina, koji su zaslužni za njegovu antioksidantnu, antimikrobnu i antiproliferativnu aktivnost.

Kvalitet meda određuje se na osnovu njegovih fizičko-hemijskih karakteristika propisanih nacionalnom i EU regulativom. Republiku Srbiju karakteriše dugogodišnja tradicija u pčelarstvu sa godišnjom proizvodnjom meda od 7000–9000 t i prosečnom godišnjom stopom izvoza meda od 30%. Ove činjenice upućuju na neophodnost kontinuirane kontrole kvaliteta i zdravstvene bezbednosti meda proizvedenog u Srbiji.

Imajući to u vidu, ova doktorska disertacija ima za cilj da pruži uvid u 1) kvalitet najzastupljenijih vrsta meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine (bagremov, suncokretov i livadski med), kao i meda karakterističnog za Republiku Srbiju i okruženje (bagremov, suncokretov, livadski i šumski med), te specifičnih vrsta meda sa teritorije Zapadnog Balkana; 2) elemente koji obezbeđuju zdravstvenu delotvornost meda (antioksidantna, antibakterijska i antiproliferativna aktivnost) i 3) mogućnost predviđanja zdravstvenog potencijala meda korišćenjem parametara određenih u kontroli kvaliteta meda svrishodnih u proceni zdravstvenih svojstava meda, izraženih kao *Moć meda*.

Dodatno, fokus istraživanja doktorske disertacije, s obzirom na učestalost nivoa 5-hidroksimetilfurfurala (HMF) u medu iznad maksimalno dozvoljenog, kao markera zagrevanja,



neadekvatnog skladištenja i falsifikovanja meda, bio je na pokušaju da se pronađu novi načini za ekstrakciju HMF iz meda primenom dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti kao primera novih, zelenih ekstrakcionih tehnika, te da se odrede efikasnosti ovih sistema i objasne mehanizmi ekstrakcije HMF primenom jonskih tečnosti.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. MED

Med je prirodna, slatka supstanca, koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) preradom nektara biljaka (Slika 1). Med se može dobiti i iz sokova sa živih delova biljaka, kao i sakupljanjem ekskreta insekata koji se hrane sisajući sokove sa delova biljaka. Pčele sakupljaju ove sokove, prerađuju ih i dodaju im svoje specifične supstance, dehidriraju ih i odlažu u ćelije saća do sazrevanja.



**Slika 1.** Med

Kada se govori o medu, uglavnom se misli na proizvod dobijen od pčele vrste *Apis mellifera* (Slika 2), mada i druge vrste pčela, pa čak i ose, proizvode i skladište med u košnicama.



**Slika 2.** Pčela vrste *Apis mellifera*

Osnovna podela meda prema poreklu je na nektarski ili cvetni med, koji potiče od nektara medonosnih biljaka, i medljikovac, koji medonosne pčele proizvode koristeći sekret živih delova zimzelenih i četinarskih biljaka ili iz ekskrekta insekata roda *Hemiptera*.

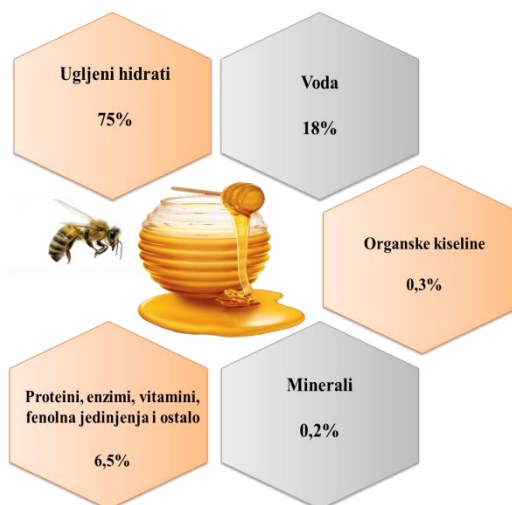
Prema poreklu nektara, odnosno sekreta koje izlučuju biljne žlezde nektarije, nektarski med možemo podeliti na monofloralni (ukoliko u njegovom sastavu dominira nektar određene vrste) i polifloralni (ukoliko njegov sastav čine nektari više biljnih vrsta, u različitim odnosima).

Medljikovac, ili šumski med, je ekskret vrste insekata, biljnih vaši, čiji je usni aparat adaptiran za bušenje biljnog tkiva i usisavanje floemskog soka, koji je bogat hranljivim sastojcima. Medljika se javlja na velikom broju biljnih vrsta, ali uglavnom na drvenastim biljkama. Med koji pčele stvaraju od medljike je veoma cenjen u ljudskoj ishrani.

## 2.2. HEMIJSKI SASTAV MEDA

Med je prirodni proizvod koji sadrži oko 200 različitih jedinjenja (Ferreira et al., 2009). Sastoji se od ugljenih hidrata, vode i drugih komponenata, kao što su proteini (enzimi), organske kiseline, vitamini (posebno vitamin B6, tiamin, niacin, riboflavin i pantotenska kiselina), minerali, pigmenti, fenolna jedinjenja, najrazličitija isparljiva jedinjenja i proizvodi Maillard-ove reakcije i procesa karamelizacije (Slika 3) (Alqarni et al., 2012; Amiry et al., 2017). Sastav, boja, aroma i ukus meda zavise od botaničkog i geografskog porekla meda, klimatskih uslova i vrste pčela koje sakupljaju med, kao i od načina držanja, prikupljanja, tretiranja, manipulacije, pakovanja i uslova skladištenja (Escuredo et al., 2013).

U svrhu razumevanja karakteristika svih komponenti prisutnih u medu, kao i njihovog ponašanja u prolongiranim uslovima skladištenja meda, u tekstu koji sledi prikazana su sva jedinjenja prisutna u medu, njihove hemijske strukture, značaj jedinjenja kao strukturnih konstituenata meda, kao i stabilnost istih pri skladištenju.

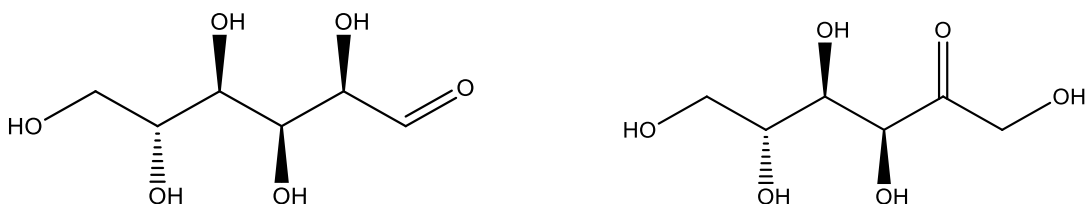


**Slika 3.** Hemijski sastav meda

### 2.2.1. Šećeri

Monosaharidi predstavljaju 75% ukupnih šećera u medu. Pored monosaharida, prisutni su i disaharidi (10–15%), kao i male količine ostalih šećera. Šećeri prisutni u medu su odgovorni za osobine meda kao što su viskoznost, higroskopnost, energetska vrednost i granulacija (Kamal and Klein, 2011).

Sastav šećera zavisi uglavnom od botaničkog i geografskog porekla meda, ali i od klime i procesa prerade i skladištenja (Escuredo et al., 2014; Tornuk et al., 2013). Najzastupljeniji šećeri u medu su monosaharidi, glukoza i fruktoza (Slika 4). Sadržaj glukoze i fruktoze, kao i njihov odnos, predstavljaju korisne pokazatelje za klasifikaciju monofloralnih vrsta meda (Kaškonienė et al., 2010). U većini vrsta meda fruktoza je najzastupljeniji šećer (da Silva et al., 2016), osim u nekim vrstama, kao što su med od uljane repice i maslačka, u kojima dominira glukoza (Escuredo et al., 2014), što dovodi do njegove brze kristalizacije.



**Slika 4.** Molekulske strukture glukoze i fruktoze

Ugljenohidratni profil meda čine, pored fruktoze i glukoze, i monosaharid ramnoza, disaharidi saharoza (uobičajeno oko 1% do čak 4,8%), maltoza, izomaltoza, trehaloza, maltuloza, nigerozna i melibioza, trisaharidi maltotrioza, melezitioza, rafinoza i erloza, tetrasaharid maltotetraoza, kao i palatinoza (De La Fuente et al., 2011). Prema Kaškonienė i saradnicima (2010), u medu su identifikovani fruktoza, glukoza, saharoza, maltoza, izomaltoza, turanoza, trehaloza, palatinoza, celobioza, rafinoza i panoza, s tim da je sadržaj dominantnih šećera meda sledeći: fruktoza 329,2–400,0 mg/g, glukoza 346,0–426,3 mg/g i saharoza 0,7–2,5 mg/g. Kamal and Klein (2011) navode i prisustvo disaharida kojibioze.

Sadržaj pojedinih šećera može da varira tokom skladištenja. Tako se, na primer, sadržaj saharoze snižava za 14% od početnog sadržaja u nestabilizovanom medu skladištenom 24 nedelje na 4 °C, dok je nivo redukcije saharoze bio značajno viši pri skladištenju meda na sobnoj temperaturi – 79% (Rybak-Chmielewska, 2007). Promene sadržaja fruktoze i glukoze su manje upečatljive i podrazumevaju rast od 4% za fruktozu i 1,1% za glukozu u slučaju meda skladištenog na 4 °C, dok su nešto izraženije na 20 °C – 7% u slučaju fruktoze i 8,8% u slučaju glukoze. Stabilizovani med (med tretiran na 100 °C u trajanju od 15 min radi inaktivacije enzima) u eksperimentu praćenja promena sadržaja pojedinih šećera tokom prolongiranog skladištenja trpi izuzetno male promene (0,1–0,2%) (Rybak-Chmielewska, 2007). Vremenom, pored hemijskih promena, može doći i do fizičkih promena koje podrazumevaju tamnjenje meda i promenu njegovog ukusa (da Silva et al., 2016).

Kada se med zagreva ili skladišti duže vreme dolazi do razlaganja pentoza i heksoza reakcijom spore enolizacije i brzom  $\beta$ -eliminacijom tri molekula vode, pri čemu se formiraju neželjeni proizvodi – furani (Chernetsova and Morlock, 2012). Razlaganje pentoza dovodi do nastanka furfurala, dok razlaganjem heksoza nastaje 5-hidroksimetilfurfural (HMF) (Moreira et al., 2010). Ova jedinjenja su glavni proizvodi razgradnje šećera i njihovo pojavljivanje u hrani uobičajeno se vezuje za reakcije neenzimskog tamnjenja, odnosno za Maillard-ovu reakciju, degradaciju šećera u kiseloj sredini i karamelizaciju. Zapravo, ovi furani se koriste kao markeri termički obrađene hrane, kao i furfural alkohol (Moreira et al., 2010). Njihovo prisustvo nije poželjno u medu, ali služi kao pokazatelj gubitka svežine meda usled izlaganja povišenim temperaturama ili dugotrajnom skladištenju (Barra et al., 2010; Castro-Vázquez et al., 2007).

Pored pomenutih jedinjenja, proizvodi degradacije šećera, kao što su 2-acetilfuran, izomaltol i maltol, koji nastaju tokom izlaganja termičkom tretmanu u prisustvu aminokiselina (Jelen,

2016), mogu se akumulirati u medu i doprineti promeni senzorskog profila meda, primarno promeni boje, ukusa i mirisa.

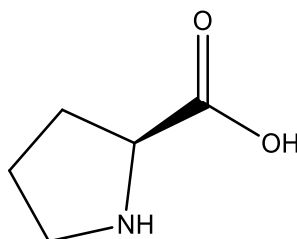
### 2.2.2. Voda

Voda je drugi najzastupljeniji sastojak meda i njen udeo u medu se kreće u rasponu 15–23% (da Silva et al., 2016). Sadržaj vode u medu značajno utiče na neka njegova fizička svojstva (kristalizacija, viskoznost i specifična težina), a zavisi od klimatskih uslova, vlažnosti, temperature vazduha u košnici, uslova prerade i čuvanja, kao i od botaničkog porekla meda (Lazarević et al., 2012). Usled higroskopnosti meda, količina vode u njemu nije stalna, već se prilikom čuvanja, u zavisnosti od vlažnosti vazduha, menja (Zamora and Chirife, 2006).

### 2.2.3. Proteini

Sadržaj proteina u medu varira u zavisnosti od vrste pčela. Tako, na primer, med koji su proizvele azijske medonosne pčele (*Apis cerana*) sadrži 0,1–3,3 % proteina, dok med evroafričkih medonosnih pčela (*Apis mellifera*) sadrži 0,2–1,6% proteina (Won et al., 2009). Proteini i aminokiseline u medu se pripisuju kako animalnim tako i biljnim izvorima (Lee et al., 1985), uključujući fluide i nektar pljuvačnih žlezda i ždrela pčela (Escuredo et al., 2013; Sak-Bosnar and Sakač, 2012), ali osnovni izvor proteina meda je polen. Stoga se aminokiselinski profil meda može smatrati karakterističnim za botaničko poreklo meda (Anklam, 1998; da Silva et al., 2016; Hermosín et al., 2003), mada on varira i u zavisnosti od geografskog porekla (Cometto et al., 2003).

Sadržaj proteina cvetnog meda varira u rasponu od 0,1 do 1,5%, dok u medljiki iznosi oko 3,0% (Czipa et al., 2012; Hermosín et al., 2003). Najzastupljenija aminokiselina u medu je prolin (Slika 5) (Iglesias et al., 2006), koji predstavlja 50–85% sadržaja ukupnih aminokiselina meda (Pawłowska and Armstrong, 1994). Prolin potiče uglavnom iz pljuvačnog sekreta pčela nastalog tokom konverzije nektara u med. Sadržaj prolina u medu se koristi kao kriterijum za procenu sazrevanja meda i, u nekim slučajevima, kao parametar za procenu falsifikovanja meda (Bogdanov and Martin, 2002). Smatra se da je minimalna količina prolina u čistom, nekrivotvorenom medu, 180 mg/kg (Hermosín et al., 2003; Manzanares et al., 2014).



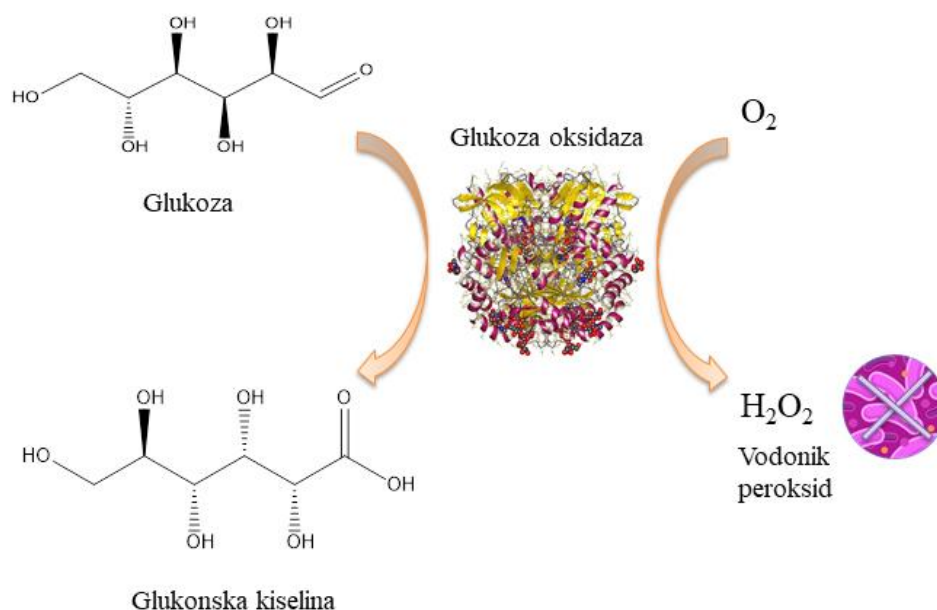
**Slika 5.** Molekulska struktura prolina

Pored prolina, u medu su prisutni glutaminska kiselina, asparaginska kiselina, glutamin, histidin, glicin, treonin,  $\beta$ -alanin, arginin,  $\alpha$ -alanin,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina, tirozin, valin, metionin, cistein, izoleucin, leucin, triptofan, fenilalanin, ornitin, lizin, serin, asparagin i alanin (Hermosín et al., 2003; Kečkeš et al., 2013; Rebane and Herodes, 2010), pri čemu dominiraju glutaminska kiselina, alanin, fenilalanin, tirozin, leucin i izoleucin (Girolamo et al., 2012). U monofloralnim vrstama meda sakupljenim u Srbiji najzastupljenije aminokiseline su prolin, alanin, fenilalanin, treonin i arginin (Kečkeš et al., 2013). Sakač i saradnici (2019a) su ustanovili da je zastupljenost aminokiselina u medu iz Srbije (bagremov i livadski med), pored prolina, glutaminska kiselina > fenilalanin > glicin  $\geq$  serin, dok suncokretov med odlikuju viši novi alanina u poređenju sa serinom.

Deo proteina u medu pripada i enzimima, kao što su invertaza,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozidaza, katalaza, kisela fosfataza, dijastaza i glukoza oksidaza (Sak-Bosnar and Sakač, 2012). Dijastaze su grupa amilolitičkih enzima u koje se ubrajaju  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze, koji hidrolizuju skrob. U medu je prisutna i glukoza oksidaza, koja konvertuje glukozu u  $\delta$ -glukonolakton, koji se hidrolizuje u glukonsku kiselinu. Osim  $\delta$ -glukonolaktona, glukoza oksidaza katalizuje stvaranje vodonik peroksida, za koji je dokazano da deluje baktericidno (Deng et al., 2018; Moreira et al., 2007), što obezbeđuje jedan vid terapijske aktivnosti meda (Slika 6).

Uslovi skladištenja i prerade meda mogu dovesti do stvaranja neželjenih proizvoda usled reakcije karboksilne grupe šećera i slobodnih amino grupa aminokiselina i proteina (Maillard-ova reakcija) (Zhao et al., 2018). Maillard-ova reakcija prethodi stvaranju Amadori jedinjenja, iz kojih nastaju melanoidini tokom skladištenja meda. Aminokiseline podložne nastanku Amadori

jedinjenja, a prisutne u medu, su lizin, prolin,  $\gamma$ -aminobuterna kiselina i arginin (Iglesias et al., 2006; Sakač et al., 2019a).



**Slika 6.** Katalitičko delovanje enzima glukoza oksidaza

Iglesias i saradnici (2006) su analizirali sadržaj slobodnih aminokiselina različitih vrsta nepasterizovanog meda i medljike, skladištenih na sobnoj temperaturi tokom 24 meseca, ustanovivši da se sadržaj asparaginske kiseline,  $\beta$ -alanina i prolina povećava tokom prvih 6 meseci skladištenja. Sadržaj prolina se smanjio nakon šestog meseca, dok je u slučaju asparaginske kiseline smanjenje usledilo nakon dvanaestog meseca skladištenja.  $\beta$ -alanin nije trpeo promene u periodu nakon 6. do 24. meseca skladištenja. Generalno, sadržaj slobodnih aminokiselina smanjio se tokom prvih devet meseci skladištenja, dok nakon 15. meseca nije primećena značajna razlika.

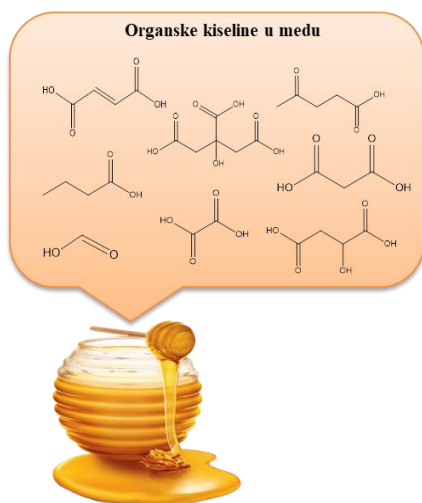
Kvantitativne i kvalitativne promene proteina meda mogu da nastanu i usled stvaranja proteinsko-fenolnih kompleksa u medu skladištenom šest meseci na različitim temperaturama (Brudzinski et al., 2013). Oksidacijom polifenola nastaju hinonske strukture, posebno na povišenim temperaturama, koje lako interaguju sa proteinima, modifikujući njihovu strukturu i veličinu.



## 2.2.4. Organske kiseline

Med se smatra blago kiselom namirnicom, jer sadrži oko 0,57% organskih kiselina (Karabagias et al., 2014). Organske kiseline nastaju iz šećera delovanjem enzima koje luče pčele prilikom procesa pretvaranja nektara u med. Jedna od njihovih glavnih karakteristika je da utiču na boju i ukus meda, kao i hemijske osobine – kiselost, pH vrednost i električnu provodljivost (Mato et al., 2006).

Neke od organskih kiselina koje su prisutne u medu su asparaginska, buterna, limunska, sirćetna, mravlja, fumarna, galakturonska, glukonska, glutaminska, glutarna, glioksilna, 2-hidroksibuterna,  $\alpha$ -hidroksiglutarina, izolimunska,  $\alpha$ -ketoglutarina, mlečna, jabučna, malonska, metil-malonska, levulinska, propionska, piruvinska, kvininska, šikimi, ćilibarna, vinska, oksalna i druge (Slika 7) (Mato et al., 2006).



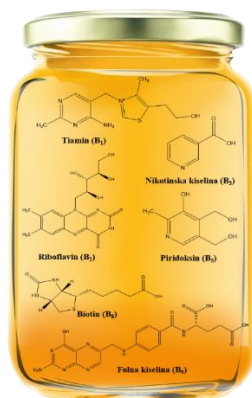
**Slika 7.** Organske kiseline prisutne u medu

Dominantna organska kiselina u medu je glukonska kiselina, čije prisustvo u medu potiče od glukoza oksidaze, koju pčele obezbeđuju tokom zrenja (Karabagias et al., 2014). Pored glukonske kiseline, u medu je prisutna i limunska kiselina, a sadržaji ove dve kiseline se koriste za razlikovanje cvetnog meda od medljike (Mato et al., 2006). Levulinska i mravlja kiselina su, takođe, identifikovane u medu, a nastaju iz HMF nizom reakcija, što dovodi do porasta slobodne kiselosti meda (Cavia et al., 2007).

Slobodna kiselost tokom 15 meseci skladištenja meda ostaje konstantna, sa blagom tendencijom povećanja, koje postaje upečatljivije posle 20. meseca skladištenja (Cavia et al., 2007). Povećanje kiselosti tokom vremena, kao i tokom fermentacije, očekivano je, jer se šećeri i alkoholi u medu pod dejstvom kvasaca transformišu u kiseline (Cavia et al., 2007), čije prisustvo može da naruši kvalitet proizvoda. Dodatno, porast sadržaja organskih kiselina utiče na senzorski profil meda, doprinoseći njegovoj boji i ukusu (Jurado-Sánchez et al., 2011).

### 2.2.5. Vitamini

Med sadrži male količine vitamina, posebno vitamina B kompleksa, koji potiču iz polenovih zrna. Vitamini koji se nalaze u medu uključuju tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinsku kiselinu (B3), pantotensku kiselinu (B5), piridoksin (B6), biotin (B8 ili H) i folnu kiselinu (B9) (Slika 8). Vitamin C je, takođe, prisutan u gotovo svim vrstama meda. Niska pH vrednost meda doprinosi postojanosti vitamina (Bonté and Desmoulière, 2013).



**Slika 8.** Vitamini prisutni u medu

Određivanje sadržaja vitamina C u medu je nepouzđano, jer je ovaj vitamin veoma podložan hemijskoj i enzimskoj oksidaciji i sadržaj mu se menja usled delovanja različitih faktora, kao što su svetlost, kiseonik ili toplota (León-Ruiz et al., 2013). Oksidacija vitamina C vodonik peroksidom koji proizvodi glukoza oksidaza vodi, takođe, sniženju sadržaja ovog vitamina (Ciulu et al., 2011).

## 2.2.6. Minerali

Med sadrži minerale, odnosno makro- i mikroelemente, kao što su kalijum, magnezijum, kalcijum, gvožđe, fosfor, natrijum, mangan, jod, cink, litijum, kobalt, nikl, kadmijum, bakar, barijum, hrom, selen, arsen i srebro (Alkarni et al., 2012), koji obuhvataju grupe minerala važne za ishranu ljudi (Madejczik and Baralkievicz, 2008).

Sadržaj minerala je 0,04% u svetlom medu do 0,2% u tamnom medu (Alkarni et al., 2012) i zavisi od tipa i sastava zemljišta na kome su rasle biljke koje su posećivale pčele, odnosno mineralni profil meda ukazuje na geografsko poreklo meda (Berriel et al., 2019) i može da posluži u proceni autentičnosti meda (Alkarni et al., 2012). Međutim, sastav minerala meda može da posluži i u proceni botaničkog porekla meda (Escuredo et al., 2013). Tako su, na primer, Nalda i saradnici (2005), ispitujući različite vrste meda sakupljnog na teritoriji Španije, identifikovali više sadržaje mangana u medu od vresjaka.

Kalijum je najzastupljeniji mineral u medu, čiji sadržaj odgovara jednoj trećini ukupnog sadržaja minerala u medu (Alkarni et al., 2012; Yücel and Sultanoglu, 2013), dok su u manjim količina prisutni i natrijum, gvožđe, bakar, silicijum, mangan, kalcijum i magnezijum. Teški metali, kao što su arsen, olovo, živa i kadmijum, takođe se mogu naći u medu, pogotovu ukoliko je ispaša pčela vršena u blizini industrijskih područja. Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization – WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu (Food and Agriculture Organization – FAO) zajednički su predložile prihvatljive nivoe od 15 µg/kg za arsen, 25 µg/kg za olovo, 5 µg/kg za živu i 7 µg/kg za kadmijum, koji se primenjuju u određivanju bezbednosti meda i biomonitoringu životne sredine (Bilandžić et al., 2011).

Minerali, za razliku od aminokiselina i vitamina, ne podležu degradaciji prilikom izlaganja povišenim temperaturama, svetlosti, oksidacionim sredstvima, ekstremnim pH vrednostima i drugim faktorima koji utiču na organske materije. U suštini, oni su postojani, što je od značaja, jer su oni komponente esencijalnih enzima koji učestvuju u brojnim metaboličkim reakcijama u ljudskom organizmu (Pohl et al., 2012).

### 2.2.7. Polifenolna jedinjenja

U polifenolna jedinjenja meda ubrajaju se fenolne kiseline i flavonoidi (flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini, izoflavoni i halkoni) (Trautvetter et al., 2009).

Fenolne kiseline se mogu podeliti u dve podgrupe prema strukturi – na derivate hidroksibenzoeve kiseline (*p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska, galna i elaginska kiselina) i derivate hidroksicimetine kiseline (*p*-kumarinska, kafena, sinapinska i ferulna kiselina).

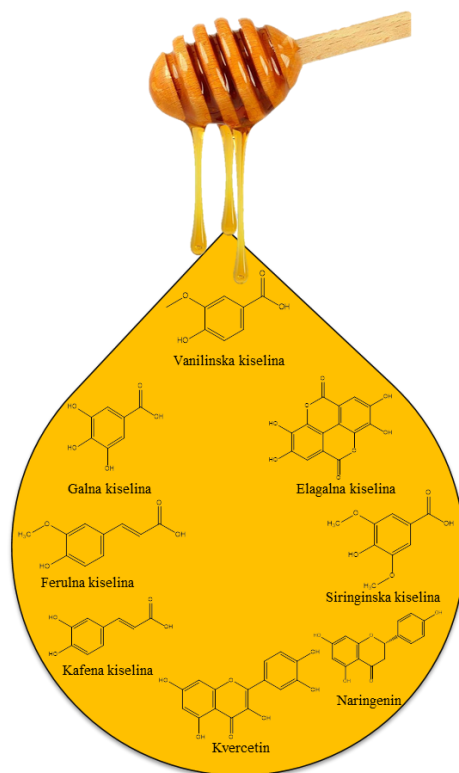
Flavonoidi predstavljaju najveću grupu biljnih fenolnih jedinjenja, koja biljku štite od ultraljubičastog zračenja, patogena i biljojeda. Kada pčele sakupljaju nektar, ova bioaktivna jedinjenja se prenose sa biljaka na med (Silici et al., 2010), pa njihovo prisustvo u medu, između ostalog, služi u određivanju botaničkog i geografskog porekla meda. Flavonoidi značajno doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti meda, obezbeđujući blagotvorne efekte na zdravlje ljudi (Alvarez-Suarez et al., 2012).

Mnogi autori su proučavali profil fenolnih jedinjenja u medu. Kao najzastupljenija fenolna jedinjenja meda detektovana su vanilinska kiselina, kafena kiselina, siringinska kiselina, ferulna kiselina, kumarna kiselina, kvercetin, kempferol, miricetin, pinocembrin, elaginska kiselina, galangin, 3-hidroksibenzoeva kiselina, 4-hidroksibenzoeva kiselina, ruzmarinska kiselina, galna kiselina, hesperetin i druga (Slika 9) (Alvarez-Suarez et al., 2012). Escriche i saradnici (2014) su u uzorcima meda iz Španije identifikovali kafeinsku i *p*-kumarinsku kiselinu i flavonoide naringenin, hesperetin, pinocembrin, krizin, galangin, kvercetin i kempferol.

Antioksidativna aktivnost meda pripisuje se primarno polifenolima (Alves et al., 2013), koji deluju eliminišući slobodne radikale i inhibirajući oksidaciju lipida (Estevinho et al., 2008). Međutim, ukupna terapeutska svojstva meda ne pripisuju se samo antioksidativnoj prirodi njegovih polifenola, nego i njihovim antibakterijskim, bakteriostatičkim, antiinflamatornim, antimutagenim i drugim aktivnostima (Alvarez-Suarez et al., 2013; Cornara et al., 2017; Liu et al., 2013). Pregled dobrobitnih dejstava polifenola meda kada su u pitanju neka degenerativna humana oboljenja može se naći u radu Hossena i saradnika (2017).

Polifenolna jedinjenja podležu degradaciji u zavisnosti od uslova sredine kojima su izloženi. Termička obrada meda rezultira smanjenjem sadržaja galangina, kempferola, miricetina i *p*-kumarinske kiseline (Escriche et al., 2014). Glikozidi su niže stabilnosti od adekvatnih aglikona,

posebno osetljivi na oksidaciju u prisustvu blagih oksidacionih sredstava, kao što je vodonik peroksid, koji je prisutan u medu (Truchado et al., 2008).



**Slika 9.** Polifenolni profil meda

### 2.2.8. Isparljiva jedinjenja

Ukus meda nastaje kao proizvod kompleksnih smeša isparljivih jedinjenja, koje se razlikuju zavisno od vrste nektara, uslova prerade, porekla i skladištenja meda. Monofloralni med ima karakterističan ukus određene biljke usled prisustva specifičnih isparljivih jedinjenja iz nektara (Castro-Vázquez et al., 2007).

Prisustvo isparljivih jedinjenja u medu vodi poreklo, pre svega, iz biljaka. Pčele, takođe, proizvode ili pretvaraju sastojke biljaka u isparljiva jedinjenja. Sadržaj i profil ovih jedinjenja uslovljen je obradom meda po sakupljanju usled prisustva mikroorganizama (Barra et al., 2010). Više od 400 različitih jedinjenja je identifikovano u isparljivoj frakciji meda, a neka se koriste kao markeri komercijalno dostupnih vrsta meda. Tako su, na primer, 3,9-epoksi-1-*p*-mentadieno, *t*-8-*p*-mentan-oksidi-1,2-diol i *cis*-ruža markeri meda od limuna, diketoni, jedinjenja

sumpora i alkani su karakteristični za med od eukaliptusa, dok su heksanal i heptanal dominantna jedinjenja u aromi meda od lavande (Castro-Vázquez et al., 2007).

Složene mešavine isparljivih jedinjenja, prisutne u medu u veoma malim količinama, pripadaju monoterpenima, C13-norizoprenoidu, seskviterpenima, derivatima benzena, kao i alkoholima, estrima, masnim kiselinama, ketonima, terpenima i aldehidima (Pontes et al., 2007). Karbonske kiseline su, takođe, prisutne u medu, pri čemu raspon ukusa varira od dužine njihovog ugljeničnog lanca. Kiseline kratkog lanca, kao što je sirćetna kiselina, doprinose začinskom ukusu, dok se buterna i heksanska kiselina poistovećuju sa ukusom na užeglo (Barra et al., 2010). Alkoholi sa metil-grupama daju svežu notu medu (Castro-Vázquez et al., 2007). Profil isparljivih jedinjenja se tokom skladištenja meda menja u zavisnosti od uslova čuvanja (Moreira et al., 2010). Tako je, na primer, zabeleženo da se sadržaj oktana u isparljivoj frakciji meda povećava sa vremenom skladištenja (Kaškonienė et al., 2008).

## 2.3. PARAMETRI KVALITETA MEDA

Zakonska regulativa kojom je regulisan kvalitet meda je međunarodno definisana Codex Alimentarius-om (2001), koji utvrđuje identitet i osnovne zahteve za kvalitet meda namenjenog za ljudsku ishranu. Na nacionalnom nivou kvalitet meda definisan je Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela (2015), koji je usklađen sa gorepomenutom legislativom. Navedena zakonska regulativa uzima u obzir analizu broja polenovih zrna, senzorska i fizičko-hemijska svojstva meda. U okviru fizičko-hemijskih parametara meda određuju se minimalne ili maksimalne količine u odnosu na parametre zrelosti, čistoće i kvara meda. U pogledu zrelosti meda određuju se sadržaji šećera i vlage, dok se u pogledu čistoće analiziraju sadržaj pepela, električna provodljivost i sadržaj nerastvorljivih čvrstih materija u vodi. U svrhu sagledavanja starosti (skladištenja ili kvara) meda proverava se sadržaj HMF, kiselost i aktivnost dijastaze.

### 2.3.1. Šećeri

Med je bogat šećerima, koji nastaju iz saharoze nektara, koja se transformiše delovanjem enzima  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukozidaze,  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze i  $\beta$ -fruktozidaze. Udeo monosaharida u medu je najveći, u rasponu 65–80% ukupnih rastvorljivih čvrstih materija, pri čemu dominiraju fruktoza

(oko 38,5%) i glukoza (oko 31,0%) (da Silva et al., 2016; Sakač et al., 2019b). Prosečan odnos fruktoze i glukoze je 1,2:1 i u velikoj meri zavisi od nektara, a koristi se za procenu kristalizacije meda, zbog manje rastvorljivosti glukoze u vodi u poređenju sa fruktozom (De La Fuente et al., 2011; Escuredo et al., 2014; Tornuk et al., 2013).

Prema Codex Alimentarius-u (2001), minimalna količina redukujućih šećera u medu je 60 g/100 g. Generalno, na sastav šećera u medu utiču vrste biljaka koje su koristile pčele (botaničko poreklo meda), kao i regionalni i klimatski uslovi (geografsko poreklo meda) (Tornuk et al., 2013).

Pored analize redukujućih šećera, sadržaj saharoze u medu je, takođe, regulisan Codex Alimentarius-om (2001) i iznosi maksimalno 5 g/100 g meda, a analizira se kako bi se identifikovala bilo kakva nepravilna manipulacija medom, kao i u svrhu procene zrelosti meda. Visoki nivoi saharoze mogu ukazivati na 1) različite falsifikate, dobijene dodavanjem jeftinih zaslađivača, kao što su šećer od trske ili rafinisani šećer, 2) rano sakupljanje meda, kada saharoza nije u potpunosti transformisana u glukozu i fruktozu ili 3) produženo veštačko hranjenje pčela saharoznim sirupima, što rezultira visokim komercijalnim dobitima (Escuredo et al., 2013; Puscas et al., 2013; Tornuk et al., 2013).

Camiña i saradnici (2012) su ispitivali autentičnost meda (geografsko i botaničko poreklo) na osnovu sadržaja šećera primenom multivarijantne analize. Naravno, određivane sadržaja šećera u medu je, ipak, najučestalije u cilju otkrivanja falsifikata (Chen et al., 2014). Tako su, na primer, Wang i saradnici (2015) primenom HPLC tehnike omogućili otkrivanje falsifikata meda nastalog dodavanjem šećernih sirupa do količine od 2,5%.

### **2.3.2. Voda i aktivitet vode**

Voda je, pored šećera, najupečatljiviji sastojak meda. Sadržaj vode u medu varira u rasponu 15–21 g/100 g u zavisnosti od botaničkog porekla, stepena zrelosti meda postignutog u košnicama, tehnika prerade i uslova skladištenja (Gallina et al., 2010; Yücel and Sultanoglu, 2013).

Sadržaj vlage je jedna od najvažnijih karakteristika meda, koja utiče na njegova fizička svojstva, kao što su viskozitet i kristalizacija, kao i na druge parametre – boju, ukus, specifičnu težinu, rastvorljivost i konzervaciju (Escuredo et al., 2013). Niži sadržaj vlage može dovesti do

karamelizacije i Maillard-ove reakcije tokom skladištenja meda, dok veći sadržaj vode može izazvati fermentaciju meda i stvaranje sirćetne kiseline (Chirifie et al., 2006), što se smatra nepoželjnim.

Escuredo i saradnici (2013) su ispitali sadržaj vode u 187 uzoraka meda sakupljenih u severozapadnoj Španiji, koji se kretao od 16,9% do 18,0%, te bio u skladu sa zahtevima Codex Alimentarius-a (2001), koji propisuje da sadržaj vlage u medu ne sme biti veći od 20 g/100 g. U slučaju sadržaja vlage u uzorcima meda iz Grčke raspon je iznosio 10,50–20,50% (Karabagias et al., 2014).

Sadržaj vlage u medu može da varira u regionima sa visokom relativnom vlažnošću ili da zavisi od sezone. Shodno tome, veća je verovatnoća da med podleže fermentaciji u kišnoj sezoni, a ne u sušnoj sezoni. Vlaga u medu može da se poveća i tokom procesa prerade proizvoda, kao i zbog neadekvatnih uslova skladištenja, jer je med higroskopan i apsorbuje vlagu iz atmosfere (Karabagias et al., 2014).

Kristalizacija glukoze u medu dovodi do snižavanja sadržaja rastvorljivih čvrstih materija, što rezultira razblaženjem amornog rastvora, čime se povećava aktivitet vode ( $A_w$ ). Aktivitet vode je veoma koristan parametar za predviđanje roka trajanja prehrambenih proizvoda i smatra se relevantnim i za med. Glavni faktori niskog aktiviteta vode u medu su fruktoza, glukoza i različiti disaharidi (Subbiah et al., 2020). Med obično odlikuje  $A_w=0,50-0,65$ , dok vrednosti iznad 0,60 predstavljaju kritični prag za mikrobiološku stabilnost. Iako standardi ne postavljaju ograničenja, poznato je da je vrednost  $A_w$  veoma važna, jer med sadrži osmofilne kvasce koji mogu izazvati fermentaciju, stvarajući etil alkohol i ugljen-dioksid, čime se menja kvalitet meda (Yücel and Sultanoglu, 2013).

### 2.3.3. Slobodna kiselost i pH

Vrednosti pH meda kreću se između 3,2 i 4,5 (Alves et al., 2013; Gomes et al., 2010; Sakač et al., 2019b), iz čega proizilazi da prirodna kiselost meda inhibira rast mikroorganizama, jer je optimalna pH vrednost za većinu mikroorganizama između 7,2 i 7,4 (Suárez-Luque et al., 2002). Određivanje pH vrednosti može da posluži, takođe, za potvrdu falsifikovanja meda u korelaciji sa drugim parametrima kvaliteta/autentičnosti meda. Tako je, na primer, dodatak fruktoznog



kukuruznog sirupa u med iz Brazila rezultirao značajnim povećanjem pH vrednosti u poređenju sa čistim medom (Ribeiro et al., 2014).

Određivanje pH vrednosti meda igra značajnu ulogu tokom ekstrakcije i skladištenja meda, jer ovaj parametar utiče na teksturu, stabilnost i rok trajanja meda (Terrab et al., 2002).

Slobodna kiselost je važan parametar vezan za kvar meda. Ona je posledica prisustva organskih kiselina u ravnoteži sa laktonima, estrima i nekim neorganskim jonima, kao što su fosfati, sulfati i hloridi (Moreira et al., 2007). Codex Alimentarius (2001) definiše da sadržaj slobodne kiselosti ne sme biti viši od 50,00 meq/kg. Više vrednosti mogu ukazivati na fermentaciju šećera u organske kiseline, mada prisustvo različitih organskih kiselina, geografsko poreklo i sezona u kojoj se med sakuplja mogu uticati na kiselost meda (Tornuk et al., 2013). U Portugalu su, na primer, ocenjivane monofloralne vrste meda, a u zavisnosti od geografskog regiona, kao i njihovog botaničkog porekla, ustanovljeno je da su dobijene vrednosti kiselosti bile veće od utvrđene granice (Alves et al., 2013).

Slobodna kiselost i pH vrednost meda nisu u direktnoj sprezi zbog puferskog delovanja različitih kiselina i prisustva minerala (Alqarni et al., 2016).

#### **2.3.4. Pepeo i električna provodljivost**

Sadržaj pepela se određuje radi procene sadržaja minerala prisutnih u medu. Sadržaj minerala može ukazivati na geografsko poreklo, jer zavisi od vrste zemljišta na kome rastu biljke sa kojih je sakupljan nektar (Karabagias et al., 2014; Suárez-Luque et al., 2005), kao i na eventualno zagađenje životne sredine. Može se koristiti i kao parametar za procenu nutritivne vrednosti meda. Kalijum je mineral koji dominira u medu (200–900 mg/kg), jer je njegov udeo u ukupnim mineralima jedna trećina (Alves et al., 2013; Bogdanov et al., 2007) ili čak i više (> 70%) (Fernández-Torres et al., 2005; Vanhanen et al., 2011). Određivanje sadržaja kalijuma može da se iskoristiti u proveru autentičnosti meda. Tako je, na primer, falsifikat meda od limete sadržao manje od 200 mg/kg kalijuma i bio niske električne provodljivosti u poređenju sa čistim medom od limete (Nikolova et al., 2012).

Iako sadržaj pepela nije regulisan zakonskom regulativom, literaturni navodi ukazuju da je prosečan sadržaj pepela u medu 0,17%, u rasponu između 0,02% i 1,03% (Alqarni et al., 2014; Chakir et al., 2011). Sadržaj minerala je u korelaciji sa bojom i ukusom meda, pri čemu veći

sadržaj minerala podrazumeva tamnije vrste meda intenzivnijeg ukusa (Escuredo et al., 2013; Karabagias et al., 2014), što preferiraju potrošači nekih zemalja (npr. Nemačke i Saudijske Arabije). Korelacija između boje, sadržaja minerala i električne provodljivosti meda je pozitivna (Karabagias et al., 2014; Marić et al., 2021).

Električna provodljivost meda je u vezi sa sadržajem pepela (sadržajem minerala) i kiselošću, odnosno ukazuje na prisustvo jona, organskih kiselina i proteina (Yücel and Sultanoglu, 2013). Dakle, što je njihov sadržaj veći, to je veća rezultirajuća provodljivost (Marić et al., 2021). Niske vrednosti električne provodljivosti karakterišu, na primer, bagremov med, kao i sve vrste svetlog meda (Can et al., 2015), dok tamne vrste meda, poput meda od kestena, odlikuje visoka električna provodljivost (Alquarni et al., 2016; Ghidotti et al., 2021).

Električna provodljivost je, takođe, indikator koji se koristi u kontroli kvaliteta meda za razlikovanje cvetnog meda od medljikovca (Feás et al., 2010; Karabagias et al., 2014), obzirom da je Codex Alimentarius-om (2001) propisano da je maksimalna vrednost električne provodljivosti 800,00 mS/cm za cventni med, odnosno identična, ali minimalna, za medljikovac. Ustanovljeno je da postoji izrazita korelacija između sadržaja polena i električne provodljivosti monofloralnog meda (Kaškonienè et al., 2010).

### 2.3.5. Boja

Boja je karakteristika meda koja je od velikog značaja za njegovu komercijalizaciju, odnosno prihvatljivost i preferencije potrošača. Ovaj parametar kvaliteta meda veoma varira, a uglavnom je određen njegovim botaničkim poreklom, sadržajem pepela, temperaturom meda u košnicama i vremenom skladištenja (Gámbaro et al., 2007; González-Miret et al., 2005). Codex Alimentarius (2001) propisuje da boja meda treba da bude od skoro bezbojne do tamnobraon.

Svetloća meda ( $L^*$ ) igra važnu ulogu u opredeljivanju potrošača. Svetle vrste meda generalno se više cene, iako je i tamni med cenjen u određenim regionima (Tuberoso et al., 2014), što ukazuje da prihvatljivost meda od strane potrošača može da varira u velikoj meri (Gámbaro et al., 2007).

Med, takođe, odlikuju udeli crvenog, žutog i zelenog tona. Med od ruzmarina je karakterističan po udelu zelenog tona (negativne  $a^*$  vrednosti), med od mente odlikuje najveća vrednost crvenog tona (pozitivne  $a^*$  vrednosti), a med od eukaliptusa je nešto slabiji po udelu

crvenog tona. Med od timijana, narandže, eukaliptusa i nane odlikuju žuti tonovi, odnosno vrednosti između 10 i 20 za  $b^*$  (da Silva et al., 2017).

### 2.3.6. 5-Hidroksimetilfurfural

Sadržaj HMF je pokazatelj kvara meda, odnosno neadekvatnih uslova skladištenja ili primene termičkog tretmana u svrhu razgradnje kristala meda ili supresije njegove mikrobiološke kontaminacije (Kabbani et al., 2011). Porast temperature termičkog tretmana i vremena skladištenja vodi porastu sadržaja HMF (Bulut and Kilic, 2009). Međutim, sam porast sadržaja HMF ne može se koristiti kao indikator intenziteta/dužine toplotnog tretmana, jer i drugi faktori mogu da utiču na nivoe HMF, kao što su profil šećera, prisustvo organskih kiselina, pH vrednost, sadržaj vlage,  $A_w$  i poreklo nektara. Stoga je sadržaj HMF samo indikator pregrevanja ili neadekvatnih uslova skladištenja (Önür et al., 2018). Dodatno, HMF se može formirati i na niskim temperaturama, čak i u kiselim uslovima, sukcesivnim reakcijama dehidracije šećera (Barra et al., 2010; Castro-Vázquez et al., 2007; Tornuk et al., 2013; Wang et al., 2009).

Visok sadržaj HMF u medu može, takođe, biti pokazatelj falsifikovanja meda dodavanjem invertnog sirupa, kada HMF nastaje zagrevanjem šećera u prisustvu kiseline do inverzije saharoze (Capuano and Fogliano, 2011).

Codex Alimentarius (2001) definiše maksimalan nivo od 40,00 mg/kg za HMF u medu poreklom iz netropskih regiona, odnosno 80,00 mg/kg za med koji potiče iz tropskih predela. Tornuk i saradnici (2013) navode da se nivoi HMF niži od 4,12 mg/kg smatraju adekvatnim za svež med, dok Alqarni i saradnici (2016) smatraju da se količina od 10 mg/kg HMF tretira kao prirodno prisutna u medu.

### 2.3.7. Aktivnost dijastaze

Dijastaze ( $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze) su enzimi prirodno prisutni u medu. Sadržaj dijastaze zavisi od botaničkog i geografskog porekla meda. Uloga dijastaze je da konvertuje skrob u smešu maltoze (disaharida) i maltotrioze (trisaharida). Dijastaza je termolabilna, pa njena aktivnost ukazuje na intenzitet termičkog tretmana ili uslove skladištenje meda (Ahmed et al., 2013). Koristi se kao

indikator starenja meda ili primene agresivnog toplotnog tretmana, pri kome se med podvrgava zagrevanju na temperaturi iznad 60 °C (Yücel and Sultanoglu, 2013).

Aktivnost dijastaze odgovara aktivnosti enzima prisutnog u 1 g meda koji može da hidrolizuje 0,01 g skroba za 1 h na 40 °C, izražen kao dijastazni broj u Gothe jedinicama (Ahmed et al., 2013). Zakonska regulativa predviđa minimalnu vrednost od 8,00 Gothe jedinica za cvetni med (Codex Alimentarius, 2001). Međutim, med sa prirodno nižom aktivnošću dijastaze može da ima najmanje 3 Gothe jedinice ukoliko sadrži do 15 mg/kg HMF (Codex Alimentarius, 2001).

Aktivnost dijastaze u medu može da varira u zavisnosti od starosti pčela, perioda sakupljanja nektara, fiziološkog perioda pčelinjih kolonija, priliva nektara i drugog (Oddo et al., 1999). Tako, na primer, nektar sakupljan u proleće odlikuje niža aktivnost dijastaze (Vorlova and Pridal, 2002). Dodatno, ishrana pčela veštačkim putem rezultira, takođe, niskom aktivnošću dijastaze (Guler et al., 2014).

## **2.4. FIZIČKE OSOBINE MEDA**

Kvalitet meda određen je, pored hemijskih pokazatelja, njegovim fizičkim svojstvima, u koja se ubrajaju kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, električna provodljivost, optička svojstva, indeks refrakcije i specifična masa, a ona su usko povezana sa hemijskim sastavom meda. Pojedini sastojci meda utiču na njegovo određeno fizičko svojstvo ili istovremeno na njih nekoliko. Tako, na primer, od sadržaja vode zavise viskoznost, indeks refrakcije i specifična masa. Optička aktivnost je u sprezi sa sastavom šećera meda, a električna provodljivost zavisi, pre svega, od udela mineralnih materija (Lazaridou et al., 2004).

### **2.4.1. Viskoznost**

Pod viskoznošću se podrazumeva stepen tečljivosti meda. Na viskoznost utiče više faktora, od kojih su najznačajniji sadržaj vode i temperatura. Viskoznost se snižava sa porastom temperature, pri čemu je ovakva zavisnost najizraženija na temperaturama nižim od 15 °C. Ostali faktori koji utiču na viskoznost su vrste medonosnih biljki od kojih potiče nektar, broj i veličina

kristala u medu, kao i sastav šećera (veći udeo di- i trisaharida doprinosi većoj viskoznosti) (Abu-Jdayil et al., 2002).

### **2.4.2. Kristalizacija**

Med je prezasićen rastvor glukoze, koji spontano prelazi u stanje ravnoteže kristalizacijom suviše količine glukoze u rastvoru. Glukoza gubi vodu i prelazi u kristalni oblik, dok voda, koja je bila vezana za glukozu, postaje slobodna. Posledično, dolazi do povećanja sadržaja vode u nekristalizovanim delovima meda, pa med postaje skloniji fermentaciji i kvarenju. Fruktosa, koja je pored glukoze najzastupljenija komponenta u medu, obrazuje tanak sloj oko kristala glukoze. Med menja boju, postaje svetliji i gubi bistrinu, a dolazi i do promene njegovog ukusa. Brzina kristalizacije zavisi od odnosa sadržaja glukoze i fruktoze, sadržaja minerala, proteina i organskih kiselina, kao i od temperature skladištenja i vlažnosti vazduha. Najpovoljnija temperatura za kristalizaciju meda je 10–20 °C, idealna 11–15 °C, a ispod 5 °C i iznad 27 °C ne dolazi do kristalizacije (Škenderov and Ivanov, 1986).

### **2.4.3. Higroskopnost**

Higroskopnost je svojstvo meda da u zavisnosti od vlažnosti vazduha i sadržaja vode u medu zadržava molekule vode. Ovo svojstvo meda potiče od prisustva velike količine šećera. Proces traje do nastanka ravnoteže (58% vlažnosti vazduha i 17,4% vode u medu).

Fruktosa je higroskopnija od glukoze i drugih šećera, pa, samim tim, visok udeo fruktoze čini med higroskopnijim. Čuvanje meda u vlažnim prostorijama izaziva povećanje masenog udela vode i, kao posledica, nastaje med podložniji fermentaciji i kvarenju. Higroskopnost, kao fizička osobina meda, može biti korisna u industriji, u oblastima gde se med koristi kao sredstvo za zadržavanje vlažnosti proizvoda (npr. prehrambena i kozmetička industrija) (Da Costa and Pereira, 2002; Škenderov and Ivanov, 1986).

#### 2.4.4. Optička aktivnost

Med je optički aktivan, jer sadrži hiralna jedinjenja, pre svega šećere. Ukupna specifična rotacija meda zavisi od sadržaja i odnosa različitih šećera u njegovom sastavu. U cvetnom medu dominantan šećer je fruktoza, koji ima negativnu specifičnu rotaciju ( $-92,4^\circ$ ), pa je i ukupna specifična rotacija meda negativna. Za razliku od cvetnog meda, medljikovac sadrži veće količine oligosaharida, uglavnom trisaharida, što rezultira pozitivnom optičkom rotacijom (Dinkov, 2003).

### 2.5. STABILNOST MEDA

Sastav meda uslovljava da tokom skladištenja dolazi do variranja u profilu njegovih komponenti. Ove promene utiču na nutritivne i senzorske karakteristike meda koje mogu biti povezane sa reakcijama kao što je reakcija neenzimskog tamnjenja, katalizovana zagrevanjem i prouzrokovana uslovima dugotrajnog skladištenja (Martins et al., 2001).

#### 2.5.1. Neenzimsko tamnjenje

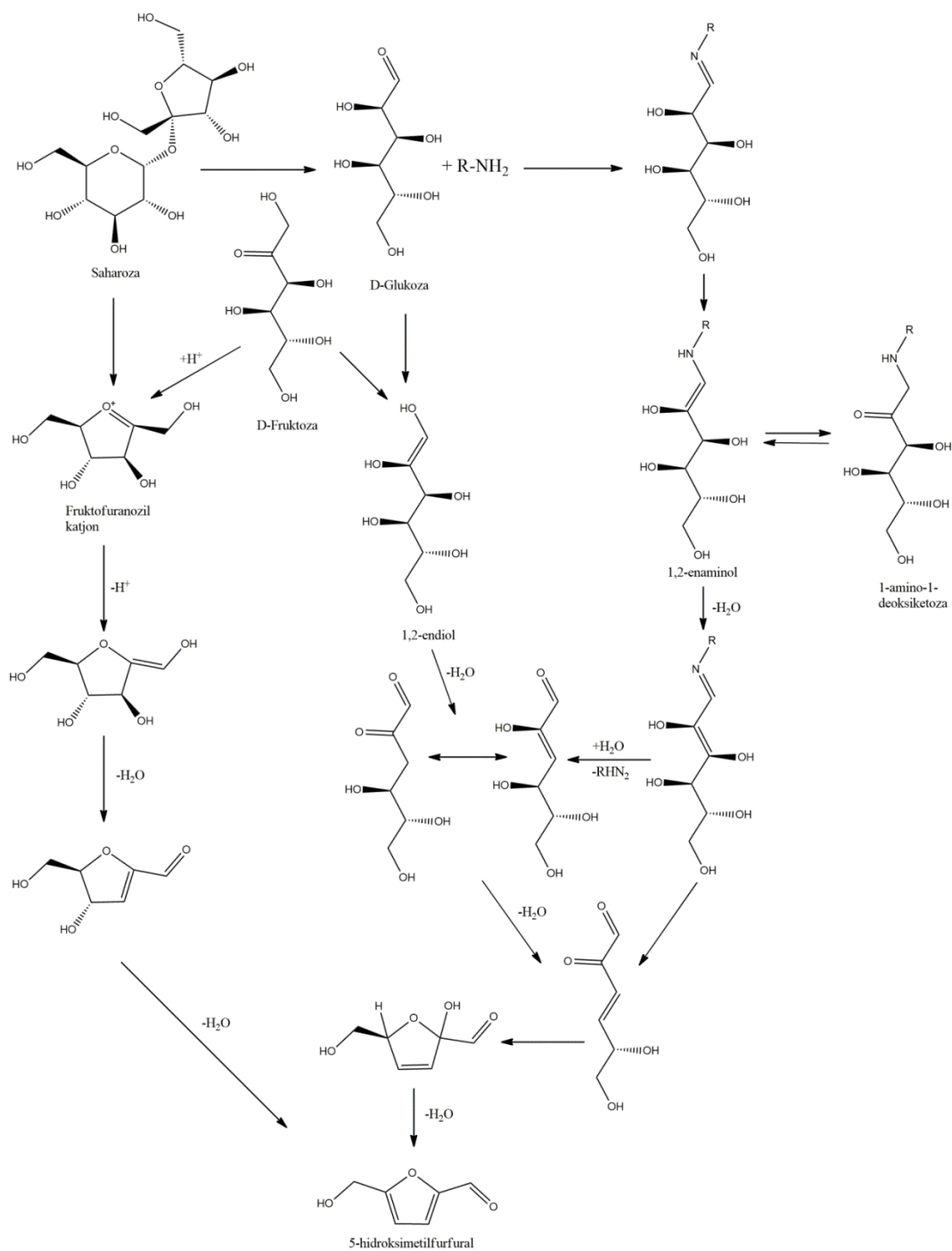
Neenzimsko tamnjenje hrane je jedan od čestih fenomena u hemiji hrane, tokom koga se formiraju nosioci žute, crvene i braon boje i razvijaja paleta ukusa (Wang et al., 2001). Proizvodi reakcije neenzimskog tamnjenja nastaju sporo tokom skladištenja ili brže na visokim temperaturama. Neenzimsko tamnjenje u velikom broju slučajeva predstavlja negativnu pojavu koja dovodi ne samo do promene boje hrane, nego i do drugih promena, poput degradacije sastojaka hrane (aminokiseline, askorbinska kiselina), smanjenja svarljivosti proteina, a u čestim slučajevima i do stvaranja veoma toksičnih jedinjenja (Kim and Lee, 2008). Međutim, neenzimsko tamnjenje hrane ne predstavlja uvek negativnu pojavu, pa se često uslovi obrade hrane podešavaju kako bi favorizovali tamnjenje, jer je ono preduslov za prihvatljivost nekih gotovih proizvoda od strane potrošača (pekarski proizvodi, pečeno meso, pržena kafa).

Kada se reakcije neenzimskog tamnjenja odvijaju bez prisustva azotnih jedinjenja, one se nazivaju reakcije karamelizacije, a kada se odvijaju u prisustvu azotnih jedinjenja one se nazivaju karbonil-amin reakcije ili Maillard-ova reakcija. Dakle,

1. **Reakcije karamelizacije:** transformacija i degradacija šećera bez prisustva amino jedinjenja. Proces karamelizacije obuhvata reakcije enolizacije, izomerizacije, dehidratacije, fragmentacije i polimerizacije, pri čemu nastaju pigmenti svetložute do crne boje.
2. **Maillard-ova reakcija:** reakcija između amino grupa slobodnih aminokiselina/proteina i karbonilnih grupa redukujućih šećera. Interakcije između ovih grupa dovode do odigravanja niza reakcija koje su podeljene u 3 faze – inicijalnu, naprednu i finalnu fazu.

Maillard-ova reakcija podrazumeva da redukujući šećeri reaguju reverzibilno sa aminima formirajući Šifovu bazu, iz koje može nastati N-supstituisani glikozilamin. Izomerizacija aldoza stvara aldozilamine, dok izomerizacija ketoza stvara ketozilamine. Šifova baza podleže konverziji u Amadori jedinjenja, ključne intermedijere u reakciji tamnjenja. Nastanak Amadori proizvoda odlikuje inicijalnu fazu reakcije neenzimskog tamnjenja, tokom koje ne dolazi do tamnjenja. Aldozilamini podležu Amadorijevom premeštanju prelazeći u ketozilamine, dok se ketozilamini transformišu u aldozilamine (Heins-ovo premeštanje ili reverzno Amadori premeštanje). Reakcijama dehidratacije nastaju intermedijeri, posebno u sredini čija je  $\text{pH} \leq 5$ , derivat furana nastao od heksoza, odnosno 5-hidroksimetilfurfural (HMF) i/ili derivat nastao od pentoza, furfural (Slika 10). U slučaju viših pH vrednosti ( $\text{pH} \geq 5$ ), reaktivni ciklični proizvodi (HMF i drugi) polimerizuju brzo do tamno obojenih, nerastvornih jedinjenja koja sadrže kiseonik, što odlikuje završnu fazu reakcije neenzimskog tamnjenja.

Dakle, HMF se formira kao intermedijer u Maillard-ovoj reakciji i direktnoj dehidrataciji šećera u kiseloj sredini tokom termičke obrade namirnica ili tokom dužeg skladištenja (Barra et al., 2010; Tornuk et al., 2013; Wang et al., 2009). 3-Deoksiozon je poznat kao ključan intermedijer u formiranju HMF, a nastaje 1,2-enolizacijom i dehidratacijom glukoze ili fruktoze. Slika 10 ilustruje alternativan put nastanka HMF u hrani, pod dejstvom toplote i u uslovima niske vlažnosti, koji podrazumeva formiranje visokoreaktivnog fruktofuranozil katjona, koji se može brzo konvertovati u HMF pri niskom pH ( $\text{pH} < 5$ ), kao u slučaju meda (Capuano and Fogliano, 2011).



**Slika 10.** Stvaranje 5-hidroksimetilfurfurala

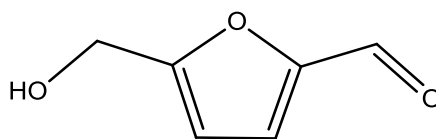
Maillard-ova reakcija prouzrokuje smanjenje nutritivne vrednosti namirnica, jer vodi destrukciji esencijalnih aminokiselina, na primer, lizina, obzirom da  $\epsilon$ -amino grupa lizina reaguje sa šećerima i drugim amino kiselinama, kao što su L-arginin i L-histidin (Martins et al., 2001).



Tamna boja meda može da nastane tokom skladištenja, a posledica je povišenih temperatura skladištenja i sastava meda (Önür et al., 2018). U nekim slučajevima, med se podvrgava toplotnoj obradi da bi se inhibirao ili usporio proces njegove kristalizacije ili da bi se blokirao rast i razvoj mikroorganizama, kao i tokom punjenja ili ekstrakcije, u cilju postizanja odgovarajućih reoloških osobina, odnosno tečljivosti (Vaikousi et al., 2009). Primena toplotnog tretmana meda vodi porastu sadržaja HMF (Ramirez Cervantes et al., 2000).

### 2.5.2. 5-Hidroksimetilfurfural

Med se dobija primenom različitih fizičkih operacija (presovanje, centrifugiranje, ceđenje) i egzistira u različitim formama na tržištu (saće, med sa saćem, kristalizovani ili granulirani med, kremasti, termički obrađen med). Sirovi med sadrži strane materije, kao što su polen, tragovi voska, osmotolerantni kvasci i kristali dekstroza hidrata. Med ne podleže fermentaciji osim ako je njegov sadržaj vlage ispod 17%. Tokom vremena, odnosno skladištenja, med je sklon kristalizaciji ukoliko se ne preduzmu mere da se ona spreči (Kabbani et al., 2011). Prerada meda uključuje kontrolisano zagrevanje za uništavanje kvasca i rastvaranje kristala dekstroze, ceđenje ili filtriranje. Med se obično zagreva na 32–40 °C da bi mu se snizio viskozitet, što olakšava ekstrakciju, ceđenje ili filtraciju. Navedena temperatura termičke obrade je slična onoj u košnicama, te ne deluje na med tokom relativno kratkog perioda obrade. Međutim, postoje tretmani koji podrazumevaju više temperature zagrevanja kako bi se povećala tečljivost meda ili ostvarila pasterizacija, koje dovode do formiranja degradacionog proizvoda meda – 5-hidroksimetilfurfurala (Slika 11) (Bulut and Kilic, 2009; Rizelio et al., 2012).



**Slika 11.** Molekulska struktura 5-hidroksimetilfurfurala

5-Hidroksimetilfurfural se formira kao intermedijer u Maillard-ovoj reakciji i direktno, dehidratacijom šećera u kiseloj sredini (karamelizacija) tokom termičkih tretmana meda (Barra et al., 2010; Martins et al., 2001). U kiselim uslovima, HMF se može formirati i pri niskim

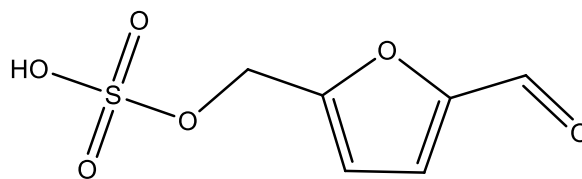
temperaturama, iako se njegov sadržaj drastično povećava sa temperaturom (Kim et al., 2008). Osim temperature, količina formiranog HMF zavisi i od pH vrednosti, aktivnosti vode, kao i od koncentracije dvovalentnih katjona u medijumu (Capuano and Fogliano, 2011).

Ograničena dostupnost i relativno visoka cena meda prouzrokovali su da se med falsifikuje, upotrebom jeftinih zaslađivača, poput šećera od šećerne trske ili šećerne repe, kukuruznog, fruktoznog ili maltoznog sirupa, kao i invertnog šećera (da Silva et al., 2016; Ghidotti et al., 2021). Upravo se kvantifikacija HMF u medu prvobitno koristila kao pokazatelj dodavanja invertnog šećera u med. Naknadno je HMF postao marker zagrevanja i neadekvatnog skladištenja meda.

Fallico i saradnici (2004) određivali su sadržaj HMF u četiri vrste svežeg meda, ustanovivši da je iznosio 5,95 mg/kg u medu od citrusa, 1,23 mg/kg u medu od vresjaka, dok je u medu od eukaliptusa i kestena bio ispod praga detekcije. Isti autori su, takođe, ispitivali i uticaj različitih temperatura zagrevanja na sadržaj HMF, utvrdivši da je količina nastalog HMF u vezi sa botaničkim poreklom meda pri tretmanu na temperaturi 50 °C. Međutim, povećanjem temperature do 100 °C sve vrste meda podlegle su nastanku značajnih količina HMF, koje su isključivo zavisile od vremena zagrevanja. Dodatno, pokazalo se da je nastajanje HMF pri nižim temperaturama bilo u korelaciji sa pH vrednošću meda. Tako, na primer, u kestenovom medu, koji je imao najvišu pH vrednost, nije došlo do nastajanja HMF ni nakon 144 h zagrevanja na temperaturi od 50 °C, dok su u drugim vrstama meda nastale određene količine u zavisnosti od vremena zagrevanja, udela kiselina i pH vrednosti meda (Fallico et al., 2004).

Bath i Singh (1999) su, takođe, zagrevali dve vrste meda na 70 °C tokom 60 minuta, pri čemu su zabeležili porast udela HMF sa 4,45 na 7,66 mg/100 g, odnosno sa 1,23 na 3,1 mg/100 g i zaključili da sadržaj formiranog HMF korelira sa pH vrednošću meda.

*In vitro* toksikološke studije pokazale su da je HMF u velikim koncentracijama citotoksičan, izaziva iritaciju očiju, gornjeg respiratornog trakta, kože i sluzokože. *In vitro* eksperimenti na životinjama pokazali su da izloženost većim koncentracijama HMF može prouzrokovati karcinom kože, tumore na bubrezima, kao i da povećava učestalost hepatocelularnih adenoma. HMF se može konvertovati u citotoksičan i mutageni 5-sulfoksimetilfurfural (Slika 12) (Capuano and Fogliano, 2011), jedinjenje koje je mutageno po konvencijalnom Ames testu. Smatra se da je upravo 5-sulfoksimetilfurfural glavni inicijator za nastanak tumora kože, kao i da je zaslužan za nastajanje oštećenja na jetri i bubrezima (Capuano and Fogliano, 2011).



**Slika 12.** Molekulska struktura 5-sulfoksimetilfurfurala

Neželjena dejstva koja prouzrokuje HMF, kao i pokušaji da se spreči kristalizacija meda koja podrazumeva termički tretman tokom koga se HMF stvara, rezultirali su eksperimenata kojima se pokušava supresirati pojava kristala i nastanak ovog jedinjenja. Stoga su Önür i saradnici (2018), kao alternativu termičkoj obradi, pokušali da med tretiraju ultrazvučnim talasima i visokim hidrostatičkim pritiskom (high hydrostatic pressure – HHP) i došli do saznanja da se prilikom ultrazvučnog tretmana sprečava kristalizacija meda, dok HHP tretman obezbeđuje i niže sadržaje HMF u poređenju sa zagrevanjem. Ultrazvučni tretman u istu svrhu primenili su i Quintero-Lira i saradnici (2017), utvrdivši, takođe, da ovaj tretman ne utiče na sadržaj HMF, mada značajno deluje na veličinu kristala, boju i polifenolni profil meda.

Stoga, HHP tretman može biti korisan za postizanje stabilnog roka trajanja, a, istovremeno, sprečava ili minimizira stvaranje HMF i obezbeđuje kvalitet i nutritivne karakteristike meda.

### 2.5.3. Ostale promene komponenti meda

Med je namirnica koja tokom skladištenja trpi mnoge promene u svom sastavu koje se obično dešavaju usled različitih hemijskih reakcija, uključujući fermentaciju, oksidaciju i termičku obradu (Moreira et al., 2010).

Ugljovodonici, iako niskoreaktivna jedinjenja, podležu smanjenju sadržaja u medu, što je, najverovatnije, rezultat njihove isparljivosti. Dodatno, oksidativni procesi koji se mogu javiti tokom skladištenja pretvaraju ugljovodonike u kiseonična jedinjenja, kao što su alkoholi, koji brzo isparavaju. Povećani sadržaj alkohola tokom skladištenja meda može biti posledica njihovog stvaranja oksidativnom degradacijom lipida ili redukcijom koju katalizuje aldehid reduktaza poreklom iz pčela ili kontaminirajućih mikroorganizama (Moreira et al., 2010).

Kaskoniene i saradnici (2008) su identifikovali etanol u uzorcima meda iz Litvanije, čije se prisustvo može objasniti razvojem kvasca u hrani koja sadrži šećere, kakav je med. Isti autori navode da se različiti aldehidi i ketoni mogu formirati oksidacijom masnih kiselina u medu, posebno linolne i linolenske kiseline, koji mogu usloviti užeglost.

Sadržaji nekih organskih kiselina, ketona i benzena, kao što su 2-hidroksi-2-propanon, buterna kiselina, benzil-alkohol ili 2-feniletanol, identifikovanih u svežem medu, rastu sa povećanjem temperature i vremena skladištenja (Barra et al., 2010). Međutim, niskomolekularne kiseline, kao što su propionska i 2-metilpropionska kiselina, trpe gubitke tokom 6 meseci skladištenja meda, najverovatnije jer spadaju u jedinjenja kratkih ugljeničnih lanaca, što olakšava njihovo isparivanje (Moreira et al., 2010).

Kaskoniene i saradnici (2008) su detektovali gubitke volatilnih jedinjenja od čak 30% nakon samo 3 meseca skladištenja meda. Suprotno navedenom, med od uljane repice karakterisao je porast sadržaja isparljivih materija, najverovatnije prouzrokovan stvaranjem novih jedinjenja. Ustanovljeno je da promene fizičkih karakteristika meda, kao što su promene konzistencije, reoloških svojstava i kristalizacija, mogu imati značajan uticaj na oslobađanje isparljivih jedinjenja.

## 2.6. FARMAKOLOŠKO DELOVANJE MEDA

Med se koristi u terapeutske svrhe još od antičkih vremena. Rane civilizacije ostavile su pisane dokumente o korišćenju meda kao hrane ili kao simbolu korišćenom u religioznim, magijskim i isceliteljskim ritualima. Postoje indicije da se koristio još u starom Egiptu za lečenje rana, izazivanje mokrenja, kao i za smanjenje telesne težine. Galen, veliki rimski lekar, smatrao je da je med dobar lek za sve vrste trovanja i crevnih bolesti.

Savremena istraživanja su potvrdila da med ispoljava mnogobrojne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje, te, stoga, danas postoje mnogobrojni komercijalno dostupni proizvodi na bazi meda, koji se koriste kao terapeutici za prevenciju i lečenje mnogih bolesti.

Terapeutsko delovanje meda je primarno posledica njegove antioksidativne prirode, dominantno proistekle iz prisustva, odnosno delotvornosti polifenolnih jedinjenja, pre svega flavonoida (apigenin, kvercetin, miricetin, pinocembrin, hesperetin) i fenolnih kiselina (kafena, ferulna, sinigrinska, galna, *p*-kumarinska kiselina i druge), ali i askorbinske kiseline, karotinoida,

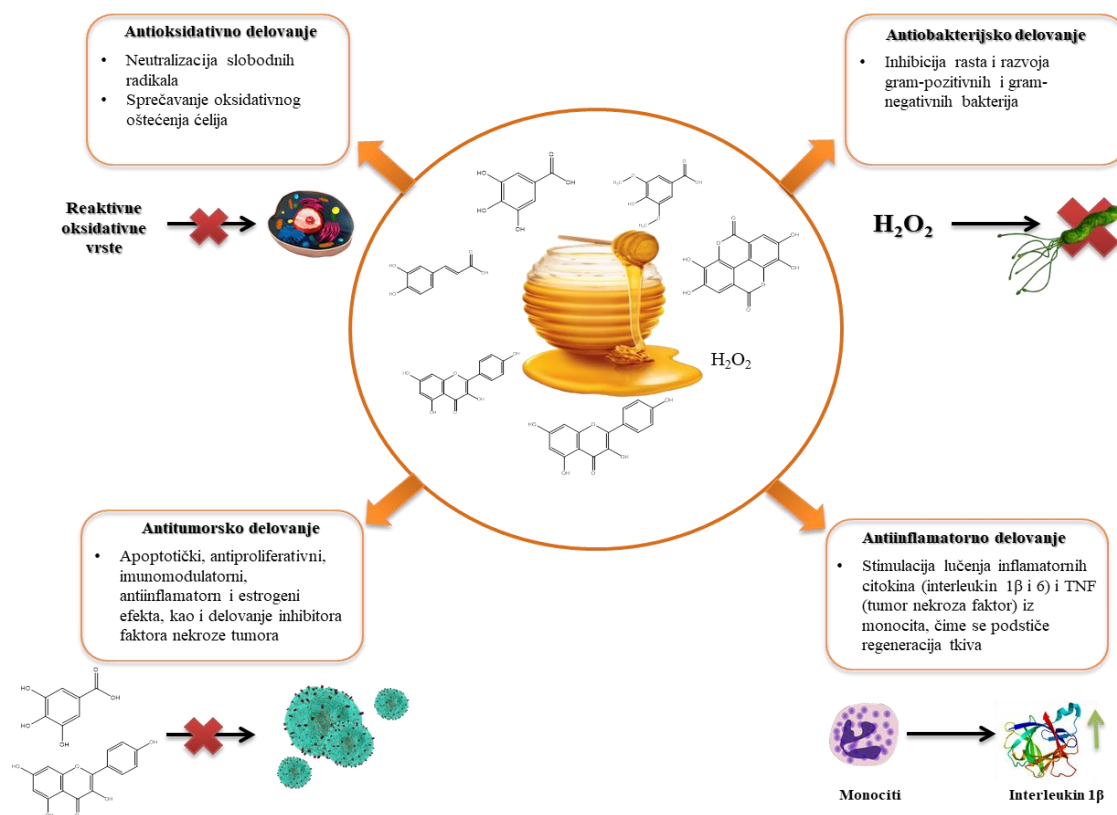
organskih kiselina, proizvoda Maillard-ove reakcije, aminokiselina, peptida, proteina i selen (Cornara et al., 2017; Estevinho et al., 2008). Flavonoidi upečatljivo doprinose ukupnoj antioksidativnoj delotvornosti meda, obezbeđujući dobrobitno delovanje u slučaju mnogih bolesti (Alvarez-Suarez et al., 2012), ali je od značaja i antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina prisutnih u medu (Trautvetter et al., 2009). Ova jedinjenja smanjuju rizik od oksidativnog oštećenja ćelija ljudskog organizma, koja nastaju delovanjem slobodnih radikala i tako sprečavaju ili ublažavaju nastanak mnogih bolesti (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Tako je, na primer, antitumorski efekat meda od korijandera, utvrđen korišćenjem EAC modela sa miševima (Ehrlich Ascites Carcinoma model), pripisan njegovom antioksidativnom delovanju/prisustvu polifenola (Hegazi et al., 2014).

Potencijal delovanja polifenola meda u slučaju tretmana niza degenerativnih bolesti predstavljen je u radu Hossen i saradnika (2017). Međutim, ukupna terapijska svojstva meda ne podrazumevaju samo njegovu antioksidativnu prirodu, već i antibakterijsko, bakteriostatsko, antiinflamatorno, antimutageno, antitrombičko, antiaterogeno i druga dejstva (Slika 13) (Alvarez-Suarez et al., 2013; Rao et al., 2016; Talebia et al., 2020).

Mnogobrojna naučna istraživanja potvrdila su inhibitorski efekat meda na rast i razvoj bakterija i gljivica. Antibakterijsko dejstvo meda uglavnom podrazumeva inhibiciju rasta i razvoja gram-pozitivnih bakterija (Sweda, 2017). Tako su, na primer, Sakač i saradnici (2022), ispitujući antibakterijsko delovanje različitih vrsta meda na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, ustanovili sledeću hijerarhiju rezistencije: *Escherichia coli* > *Escherichia coli* ATCC 8739 > *Enterococcus faecalis* > *Proteus mirabilis* > *Staphylococcus aureus*, koja potvrđuje značajno intenzivnije dejstvo meda na gram-pozitivne bakterije. Junie i saradnici (2016) su, takođe, proučavali antimikrobnu aktivnost 10 različitih uzoraka meda i ustanovili da su najosetljivije bakterije na delovanje meda bile *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Nemo i Bacha (2021) ističu da je *Staphylococcus aureus* najosetljivija među istraživanim bakterijama kada je u pitanju antibakterijska aktivnost meda. Slična delotvornost zabeležena je i u istraživanjima Farkasovske i saradnika (2019) i Szweđe (2017). Različita osetljivost gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija na antibakterijsku aktivnost meda proizilazi iz razlike sastava njihovih ćelijskih zidova. U poređenju sa gram-negativnim bakterijama, gram-pozitivne bakterije nemaju spoljnu membranu koja bi štitila peptidoglikanski

sloj, što olakšava prodiranje i izaziva oštećenja prouzrokovana antimikrobnim agensima (Matzen et al., 2018).



Slika 13. Farmakološko delovanje meda

Antibakterijska svojstva meda mogu se pripisati individualnom ili sinergetskom delovanju kiselosti i osmolarnosti meda (Bogdanov, 1997; Bose, 1982), kao i prisustvu vodonik peroksida, koji se generiše konverzijom glukoze posredstvom glukoza oksidaze iz meda (Deng et al., 2018). Međutim, enzim katalaza katalizuje degradaciju vodonik peroksida, te, stoga, med sa visokom aktivnošću katalaze ima slabo antibakterijsko delovanje. Prisustvo polifenola meda, takođe, doprinosi antibakterijskoj aktivnosti meda (Güneş et al., 2017; Leyva-Jimenez et al., 2019). Dokazano je da metil-siringat ispoljava antiradikalnu aktivnost na superoksid anjon radikale i tako deluje kao antibakterijski agens u medu (Almasaudi et al., 2017). Takođe, utvrđeno je da i neka druga jedinjenja, poput metilglioksala iz manuka meda, deluju antibakterijski (Szweda, 2017).

Kandida je gljivica koja prouzrokuje bolesti kože i sluzokože i visoko je otporna na antifungalne lekove. Lima i sardanici (2022) su utvrdili da različite vrste meda iz Brazila ispoljavaju antifungalnu aktivnost prema kandidi. Smatra se da flavonoidi iz meda mogu biti potencijalni agensi u suzbijanju kandidate.

Med i njegovi sastojci poznati su i po ispoljavanju antikancerogene aktivnosti različitim mehanizmima delovanja, koji podrazumevaju antioksidativne, apoptotičke, antiproliferativne, imunomodulatorne, antiinflamatorne i estrogene efekte, kao i delovanje inhibitora faktora nekroze tumora (Waheed et al., 2019). Isti autori navode da su flavonoidi meda (kempferol, katehin i kvercetin) i fenolne kiseline (kafena i galna kiselina) polifenolne komponente meda sa najjačom dokazanom antikancerogenom aktivnošću.

Sakač i saradnici (2022) su ispitivali antiproliferativnu aktivnost različitih vrsta meda na ćelije raka dojke (MCF7), cerviksa (HeLa), kolona (HT-29) i MRC-5 ćelije, utvrdivši da lipov i livadski med ispoljavaju najjače antiproliferativno dejstvo na sve ispitivane ćelijske linije, pri čemu je ćelijska linija HT-29 bila najosetljivija. Antiproliferativnu aktivnost meda i polifenola meda na različite ćelijske linije raka zabeležili su i Jaganathan i Mandalin (2009). Uprkos tvrdnji da polifenoli imaju jednu od presudnih uloga u suzbijanju rasta ćelija raka, rezultati Sakačeve i saradnika (2022) dokazuju da i drugi mehanizmi/jedinjenja doprinose ovom fenomenu. Lipov med se pokazao superiornim, iako je sadržaj polifenola lipovog meda nizak, odnosno značajno niži u odnosu na med od bosiljka, čija aktivnost u supresiji rasta kancerogenih ćelija nije detektovana. Takođe, kestenov med je pokazao blagu aktivnost u slučaju ćelija raka dojke bez uticaja na druge ispitivane linije, iako ga odlikuje visok sadržaj polifenola. Suprotno tome, med od kestena iz Anadolije je bogat izvor fenola, čiji je sadržaj kompatibilan sa njegovim citotoksičnim dejstvom na ćelijske linije raka dojke (Seyhan et al., 2017).

Med je delotvoran i u tretmanu različitih rana (Pleeging et al., 2022). Istraživanja pokazuju da se lekovitost meda u tretmanu rana zasniva na stimulaciji lučenja inflamatornih citokina (interleukin 1 $\beta$  i 6) i TNF-a (tumor nekroza faktor) iz monocita, čime se podstiče regeneracija tkiva. Med se pokazao vrlo korisnim i u lečenju opekotina, jer je vlažan, deluje antibakterijski i ne izaziva lokalnu iritaciju obolelog tkiva (Krishnakumar et al., 2020).

Nizak glikemijski indeks meda omogućava njegovu umerenu konzumaciju u slučaju osoba obolelih od dijabetesa tipa 1 i 2, jer je ustanovljeno da konzumiranjem meda kod ovih pacijenata

dolazi do povećanja koncentracije hemoglobina, stimulacije lučenja insulina, a usled toga i do smanjenja nivoa šećera u krvi i poboljšanja njihovog lipidnog statusa.

## **2.7. AUTENTIČNOST MEDA**

Autentičnost meda, odnosno određivanje botaničkog i geografskog porekla meda, tradicionalno se sprovodi analizom polena (melisopalinološka analiza) (Bentabol Manzanares et al., 2011; La Serna Ramos and Gómez Ferreras, 2011) shodno harmonizovanoj metodi (Von der Ohe et al., 2004). Međutim, ova analiza zahteva iskusne poznavaoce botanike i bogatu bazu podataka o vrstama polena, kao i poznavanje flore određenog regiona za procenu geografske autentičnosti meda (Ulberth, 2016). Alternativa analizi polena je detekcija genetskog materijala biljaka koje su pčele koristile u proizvodnji meda. Reakcija lančanog umnožavanja (engl. polymerase chain reaction – PCR) je metoda koja može da se koristi za karakterizaciju polenskog profila različitih vrsta meda, kao što je, na primer, med sa Korzike i iz Galicije (Laube et al., 2010). Određivanje niza markera botaničkog i geografskog porekla meda, kao što su aminokiseline i proteini, aromatična jedinjenja, ugljeni hidrati, enzimi (aktivnost enzima), proizvodi fermentacije, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja, minerali i elementi u tragovima, stabilni izotopi, alifatične organske kiseline i neka druga specifična jedinjenja, takođe je korisno u određivanju autentičnosti meda (Anklam, 1998). Mnoge analitičke tehnike koriste za praćenje autentičnosti meda: infracrvena spektroskopija (IR), nuklearna magnetna rezonanca (NMR), fluorescentna spektroskopija (uključujući analizu organskih supstanci sa fluorescentnim svojstvima i neorganskih jedinjenja totalnom refleksijom rendgenske fluorescencije), tankoslojna hromatografija (TLC), tečna hromatografija (LC), jonoizmenjivačka hromatografija (HPAEC), gasna hromatografija (GC), masena spektrometrija odnosa stabilnih izotopa (IRMS) i elektroanalitičke metode (Trifković et al., 2017).

## **2.8. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH JEDINJENJA**

Ekstrakcija i izolacija bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora/proizvoda odvija se primenom procedura koje podrazumevaju: (1) ekstrakciju (maceracija, destilacija vodenom



parom, presovanje, infuzija, perkolacija i ekstrakcija po Soxlet-u) i (2) dodatni hemijski tretman ekstrakata u cilju izolovanja ciljnih jedinjenja u čistom obliku (Chemat et al., 2012). Konvencionalni postupci ekstrakcije su često dugotrajni i zahtevaju korišćenje velikih količina organskih rastvarača (ugljevodonika, alkohola, hloroalkana i drugih), obzirom da veliki deo bioaktivnih jedinjenja nije rastvorljiv u vodi. Tokom primene konvencionalnih postupaka ekstrakcije može da dođe do degradacije određenih ciljnih molekula i delimičnog gubitka isparljivih materija (Cravotto et al., 2008), te je, posledično, uprkos velikoj potrošnji energije i velikom utrošku rastvarača, prinos ciljnog jedinjenja često nizak (Chemat et al., 2012). Stoga su u proteklim decenijama razvijane sigurnije i efikasnije tehnike ekstrakcije, zasnovane na ekološki prihvatljivijim rešenjima, koje su, istovremeno, bezbednije za korisnike.

Koncept zelene hemije prvi put je korišćen 1991. godine. Ovaj koncept je zasnovan na 12 principa – smernica, koje se koriste u 1) dizajniranju hemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primenu i nastanak štetnih i opasnih supstanci korišćenjem hemikalija i rastvarača koji su minimalno štetni ili potpuno bezbedni po ljudsko zdravlje i životnu sredinu, ali i u 2) dizajniranju energetski efikasnih i bezbednih procesa kojima se olakšava korišćenje obnovljivih sirovina (Anastas and Eghbali, 2010). Danas je zelena hemija prevazišla oblast hemije i primenjuje se u raznim industrijskim oblastima, kao što su prehrambena tehnologija i biotehnologija. Shodno tome, termin zelena ekstrakcija je uveden da opiše tehnike ekstrakcije zasnovane na zelenim i održivijim procesima kroz (1) poboljšanje i optimizaciju procesa, (2) korišćenje nenamenske opreme i (3) inovacije u procesima, uključujući alternativne rastvarače (Chemat et al., 2012). Prema principima zelene hemije, izbor odgovarajućeg rastvarača zasniva se na bezbednosti operatera (toksičnost, kancerogenost, mutagenost, apsorpcija kroz kožu i respiratorni sistem), bezbednosti procesa (zapaljivost, eksplozivnost, isparljivost i stvaranje potencijalnog peroksida), zaštiti životne sredine (ekotoksičnost, postojanost, kontaminacija podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača) i održivosti procesa (sposobnost reciklaže i mogućnost ponovne upotrebe) (Alfonsi et al., 2008), što znači da zeleni rastvarač treba da bude hemijski i fizički stabilan, male isparljivosti, netoksičan ili smanjene toksičnosti, biodegradabilan, lak za upotrebu i lak za recikliranje.

Danas su u mnoge separacione postupke uvedene savremene tehnologije ekstrakcije, koje koriste bezbedne i netoksične rastvarače (kao što su etanol, CO<sub>2</sub>, voda) za ekstrakciju različitih materijala i jedinjenja. Neke od ovih tehnologija su ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

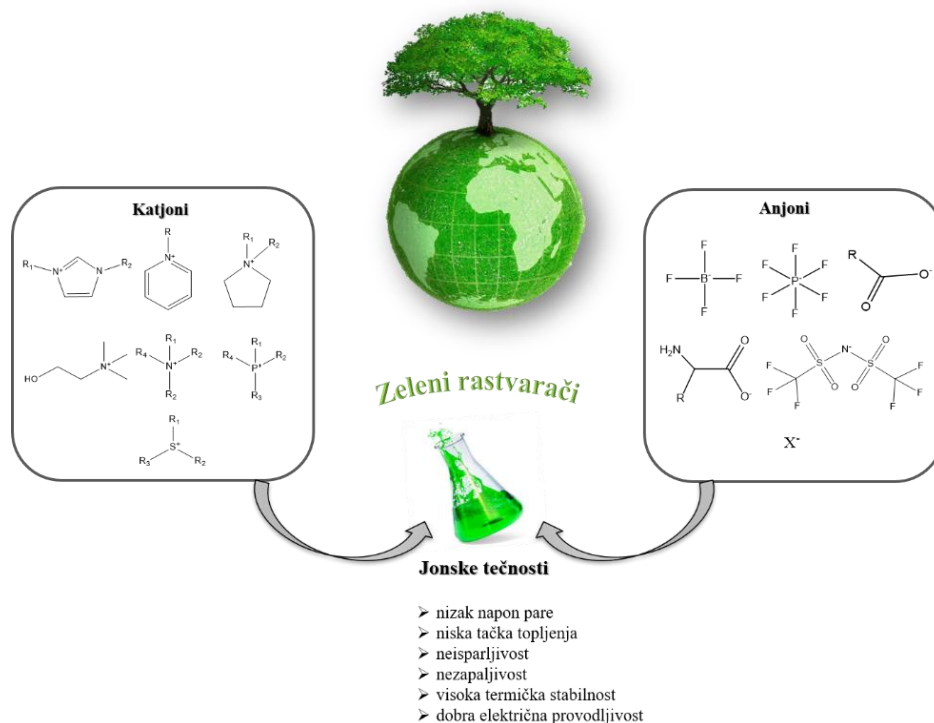
(microwave accelerated extraction – MAE), ultrazvučna ekstrakcija (ultrasound accelerated extraction – UAE), ubrzana ekstrakcija rastvaračem (accelerated solvent extraction – ASE) i tehnologije pod pritiskom, kao što su superkrična ekstrakcija fluidima (supercritical fluid extraction – SFE) i subkrična ekstrakcija vodom (subcritical water extraction – SVE) (Yilmaz and Soylak, 2016). Osim prednosti koja se odnosi na upotrebu zelenog i bezbednog rastvarača za ekstrakciju, većina navedenih ekstrakcionih tehnologija je mnogo efikasnija od konvencionalnih tehnika. Selektivna ekstrakcija u slučaju primene najsavremenijih ekstrakcijskih tehnologija omogućena je jednostavnom promenom parametara procesa (temperatura, pritisak, protok, snaga i drugi parametri), što ove tehnike čini pogodnim za ekstrakciju raznih bioaktivnih jedinjenja (Gil-Chávez et al., 2013).

### 2.8.1. Jonske tečnosti

Enormni industrijski razvoj, koji u velikoj meri menja stil života ljudi širom sveta, doveo je do potrebe za razvojem procesa i pronalaženjem hemijskih supstanci koje će odlikovati ekonomičnost, održivost i odsustvo ili smanjenje negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životnu sredinu. Poslednjih decenija naučnici u velikoj meri izučavaju klase hemijskih jedinjenja koje će doprineti smanjenju zagađenja životne sredine. Krajem XX i početkom XXI veka došlo je do ekspanzije sinteze nove klase jedinjenja – jonskih tečnosti (Slika 14). Prema dvanaest principa zelene hemije, jonske tečnosti su najbolji zeleni rastvarači za upotrebu u hemijskim reakcijama, koji predstavljaju „zelene alternative” uobičajeno korišćenim organskim rastvaračima (Anastas and Kirchhoff, 2002; Hulsbosch et al., 2016).

Jonske tečnosti su organske soli koje se sastoje od asimetričnog organskog katjona i organskog ili neorganskog anjona sa tačkom topljenja uobičajeno ispod 100 °C i stabilnošću u širokom temperaturnom opsegu (obično < 400 °C) (Bahrani et al., 2015). Razni organski katjoni, kao što su imidazolijum, sulfonijum, amonijum, piridinijum, fosfonijum, triazolijum, pirazolijum, gvanidinijum i drugi katjoni, sa različitim supstituentskim grupama, mogu se kombinovati sa anjonima od interesa u postupku dizajniranja jonskih tečnosti (Kaur et al., 2022). Nesimetrična i glomazna struktura konstituentских jona doprinosi da se jonske tečnosti razlikuju od konvencionalnih soli, kao što je, na primer, natrijum hlorid. Jake jonske interakcije između

katjona i anjona u kristalnoj rešetki neorganskih (konvencionalnih) soli odgovorne su za značajno više tačke topljenja u poređenju sa jonskim tečnostima (Welton, 2004).



**Slika 14.** Jonske tečnosti

Narastajuće interesovanje za jonske tečnosti i njihovu primenu može se pripisati njihovoj sposobnosti za građenje širokog spektra intermolekularnih interakcija (jake i slabe jonske, vodonične i van der Valsove veze, disperzivne i  $\pi$ - $\pi$  interakcije), koja doprinosi boljim solvacionim svojstvima u poređenju sa konvencionalnim organskim rastvaračima (Hejazifar et al., 2020). Ostala svojstva jonskih tečnosti uključuju nizak napon pare, nezapaljivost, neisparljivost, visoku termičku stabilnost, kao i dobru električnu provodljivost. One se smatraju „dizajniranim rastvaračima“ i „rastvaračima budućnosti“. Termin „dizajnirani rastvarači“ koristi se zbog njihove podesive i prilagodljive prirode, uslovljene sposobnošću menjanja i prilagođavanja njihovih fizičko-hemijskih svojstava varijacijom konstitutivnih jona (Egorova et al., 2017; Ghorbanizamani and Timur, 2018). Osobine jonskih tečnosti podešavaju se varijacijama u odabiru katjona/anjona, supstituentuentskih grupa, funkcionalizovanih alkil grupa, kao i dužine alkil lanca prisutnog u njihovoj strukturi (Giernoth, 2010). Osobine jonskih tečnosti

određene su međusobnim kombinovanjem katjona i anjona i veličinom, geometrijom i distribucijom naelektrisanja. Svojstva kao što su kiselost, baznost, mešanje sa vodom i nemešljivost, kao i hidrofilna i hidrofobna svojstva, rezultat su udruženih svojstava katjona i anjona.

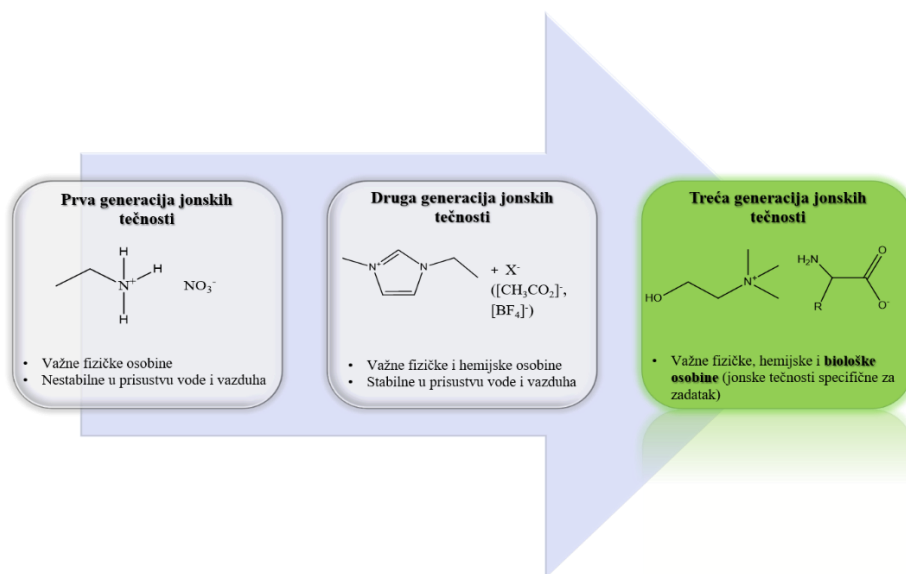
Jonske tečnosti se sastoje isključivo od jona i njihovo međufazno ponašanje je složeno, uslovljeno Kulonovim silama, van der Valsovima, dipol-dipolnim interakcijama, vodoničnim vezama i hidrofobnim silama (Crowhurst et al., 2004; Dong and Zhang, 2012). Prilikom formiranja jonskih tečnosti mešanjem jake kiseline sa jakim bazom, proton je veoma snažno vezan za bazu. U ovoj situaciji, jonska tečnost se sastoji u potpunosti od jona. Međutim, može doći i do kompleksiranja jona i stvaranja agregata (Nuthakki et al., 2007).

Zbog velikog broja kombinacija i nastanka raznih jonskih tečnih jedinjenja, klasifikacija ove grupe jedinjenja je od velikog značaja. Jonske tečnosti se mogu klasifikovati u nekoliko kategorija. Na primer, Hajipour i Rafiee (2015) su klasifikovali jonske tečnosti u jedanaest klasa – neutralne, kisele, bazne, funkcionalizovane, protičke, hiralne, imobilisane na nosačima, biojonske, polimerizovane i energetske jonske tečnosti i jonske tečnosti sa amfoternim anjonima. Klasifikacija jonskih tečnosti je, prema gorenavedenim autorima, izvršena shodno njihovim fizičkim i hemijskim osobinama (Hajipour and Rafiee, 2015). Drugi uobičajeni metod klasifikacije jonskih tečnosti je kategorizacija u odnosu na tip katjona ili anjona od kojih se one sastoje (Buszevska-Forajta et al., 2018). Najčešće prisutni katjoni u sastavu jonskih tečnosti su imidazolijum, piridinijum, piperidinijum, hinolinijum, morfolinijum, pirolidinijum i njihovi mono- ili poli-alkil derivati, kao i tetraalkil amonijum ili fosfonijum i trialkil sulfonijum derivati (Egorova et al., 2017). Većina katjona nastaje zamenom heteroatoma protonskom ili alkil grupom u strukturi jonske tečnosti. Dodavanjem  $R^+$  grupa i  $H^+$  katjonu sintetišu se „aprotične“ i „protične“ jonske tečnosti (protične nastaju prenosom protona sa Brønstedove kiseline na Bronstedovu bazu). Osnovna razlika između protičnih i aprotičnih jonskih tečnosti je u tome što su protične sposobne da formiraju veliku mrežu vodoničnih veza zbog postojanja atoma akceptora i donora protona (Reilly et al., 2017).

Važna grupa jonskih tečnosti su i polimerizovane jonske tečnosti. Polimerizovana jonska tečnost (polymerized ionic liquids – PIL) predstavlja polimer sastavljen od jedinica jonske tečnosti. Polimerizacija kombinuje prednosti čvrste polimerne „kičme“ i svojstva jonskih tečnosti, što rezultira neutralnim polimerom sastavljenim od jedinica sa velikim brojem pozitivno

ili negativno naelektrisanih grupa (Claus et al., 2018). Ova kategorija jonskih tečnosti poseduje obećavajuće karakteristike za širok spektar procesa separacije. Pored toga, zapaljivost PIL-ova je manja u odnosu na ostale jonske tečnosti, što ih čini atraktivnom opcijom za gorivne ćelije i uređaje za skladištenje (Yuan et al., 2011).

Na osnovu napretka u sintezi jonskih tečnosti i njihove hemijske strukture i svojstava, mogu se razmotriti tri generacije (Slika 15).



**Slika 15.** Primeri jonskih tečnosti prve, druge i treće generacije

Prva generacija jonskih tečnosti (jonske tečnosti sa 1-butilpiridinium i 1,3-dialkilimidazolijum katjonima i halogenidnim anjonima), koja se pojavila početkom 1960-ih, bila je zanimljiva s obzirom na jedinstvena i podesiva fizička svojstva predstavnika ove generacije (viskoznost, gustina, niska isparljivost, provodljivost, termička stabilnost, hidrofobnost). Međutim, ova generacija je imala nedostatke, jer je, između ostalog, bila osetljiva na prisustvo vode i vazduha. Kao rezultat toga, devedesetih godina prošlog veka stvorena je druga generacija jonskih tečnosti kao odgovor na sve veću potrebu za rastvaračima sa podesivim fizičkim i hemijskim svojstvima. Takve jonske tečnosti, specifične za određeni zadatak, sintetizovane su od nezavisno modifikovanih katjona (1-etil-3-metilimidazolijum katjon – [Emim]<sup>+</sup>) i anjona (halogenidi, nitrati, nitriti, trifluoroacetati, tetrafluoroborati i sulfati), što je omogućilo dizajn novih funkcionalnih materijala. Jonske tečnosti druge generacije bile su u

stanju da obezbede poboljšanje hemijske reaktivnosti, hiralnog prepoznavanja, solvatacije, balansa kiseonika, UV blokiranja i visoke gustine energije. Štaviše, ova klasa jonskih tečnosti je bila stabilnija i bezbednija po životnu sredinu, jer se zasnivala na biorazgradivim jonima (Domínguez de María et al., 2011), a bila je predmet nebrojenih studija koje su izveštavale o njihovoj brojnoj primeni.

Početak XXI veka označava pojavu treće generacije jonskih tečnosti, koje povezuju željena biološka svojstva sa odabranim fizičko-hemijskim svojstvima. Ova grupa sadrži predstavnike jonskih tečnosti koji se koriste u medicini, kao, na primer, farmaceutski aktivne komponente (active pharmaceutical ingredients – APIs). Katjoni niske toksičnosti i blagotvornih aktivnosti (antibakterijski, antifungalni, antiholinergički, lokalni anestetici) i anjoni određenih svojstava (emolijensi, vitamini, antibiotici, nesteroidni antiinflamatorni lekovi) koriste se za postizanje bioloških svojstava jonskih tečnosti (Ferraz et al., 2011). Treću generaciju jonskih tečnosti odlikuju neke značajne prednosti, kao što su niska cena proizvodnje, jednostavna sinteza i proces prečišćavanja, lako podešavanje katjona i anjon, strukturni i funkcionalni integritet API-a i kontrolisani polimorfizam u poređenju sa prvom i drugom generacijom jonskih tečnosti (Dias et al., 2017).

Dodatni faktor koji doprinosi njihovoj upotrebi u ekstrakcijama je i njihova mešljivost sa vodom i sposobnost formiranja dvofaznih vodenih sistema, što ih čini idealnim rastvaračima za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, kao i modifikatorima mobilne faze, jer poboljšavaju odvajanje analita u slučaju primene tečne hromatografije visokih performansi.

Generalno, upotrebom jonskih tečnosti kao ekstrakcionih medijuma postižu se bolja selektivnost i prinos ekstrakcije u poređenju sa konvencionalnim rastvaračima, uz značajan doprinos očuvanju životne sredine (Reichardt, 2005).

### **2.8.1.1. Primena jonskih tečnosti**

Jonske tečnosti su zbog svojih jedinstvenih osobina privukle interesovanje industrijske i akademske zajednice i pronašle široku primenu u različitim oblastima, kao što su hemijska kataliza, hemijska sinteza, biohemija, fizička hemija, analitička hemija, biotehnologija, farmacija i medicina (Plechkova and Seddon, 2008). Na slici 16 su shematski prikazane oblasti primene jonskih tečnosti.



Slika 16. Primena jonskih tečnosti

### 2.8.1.2. Ekstrakcije jonskim tečnostima

Tokom poslednje dve decenije, jonske tečnosti su primenjivane u nekoliko različitih ekstrakcionih tehnika, kao što su mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (solid-phase microextraction – SPME), disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME), mikroekstrakcija sa jednom kapi (solid-phase dispersive microextraction – SDME) i sorptivna ekstrakcija uz mešanje (stir bar sorptive extraction – SBSE) (Spietelun et al., 2013; 2014).

Jedna od najvažnijih karakteristika jonskih tečnosti, koja ih razlikuje od drugih supstanci koje se koriste kao rastvarači u procesima ekstrakcije, je njihov zanemarljiv pritisak pare. Takođe, važna osobina jonskih tečnosti je njihova visoka termička stabilnost. Dokazano je da se značajan deo do sada korišćenih jonskih tečnosti razlaže iznad 200 °C, a u nekim slučajevima i iznad 450 °C (Maton et al., 2013). Visoka termička stabilnost jonskih tečnosti je povezana sa njihovom strukturom, posebno sa anjonom koji formira datu jonsku tečnost (Holbrey and

Seddon, 1999). Jonske tečnosti sa manjim nukleofilnim ili koordinacionim anjonima obično pokazuju najveću termičku stabilnost, dok se one sa halogenim anjonima najčešće razlažu na nižim temperaturama. Proučavan je, takođe, uticaj katjona na termičku stabilnost jonskih tečnosti. Za jonske tečnosti sa istim anjonom, termička stabilnost raste po sledećoj hijerarhiji: 1-butil-3-metilpiridinium [ $C_4C_1Pirr$ ] > 1-butil-3-metilimidazolijum [ $C_4C_1Im$ ] > N-trimetil-N-butilamonijum [ $N_{4,1,1,1}$ ] > 1-butil-3-metilpiperidinium [ $C_4C_1Pi$ ]. Dužina alkil supstituenta prisutnog u katjonskoj strukturi nema značajan uticaj na termičku stabilnost jonske tečnosti (Awad et al., 2004).

Jedna od najvećih prepreka za primenu jonskih tečnosti proizilazi iz njihovog visokog viskoziteta. Tipičan viskozitet jonskih tečnosti kreće se u rasponu od 10 mPas do 500 mPas, što je iznad viskoziteta klasičnih organskih rastvarača (viskoziteti heksana, benzena i vode na sobnoj temperaturi iznose 0,3, 0,6 i 0,9 mPas, respektivno). Katjon jonske tečnosti je najvažniji strukturni faktor koji utiče na njen viskozitet, odnosno njegova priroda i veličina su u direktnoj korelaciji sa viskozitetom jonske tečnosti. Viskoziteti jonskih tečnosti koje imaju istu vrstu anjona i istu dužinu lanca alkil supstituenta u katjonu rastu na sledeći način za različite katjone: imidazolijum [ $C_nC_1Im$ ] < piperidinium [ $Pi$ ] < piridinium [ $Pirr$ ]. Štaviše, viskozitet jonske tečnosti se povećava sa povećanjem dužine alkil lanca vezanog za katjon (Yu et al., 2012). U slučaju anjona, jonske tečnosti sa velikim i nesimetričnim anjonima odlikuje niži viskozitet od onih sa nepolarnim i simetričnim anjonima (Gardas and Coutinho, 2008). Drugi važan faktor koji utiče na viskozitet jonske tečnosti je temperatura. Naime, viskozitet jonske tečnosti opada sa porastom temperature i ova zavisnost ima eksponencijalni oblik (Siqueira et al., 2014).

Površinski napon može biti važno svojstvo u višefaznom procesu. Vrednosti površinskog napona za jonske tečnosti su nešto veće od onih za konvencionalne rastvarače (površinski napon heksana iznosi 18 mN/m), mada ne tako visoke kao u slučaju vode (73 mN/m) (Mackay et al., 2006). Tip i veličina anjona imaju najveći uticaj na površinski napon jonskih tečnosti, koji se snižava sa povećanjem veličine anjona: tetrafluoroborat [ $BF_4$ ] > heksafluorofosfat [ $PF_6$ ] > trifluorometansulfonat [ $CF_3SO_3$ ] > bis(trifluorometan)sulfonimid [ $NTf_2$ ] (Yu et al., 2012). Uticaj katjona na površinski napon jonskih tečnosti je zanemarljiv, dok produženje lanca alkil supstituenta u katjonu smanjuje njihov površinski napon (Freire et al., 2007).

Rastvorljivost jonskih tečnosti u vodi je kritičan parametar za njihovu upotrebu kao medijuma za separaciju u tehnikama ekstrakcije. Stoga je važno poznavati prirodu jonskih



tečnosti, posebno karakter njihovih interakcija sa različitim jedinjenjima. Jačina interakcija voda-jon za jonske tečnosti rastvorljive u vodi je uglavnom određena veličinom njihovih jona. Rastvorljivost jonske tečnosti u vodi u najvećoj meri zavisi od anjona, dok je uloga katjona sekundarna. Hidrofobna priroda anjona raste sledećim redosledom: bromid [Br] ~ hlorid [Cl] < tetrafluoroborat [BF<sub>4</sub>] < heksafluorofosfat [PF<sub>6</sub>] < bis(trifluorometan)sulfonimid [NTf<sub>2</sub>] < bis(pentafluoroetilsulfoni)imid [BETI] (Toh et al., 2006). Uloga katjona zavisi od dužine lanca alkil supstituenta, jer njegovo produženje dovodi do povećanja hidrofobnih svojstava jonske tečnosti (Rilo et al., 2009).

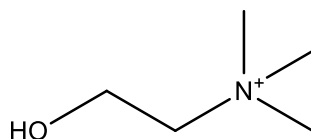
Termin „polarnost“ obuhvata sva moguća svojstva odgovorna za interakcije između jonske tečnosti i analita prisutnog u uzorku. Polarnost jonske tečnosti se smanjuje sa veličinom anjona, odnosno sa efektivnom gustinom naelektrisanja. Prisustvo –OH ili –OR grupa u strukturi jonske tečnosti može da menja polarnost u širokom opsegu.

Činjenica da su jonske tečnosti „dizajnirani rastvarači“, koji se mogu dizajnirati korišćenjem ogromnog broja anjona, katjona i alkil supstituenata u katjonima na način da jedinjenja koja se žele ekstrahovati imaju jak afinitet prema tako osmišljenim rastvaračima, čini jonske tečnosti nezamenljivom grupom sredstava za ekstrakciju. U tu svrhu, one se mogu primeniti i kao tečni ekstraktanti, kada zadržavaju prirodna svojstva jonske tečnosti, i kao čvrste/stacionarne faze na bazi jonskih tečnosti, koje se mogu klasifikovati kao novi sorpcioni materijali koje odlikuju prirodna svojstva jonskih tečnosti, ali ih odlikuju i druge atraktivne karakteristike (Espino et al., 2016).

Za razliku od konvencionalnih rastvarača, jonske tečnosti se razlikuju jedna od druge po svojstvima solvatacije, koja u velikoj meri zavisi od njihove hemijske strukture i međumolekulskih interakcija. Ova specifična svojstva su rezultat prostornog rasporeda jonske tečnosti u masi. Ovo dovodi do formiranja domena, koje karakteriše različita polarnost, u kojima se tokom procesa rastvaranja jedinjenja sakupljaju u oblastima gde mogu da formiraju polarne (npr. vodonične veze) ili nepolarne ( $\pi$ - $\pi$ ) interakcije (Zhang et al., 2014). Usled postojanja izrazite povezanosti između svojstava katjona i anjona i moći solvatacije, posebno dizajnirane jonske tečnosti su u stanju da rastvore definisanu grupu supstanci, kao što su polarna/nepolarna jedinjenja, metali, biopolimeri i druge (Sivapragasam et al., 2016). Solvaciona moć jonskih tečnosti je osnovni aspekt njihove uspešne primenljivosti kao tečnih ekstraktanata. Jonske tečnosti nerastvorne u vodi mogu se uspešno primeniti u izolovanju analita iz vodenih uzoraka.

### 2.8.1.3. Jonske tečnosti na bazi holina

Holin pripada klasi kvaternarnih amonijum soli i uvek je povezan sa anjonom suprotnog naelektrisanja (hlorid, hidroksid, tartarat). Holin (2-hidroksietiltrimetil amonijum hlorid) je jedna od najvažnijih biorazgradivih, jeftinih i u vodi rastvornih organskih soli. Holin je komponenta prisutna u organizmu i smatra se dobrom biokompatibilnom komponentom jonskih tečnosti (Wu et al., 2020). Holin ( $[Ch]^+$ ) (Slika 17) je osnovna komponenta vitamina B<sub>4</sub> (Zeisel and da Costa, 2009).



**Slika 17.** Molekulska struktura holina

Holin je u Evropi klasifikovan kao provitamin (Ventura et al., 2014), a američka Uprava za hranu i lekove (Food and Drug Administration – FDA) i Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food and Safety Authority – EFSA) i druge regulatorne agencije ga smatraju bezbednim (Mbous et al., 2017). Proizvodnja holin hlorida ( $ChCl$ ) se vrši jednostavnom i efikasnom reakcijom u gasnoj fazi između etilen oksida, trimetilamina i HCl. „E faktor“ Rodžera Šeldona za ovu so je blizu nule, jer se tokom ove reakcije gotovo ne stvaraju otpadni proizvodi (Sheldon, 2017).

Holin služi kao prekursorski molekul za neurotransmiter acetilholin, koji igra ulogu u mnogim funkcijama, uključujući kontrolu pamćenja i mišića. Holin se pojavljuje u sastavu glavnih grupa fosfatidilholina i sfingomijelina, dve klase fosfolipida koje su prisutne u ćelijskim membranama. Unošenje holina hranom može da podstakne metilovanje, jer preko betain homocistein metiltransferaze (BHMT) ovaj nutrijent, kao i njegov metabolit, betain, regulišu koncentracije S-adenozilhomocisteina i S-adenozilmationina u organizmu. Neki od epigenetskih mehanizama koji modifikuju ekspresiju gena bez modifikacije genetskog koda zavise od metilovanja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) ili histona (Zeisel, 2017).

U poređenju sa jonskim tečnostima koje sadrže katjone imidazola ili piridin katjone, jonske tečnosti sa katjonima holina ( $[Ch]$ -jonske tečnosti) imaju nižu toksičnost i veću biorazgradljivost,

jer je holin komponenta koja je prisutna u biološkim sistemima (Petkovic et al., 2010; Santos de Almeida et al., 2017).

Jonske tečnosti na bazi holina se danas široko primenjuju u oblasti zelene, održive hemije i u mnogim hemijskim procesima. Poslednjih godina objavljeni su mnogi radovi koji su se fokusirali na nedavna dostignuća u korišćenju jonskih tečnosti na bazi holina u različitim oblastima hemije, biotehnologije, farmacije, medicine i u separacionim procesima (Gomes et al., 2019).

Klasa bio-jonskih tečnosti, kojoj pripadaju i holinske jonske tečnosti, u velikoj meri je proučavana u pogledu delovanja kao rastvarača ili katalitičkih sredstva za preradu biomase. Svojstva bio-jonskih tečnosti, odnosno njihova sposobnost da naruše snažne intermolekularne mreže, pre svega vodonične veze, i da stupaju u interakcije sa hidroksilnim grupama u strukturama jedinjenja, zajedno sa njihovom niskom toksičnošću, učinila su ih atraktivnim rastvaračima za slabo rastvorne biopolimere. Neke [Ch]-jonske tečnosti koje pripadaju klasi alkanoata pokazale su se efikasnim za selektivno rastvaranje suberina iz rafinisane plute, koji je nerastvorljiv u mnogim rastvaračima (Garcia et al., 2010). Rastvaranje keratina perja korišćenjem bio-jonske tečnosti sa holin tioglikolatom takođe je uspešno postignuto bez dodavanja drugih hemikalija (Idris et al., 2013). [Ch]-jonske tečnosti su našle primenu i u selektivnom rastvaranju lignina iz biomase, nakon čega je zaostala masa bogata celulozom, koja se lako razlaže delovanjem enzima za oslobađanje fermentabilnih šećera. Rastvarači na bazi [Ch]-jonskih tečnosti, kao i eutektičke smeše na bazi ChCl (deep eutectic solvents – DES), uspešno su korišćeni za dekrystalizaciju celuloze i funkcionalizaciju katjonskih polimera, proces od industrijskog značaja, posebno u uklanjanju kiselih boja iz vodenih efluenata nastalih u tekstilnoj industriji (Zhang et al., 2012). Dodatno, holin formijat je korišćen kao efikasno sredstvo za samopolimerizaciju, koje je bilo u stanju da proizvede gelove na sobnoj temperaturi bez delovanja svetlosti, toplote ili inicijatora (Winther-Jensen et al., 2009).

Pored eksploatacije bio-jonskih tečnosti kao rastvarača i katalizatora, oni su u velikoj meri korišćeni i kao aditivi kako bi se nekim materijalima obezbedila poboljšana i željena svojstva. Sposobnost jonskih tečnosti da formiraju jake vodonične veze čini ih atraktivnim neisparljivim plastifikatorima za prirodne biopolimere, poput skroba (Colomines et al., 2016).

Neke [Ch]-jonske tečnosti su, takođe, korišćene kao jonski plastični kristali koje karakteriše protonska provodljivost, te su od značaja u oblasti elektrohemije i biomedicine (Sharma et al., 2014).

U farmaciji i biomedicini bio-jonske tečnosti se koriste kao stabilizatori za biomolekule, kao rastvarači ili kao deo inertnog nosača za slabo rastvorne lekove (aktivne komponente), kao što su API-JT sistemi (Taha et al., 2015a; 2015b; Weaver et al., 2010). Upotreba API-jonskih tečnosti se pokazala kao odlično rešenje u rešavanju problema koji se odnose ne samo na rastvorljivost, već i na polimorfizam, isporuku, brzinu oslobađanja, rukovanje, terapijsku efikasnost i neželjene reakcije tokom primene (Egorova et al., 2017). Nedavne studije su ukazale na obećavajuće rezultate u vezi sa razvojem formulacija za transdermalnu isporuku lekovite aktivne komponente korišćenjem bio-jonskih tečnosti, izazvanu nepropusnošću spoljašnjeg sloja kože (Tanner et al., 2018). U studiji Banerjee i saradnika (2018) [Ch]-jonske tečnosti korišćene su za razvoj visokoefikasane oralne formulacije insulina, a rezultati su pokazali da je postignuto značajno poboljšanje u oralnoj bioraspoloživosti insulina sa izuzetnom efikasnošću, biokompatibilnošću i dugotrajnom stabilnošću, što ukazuje da je upotreba [Ch]-jonskih tečnosti obećavajuća strategija u razvoju oralnih sredstava.

## 2.8.2. Dvofazni vodeni sistemi

Sredinom pedesetih godina XX veka, Albertsson je predložio upotrebu dvofaznih vodenih sistema – DVS (aqueous biphasic systems – ABS) kao alternativu tradicionalnim tehnikama tečno-tečne ekstrakcije, koje uobičajeno iziskuju korišćenje isparljivih organskih rastvarača (Albertsson, 1958). Dvofazni vodeni sistem se sastoji od dve vodene faze koje se ne mešaju i zasnovane su na kombinaciji polimer-polimer, polimer-so i so-so. Iako su obe supstance rastvorljive u vodi, one se razdvajaju u dve koegzistirajuće faze iznad određene koncentracije – pri čemu je jedna faza bogata jednom, a druga faza drugom komponentom.

Početkom XXI veka, 2003. godine, Rodžers i saradnici su utvrdili da dodavanje koncentrovanog rastvora kalijum fosfata, neorganske soli koja strukturira vodu (kosmotropska so), u vodeni rastvor hidrofilne jonske tečnosti dovodi do efekata izoljavanja i formiranja dvofaznih vodenih sistema, pri čemu je gornja faza bogata jonskom tečnošću, a donja faza neorganskim solima. Ovakvi sistemi su zamišljeni kao alternativni sistemi za recikliranje i koncentrovanje jonskih tečnosti iz vodenih rastvora, kao i za formiranje novih jonskih tečnosti i razvijanje novih separacionih tehnika (Gutowski et al., 2003).

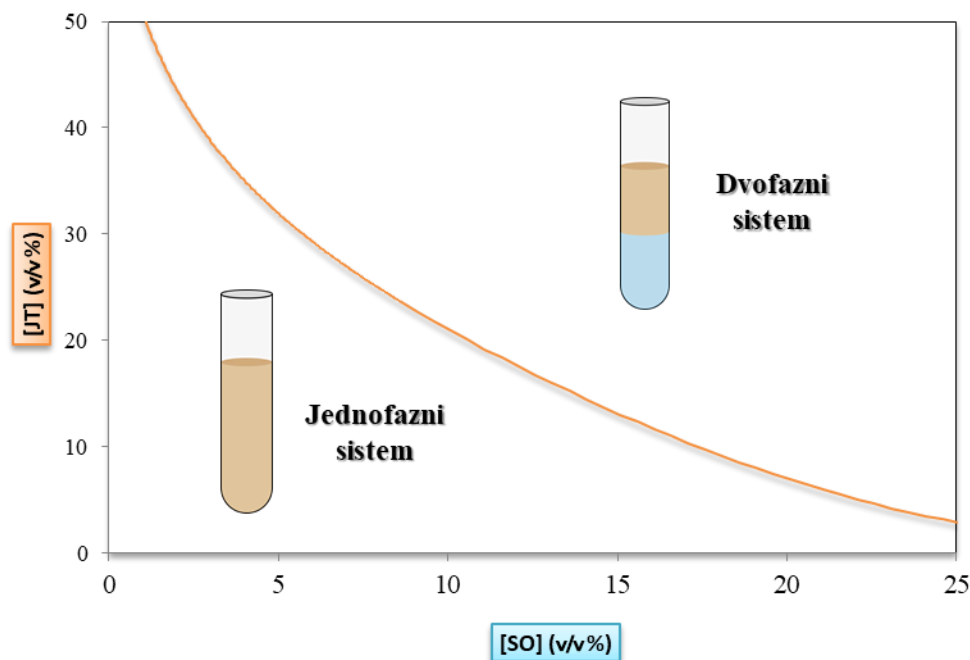
Prednost primenljivosti jonskih tečnosti u formiranju dvofaznih vodenih sistema posledica je mogućnosti prilagođavanja polarnosti i afiniteta njenih konstituenata pravilnom manipulacijom katjona/anjona i njihovim kombinacijama (Earle et al., 2006; Esperança et al., 2010). Ova činjenica značajno doprinosi prednosti dvofaznih vodenih sistema na bazi jonskih tečnosti s obzirom na poteškoće u prevazilaženju ograničenog opsega polarnosti sistema na bazi polimera.

Sistemi zasnovani na polimerima obično se sastoje od dve hidrofobne faze i razlika u polarnosti suštinski zavisi od količine vode u svakoj od faza. S druge strane, sistem polimer-so ima hidrofobnu fazu koju čini polimer i hidrofilnu (i više jonsku) fazu, obično formiranu od soli visoke gustine naelektrisanja. Ograničena razlika u polarnosti između dve faze sprečava široku upotrebu sistema na bazi polimera u svrhe ekstrakcije. S druge strane, mogućnost podešavanja polarnosti čini da jonske tečnosti mogu „idealno“ da preopkriju ceo opseg hidrofilnosti-hidrofobnosti (Freire et al., 2012a).

Dvofazi vodeni sistemi na bazi jonskih tečnosti su do danas kreirani sa amino kiselinama, ugljenim hidratima, neorganskim/organskim solima, organskim puferima i polimerima (Freire et al., 2012; Luís et al., 2015). Među njima, najproučavanija klasa su sistemi jonska tečnost-so zbog visoke sposobnosti jona soli da indukuju isoljavanje jonske tečnosti i konsekvntno stvore dve vodene faze.

Mehanizam isoljavanja zasnovan je na stvaranju kompleksa voda-joni, koji izazivaju dehidraciju rastvorene supstance i povećanje površinskog napona kaviteta u vodenom medijumu (Freire et al., 2009). Dodavanje soli visoke gustine naelektrisanja u vodene rastvore jonske tečnosti dovodi do isoljavanja i formiranja faze bogate jonskom tečnošću zbog preferencijalne hidratacije jona soli velike gustine naelektrisanja u odnosu na jone jonske tečnosti. U prisustvu vode, jonske tečnosti su slabo hidratizane vrste u poređenju sa uobičajenim neorganskim solima zbog njihovih delokalizovanih jona niske simetrije naelektrisanja. Međutim, u dvofaznim sistemima jonska tečnost-so (Slika 18), dve komponente koje formiraju fazu su jonske, te se može očekivati izvesna razmena jona. Neves i saradnici (2012) su ustanovili da je u dvofaznom vodenom sistemu koji se sastoji od jonske tečnosti i jona visoke gustine naelektrisanja, tj. jakih jonskih vrsta koje vrše isoljavanje, razmena jona između koegzistirajućih faza zanemarljiva. U sistemima koji sadrže jonske tečnosti na bazi kvartarnog amonijum i fosfonijum jona izražena je veća tendencija ka faznom odvajanju u poređenju sa jonskim tečnostima sa aromatičnim katjonima (tečnostima na bazi imidazolijum i piridinijum katjona)

(Bridges et al., 2007; Passos et al., 2012b). Drugim rečima, jonske tečnosti koje sadrže katjone čiji su naelektrisani delovi manje skloni interakciji sa vodom imaju veći kapacitet za fazno razdvajanje i promovisanje većih dvofaznih regiona.



**Slika 18.** Primer faznog dijagrama za ekstrakcije primenom dvofaznog vodenog sistema

Stoga bi se mogao ustanoviti sledeći redosled u formiranju dvofaznih sistema: tetrabutilfosfonijum hlorid  $[P_{4444}][Cl]$  > tetrabutilamonijum hlorid  $[N_{4444}][Cl]$  > 1-butil-3-metilpiridinium hlorid  $[C_4C_1Pirr][Cl]$  > 1-butil-3-metilimidazolijum hlorid  $[C_4C_1Im][Cl]$ , uzimajući u obzir izrazitu sternu zaštitu naelektrisanog dela fosfonijum i amonijum katjona sa četiri alkil grupe, manji stepen zaštite piridinium katjona (naelektrisanje je uglavnom koncentrisano u  $sp^2$  tercijarnom atomu azota, ali je, takođe, delimično delokalizovano u ostatku aromatičnog prstena) i mogućnost H-vezivanja u imidazolijum katjonu sa manje sternih smetnji i gušćim naelektrisanjem.

Ustanovljeno je, takođe, da rastvorljivost jonskih tečnosti u vodi, i, posledično, veličina regiona dvofaznog vodenog sistema, u velikoj meri zavisi od molarne zapremine jonske tečnosti (Ventura et al., 2011). Veći katjoni, kao što su piridinium i piperidijum (6-atomska heterociklična jedinjenja), bolji su za stvaranje DVS od manjih katjona, kao što su imidazolijum

ili pirolidinjium katjoni (koji sadrže prstenove sa 5 atoma). Sterni i entropijski efekti i u manjoj meri moguće interakcije naelektrisanih jezgara sa molekulima vode su od presudnog uticaja u slučaju katjonskih naelektrisanih jezgara pri formiranju dvofaznih vodenih sistema (Ventura et al., 2011). Štaviše, jonske tečnosti koje u strukturi poseduju duže bočne alkil lance zahtevaju manje količine jonske tečnosti i soli da bi formirali dvofazni vodeni sistem (Freire et al., 2012b).

S druge strane, ustanovljeno je da je sposobnost anjona da formira dvofazni vodeni sistem blisko povezana sa jačinom formiranja vodonične veze i sposobnošću doniranja elektronskih parova, što predstavlja direktan rezultat kompeticije između jona za isoljavanje i jonske tečnosti u formiranju hidratacionih kompleksa.

Pored izbora pogodnog anjona i katjona jonske tečnosti za formiranje dvofaznog vodenog sistema, značajnu ulogu ima i izbor odgovarajuće soli za formiranje druge faze. Shahriari i saradnici (2012) su istraživali uticaj katjona i anjona soli na formiranje dvofaznih vodenih sistema i došli do zaključka da moć isoljavanja u zavisnosti od anjona soli natrijuma prati sledeću hijerarhiju:  $\text{PO}_4^{3-} > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} > \text{HPO}_4^{2-} \approx \text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} \approx \text{SO}_3^{2-} > \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-} \gg \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{OH}^- > \text{CH}_3\text{CO}_2^- \approx \text{HSO}_4^- \approx \text{HCO}_3^- > \text{Cl}^-$ , dok moć uticaja katjona na efekat isoljavanja raste u nizu:  $\text{Mg}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} \approx \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ , što je u skladu sa poznatom Hofmeister serijom (liotropna serija). Kada dodate soli sadrže kosmotropske jone, odnosno jone sa velikom gustinom naelektrisanja, molekuli vode se pravilnije raspoređuju oko ovakvih jona i imaju nižu slobodnu energiju. Tendencija dvofaznog razdvajanja je u skladu sa sposobnošću jona soli da formiraju hidratacione komplekse. Sposobnost isoljavanja može se povezati sa Gibsovom slobodnom energijom ( $\Delta_{\text{hid}}G$ ) i entropijom ( $\Delta_{\text{hid}}S$ ) hidratacije jona soli. U poređenju sa haotropnim jonima (joni male gustine naelektrisanja), kosmotropski joni imaju velike negativne vrednosti  $\Delta_{\text{hid}}G$  zbog formiranja strukturirane vode oko njih. Stoga je lakše formirati DVS korišćenjem kosmotropskih soli umesto haotropnih (Nie et al., 2022).

Ispitivani su, takođe, uticaji temperature i pH vrednosti na formiranje dvofaznih vodenih sistema jonska tečnost-so (Sadeghi et al., 2010; Zafarani-Moattar et al., 2009). Istraživanja pomenutih autora su pokazala da sa porastom temperature dolazi do smanjenja dvofazne regije zato što se povećava rastvorljivost jonskih tečnosti i soli u vodi, tako da porast temperature iziskuje veće koncentracije soli i jonske tečnosti potrebne za razdvajanje faza, pa su niže temperature povoljnije za stvaranje dvofaznih vodenih sistema na bazi jonska tečnost-so. Nadalje, različite vrste soli utiču na promenu pH vrednosti u koegzistirajućim fazama dvofaznog

vodenog sistema na bazi jonskih tečnosti (Zafarani-Moattar et al., 2011). Većina radova u literaturi bavila se alkalnim vodenim rastvorima, jer se, generalno, u takvim uslovima lakše postiže formiranje dvofaznih sistema. Ukoliko se koriste joni soli koji mogu da pretrpe promenu naelektrisanja pri različitim pH vrednostima, oni će postati protonovani u većoj meri pri nižim pH vrednostima i, konsekvntno, slabije vrste koje se isoljavaju. Broj jonskih tečnosti koje podležu faznoj degradaciji je u velikoj meri smanjen na nižim pH vrednostima (Zafarani-Moattar et al., 2011).

Prvu primenu dvofaznih vodenih sistema u odvajanju bioloških molekula, koja se kasnije pokazala od značaja u hemijskim, biohemijskim i ćelijskim biološkim osnovnim i primenjenim istraživanjima, sproveo je Albertsson pre skoro šest decenija (1958). Od tada, ovi sistemi su pronašli široku primenu u različitim oblastima, kao što su prehrambena industrija, hemijska sinteza i biomedicinsko inženjerstvo. Istovremeno posedovanje različitih afiniteta molekula prema dvema nemešljivim fazama doprinelo je konvencionalnoj primeni ovih sistema u procesima različitih tipova ekstrakcija, odvajanja, prečišćavanja i obogaćivanja ćelijskih organela, proteina, ugljeničnih nanocevi i metalnih jona.

Primena dvofaznih vodenih sistema u separacionim procesima smatra se jednostavnom, netoksičnom, lako prilagodljivom i energetski efikasnom tehnikom odvajanja, koja se primarno koristi u biotehnološkim procesima (Hatti-Kaul, 2001). Belchior i saradnici (2020) su koristili dvofazne vodene sisteme na bazi jonskih tečnosti sa tetraalkilamonijum katjonom i rastvora kalijum fosfata na različitim pH vrednostima (pH = 7, 8, 9 i 13, korišćenjem  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  ili  $K_3PO_4$ ) kako bi izolovali proteine ovalbumin i lizozim. Wang i saradnici (2022) su razvili metodu za izolovanje proteina iz jestivog ulja koristeći dvofazne vodene sisteme na bazi hidrofilnih jonskih tečnosti, a kao sredstvo za isoljavanje korišćena je so  $K_3PO_4$ . Dimitrijević i saradnici (2017) su razvili metodu ekstrakcije pesticida (acetamiprida, imidakloprida, simazina, linurona i tebufenozida) različite polarnosti u jednom koraku korišćenjem vodenog dvofaznog sistema na bazi 1-butil-3(metil ili etil)-supstituisanog imidazolijuma ili pirolidinijuma sa bromidnim ili dicijanamidnim anjonom i kalijum karbonatom kao sredstvom za isoljivanje. Freire i saradnici (2011) su koristili dvofazni vodeni sistem na bazi jonske tečnosti i ugljenih hidrata u svrhu izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora, kao što su L-triptofan, kofein i  $\beta$ -karoten.



### 2.8.3. Ekstrakcije HMF

Evropska agencija za standarde kvaliteta usvojila je zvanične analitičke metode za određivanje HMF predložene od strane Međunarodne komisije za med (International Honey Commission) – dve spektrofotometrijske metode prema White-u i Winkler-u i HPLC metodu. Najstarija metoda je ona po Winkler-u, koja se zasniva na merenju UV apsorbanije rastvora meda u koji su dodate barbiturna kiselina i *p*-toluidin. Međutim, ona se danas retko koristi zbog male osetljivosti i specifičnosti, kao i zbog kancerogenosti *p*-toluidina. Metoda po White-u se i danas koristi i zasniva se, takođe, na merenju UV apsorbanice rastvora meda sa i bez bisulfita. Sa druge strane, određivanje HMF tačnom hromatografijom visokih performansi je najpouzdanije. Ovom metodom se postiže odvajanje HMF od drugih jedinjenja koja interaguju prilikom primene UV metoda (Windsor et al., 2013). Podaci o potencijalnoj toksičnosti HMF podstiču naučnu zajednicu da učini značajne napore kako bi se uspostavile nove, brze, jeftine i osetljive metode za određivanje HMF u medu, sa akcentom na ekološki prihvatljive i netoksične ekstrakcione tehnike koje prethode detekciji.

U većini radova najčešće korišćene metode ekstrakcije HMF iz hrane, pa i iz meda, uglavnom su se zasnivale na primeni čvrsto-tečne ekstrakcije (solid-phase extraction – SPE). Driffield i saradnici (2005) koristili su SPE za izolovanje HMF iz meda, uz upotrebu toksičnih rastvarača, acetonitrila i metanola, dok je sama procedura zahtevala značajan utošak vremena. Gürkan i Altunay (2015) razvili su metodu predkoncentrovanja i odvajanja HMF primenom ultrazvučne ekstrakcije pomoću micela (ultrasonic-assisted cloud point extraction – UA-CPE), a metoda se zasnivala na selektivnom formiranju kompleksa HMF sa *p*-nitrohidrazinom u prisustvu natrijum dodecil sulfata kao pomoćnog liganda. Za razliku od SPE, primenom UA-CPE minimizirana je upotreba toksičnih rastvarača, uz upotrebu malih količina razblaženih rastvora i male zapremine uzorka. Tehnike pripreme uzorka koje se, takođe, navode u literaturi su homogena tečno-tečna ekstrakcija (homogenous liquid-liquid extraction – HLLE), tečno-tečna ekstrakcija uz pomoć isaljavanja (salting-out assisted liquid-liquid extraction – SALLE) (Chen et al., 2019) i disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME) (Madani-Tonekaboni et al., 2015). DLLME se često koristi u predtretmanu uzoraka meda u postupku određivanja HMF zbog jednostavnosti, male potrošnje rastvarača i brzine. Međutim, kao ekstraktanti u slučaju DLLME obično se koriste toksični i isparljivi aromatični ili

hlorovani organski rastvarači, koji su štetni, kako za operatera, tako i za životnu sredinu. Takođe, upotreba disperzivnih organskih rastvarača zahteva i korišćenje veće količine uzorka (Kocúrová et al., 2012).

Dosadašnja istraživanja bazirana na korišćenju zelenih rastvarača, pre svega jonskih tečnosti, fokusirana su isključivo za konverziju biomaterijala (fruktoza, celuloza, saharoza) u HMF, prekursora za sintezu širokog spektra hemikalija i biogoriva (Chinnappan et al., 2016; Jadhav et al., 2012; Ramli and Amin, 2020).

S obzirom na sve gorenavedeno, kao i na poznavanje potencijala jonskih tečnosti kao ekstragenasa, akcenat u daljim istraživanjima bi trebalo staviti na razvoj i implementaciju ekstrakcionih postupaka za izolovanje HMF iz meda, kako bi se, s jedne strane, obezbedila njegova zdravstvena bezbednost, a sa druge, omogućila dalja primena izolovanog HMF u različitim granama industrije. Bio-jonske tečnosti se sagledavaju kao idealan ekstragens u svrhu obe namene, a dodatno, mogu se ponovo upotrebljavati (reciklirati), što snižava cenu analize/procesa, kao i zagađenje životne sredine.

# 3. EKSPERIMENTALNI DEO

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu, Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, Laboratoriji za analitičku hemiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu i Institutu CICECO – Aveiro Institute of Materials, Aveiro, u Portugalu.

## 3.1. HEMIKALIJE I RASTVORI

Standardni rastvori Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu i Mn koncentracije 1000 µg/ml nabavljeni su iz kompanije AccuStandard (New Haven, SAD), a standardi aminokiselina od proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD).

Najveći broj specifičnih hemikalija i reagenasa korišćenih u eksperimentima nabavljen je od proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals (Steinheim, Nemačka) i to: D-(+)-glukoza monohidrat (čistoće  $\geq 99,5\%$ ), D-(-)-fruktoza (čistoće  $\geq 99,5\%$ ), Folin-Ciocalteu's reagens, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>·</sup>), galna kiselina, katehin,  $\beta$ -karoten, 2,3,5-trifenil tetrazolium hlorid i holin-hlorid (čistoće  $\geq 98,5\%$ ). Metanol HPLC čistoće (HPLC grade), acetonitril (HPLC grade) i mravlja kiselina za HPLC su nabavljeni iz kompanije Merck (Darmstadt, Germany). Carez I i II su proizvedeni u Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka.

Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, poreklom od različitih proizvođača.

Voda je prečišćena korišćenjem sistema za prečišćavanje vode Cristal EKS (Adrona, Riga, Letonija). Ultra čista voda je dobijena korišćenjem Elix UV i Simplicity Water Purification Systema (Millipore, Molsheim, France).

## **3.2. MATERIJAL**

U ovom istraživanju ispitivani su uzorci meda prikupljeni tokom 2016. godine sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine (15 uzoraka livadskog, 15 bagremovog i 15 suncokretovog meda), uzorci meda prikupljeni tokom 2017. sa područja 9 zemalja (Srbija, Albanija, Hrvatska, Crna Gora, Rumunija, Bugarska, Bosna i Hercegovina, Severna Makedonija i Mađarska) (100 uzoraka livadskog, bagremovog, suncokretovog i šumskog meda) i 20 uzoraka specifičnih vrsta meda sa područja Zapadnog Balkana prikupljenih tokom 2018. godine.

## **3.3. METODE**

### **3.3.1. Određivanje fizičko-hemijskih parametara meda**

#### ***3.3.1.1. Određivanje sadržaja vlage***

Sadržaj vlage meren je refraktometrom (Schmidt/Haensch ATR-ST, Labekchange – Die Lab orgerateborse GmbH, Burladingen, Nemačka). Nekoliko kapi meda stavljeno je na prizmu refraktometra i rezultat je očitao direktno sa displeja (AOAC, 2000).

#### ***3.3.1.2. Određivanje slobodne kiselosti***

Slobodna kiselost je određena titrimetrijskom metodom korišćenjem rastvora koji sadrži 10 g meda rastvorenog u 75 ml destilovane vode bez ugljen dioksida (AOAC, 2000). Rastvor je titrisan 0,1 mol/l NaOH do pH 8,5. Kiselost je dobijena kao umnožak zapremine 0,1 mol/l NaOH utrošene za neutralizaciju 10 g meda i broja 10, a rezultat je izražen u miliekvivalentima kiseline po kg meda (meq/kg).

### **3.3.1.3. Određivanje električne provodljivosti**

Električna provodljivost merena je potenciometrijskom metodom korišćenjem 20% v/v rastvora meda (Bogdanov, 2002). Sadržaj vlage u uzorcima meda, određen refraktometrijski, uziman je u obzir pri razblaživanju. Merenje električne provodljivosti sprovedeno je korišćenjem RIAC konduktometra CM 100/E sa ISI 3418 elektrodom (Yellow Springs Instruments Inc., Yellow Springs, Ohio, SAD). Merač je kalibrisan standardnim rastvorom 0,1 mol/l KCl provodljivosti 1413 mS/cm na 20 °C.

### **3.3.1.4. Određivanje pH vrednosti**

Za određivanje pH vrednosti korišćen je 20% v/v rastvor meda dobijen na gorenavedeni način. Za merenje pH vrednosti korišćen je SevenEasi™ pH metar (Mettler Toledo, Urdorf, Švajcarska) sa InLab 427 elektrodom (Mettler Toledo). Pre svakog merenja, elektroda je kalibrisana korišćenjem standarda pH vrednosti  $4,01 \pm 0,02$  i  $7,01 \pm 0,02$  (Bogdanov, 2002).

### **3.3.1.5. Određivanje sadržaja pepela**

Sadržaj pepela određen je po metodi AOAC (2000). Uzorak meda (5 g) odmeren je i prenet u prethodno zagrejanu posudu za sagorevanje. Nakon toga, uzorak je spaljen na visokoj temperaturi (550 °C) u toku 5 h. Posle hlađenja na sobnoj temperaturi, dobijena količina pepela izmerena je na analitičkoj vagi (Mettler Toledo ME204, Greifensee, Švajcarska).

### **3.3.1.6. Određivanje sadržaja glukoze i fruktoze**

Uzorak meda je za određivanje sadržaja glukoze i fruktoze pripremljen kao i za određivanje sadržaja HMF (videti 3.3.1.7.), a potom je alikvot razblažen 2 puta većom zapreminom acetonitrila i skladišten na -18 °C do analize. Neposredno pre analize uzorci su filtrirani kroz politetrafluoroetilen (PTFE) filtere veličine pora 0,45 µm (Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka). Kvantifikacija šećera (glukoza i fruktoza) u medu izvršena je metodom tečne hromatografije visokih performansi (high performance liquid chromatography – HPLC).

HPLC analiza je izvedena korišćenjem tečnog hromatografa (Agilent 1200 serija), opremljenog detektorom rasejanja svetlosti isparavanjem (evaporative light scattering detector – ELSD), na Agilent Zorbax Carbohydrate 4,6 × 250 mm, 5 mm koloni (Agilent Technologies, SAD), upotrebom mobilne faze acetonitril:voda (75:25, v/v) pri brzini protoka 1,100 ml/min. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 12 minuta. Temperatura kolone bila je 30 °C, a uzorak zapremine 10 µl je injektovan korišćenjem autosamplera.

Identifikacija glukoze i fruktoze iz meda izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenima standarda D-(+)-glukoze monohidrata (≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Nemačka) i D-(-)-fruktoze (≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Nemačka). Metoda eksternog standarda je korišćena za kvantifikaciju šećera.

### 3.3.1.7. *Određivanje sadržaja 5-hidroksimetilfurfurala*

*Priprema uzorka:* postupak ekstrakcije HMF izveden je prema metodi Rufian-Henares i De La Cueva (2008), uz modifikacije sprovedene od strane Petisca i saradnika (2014). Deset grama uzorka je suspendovano u 5 ml smeše voda:metanol (70:30). Smeša je mešana vorteksom tokom 1 min, a zatim joj je dodato 2,0 ml Carrez I i Carrez II rastvora (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka) i centrifugirana je na 5000 o/min (4 °C) tokom 15 min, nakon čega je supernatant odvojen u plastičnu posudu. Nakon toga, sprovedene su još dve uzastopne ekstrakcije sa po 2 ml smeše voda:metanol (70:30), do prikupljanja 10 ml supernatanta. Supernatant je zatim centrifugiran na 8000 o/min tokom 15 minuta i ostavljen do analize.

*HPLC-DAD analiza:* Hromatografsko odvajanje i kvantifikacija HMF izvršena je primenom HPLC metode koju su opisali Ariffin i saradnici (2014) i Tomasini i saradnici (2012), uz modifikacije.

Za kvantifikaciju HMF u uzorcima meda korišćen je tečni hromatograf (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD), sa DAD detektorom i Eclipse KSDB-C18, 1,8 mm, 4,6 × 50 mm kolonom (Agilent). Odvajanje analita je postignuto na temperaturi kolone 30 °C i primenom zapremine injektovanog uzorka od 2 µl. Mobilna faza se sastojala od dva eluenta, H<sub>2</sub>O (0,1% HCOOH) (A) i metanola (B), dok je optimalna brzina protoka iznosila 0,75 ml/min. Korišćeno je izokratsko eluiranje sa odnosom mobilnih faza A:B (90:10, v/v). Za

detekciju korišćen je detektor sa nizom dioda (dioda array detector – DAD), čija je talasna dužina bila podešena na 284 nm. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 10 minuta.

### 3.3.1.8. *Određivanje boje*

Boja uzoraka meda je merena hromametrom (Minolta CR-400, Minolta Co., Osaka, Japan). Uzorci (20 g) su stavljeni u držače debljine 20 mm i merenje je vršeno na crno-beloj pozadini na sobnoj temperaturi ( $23 \pm 1$  °C).

Rezultati su prezentovani prema CIELab sistemu boja, u kome su koordinate definisane na sledeći način:  $L^*$  je koordinata svetloće boje (pri čemu 0 označava crno, a 100 belo),  $a^*$  je crveno-zelena koordinata (pri čemu pozitivna vrednost  $a^*$  označava crvenu, a negativna vrednost  $a^*$  označava zelenu boju) i  $b^*$  je žuto-plava koordinata (pri čemu pozitivna vrednost  $b^*$  označava žutu, a negativna vrednost  $b^*$  označava plavu).

Merenja boje uzoraka meda izvršena su u 5 različitih tačaka (1 centralna i 4 ugaone tačke).

### 3.3.1.9. *Određivanje sadržaja minerala*

Sadržaj minerala u uzorcima meda određen je primenom atomske apsorpcione spektrometrije (atomic absorption spectroscopy – AAS). Uzorak meda (5 g) odmeren je u keramički lončić, koji je zagrevan na grejnoj ploči, uz postepeno povećavanje temperature. Nakon nestanka dima koji je isparavao iz uzorka, lončić je prebačen u peć za žarenje, koja je prethodno zagrejana na 550 °C. Nakon 4 h, lončić je uklonjen iz peći i ostavljen da se ohladi. U sledećoj fazi, sadržaju lončića je dodato 5 ml 1:1 HNO<sub>3</sub>, a potom je lončić sa sadržajem zagrevan (120–150 °C) da bi isparila HNO<sub>3</sub> i ponovo prebačen u peć za žarenje (550 °C) na dodatno žarenje tokom 4 h. Ukoliko nije dobijen čist sivobeličasti pepeo, ponovljeno je dodavanje HNO<sub>3</sub> i zagrevanje. Nakon hlađenja, pepeo je rastvoren dodavanjem 10 ml 1:1 HCl i lončić je ponovo zagrevan na 100–110 °C sve dok 5 ml HCl nije isparilo. Preostalih 5 ml je prebačeno u odmerni sud od 50 ml u kome se nalazila odgovarajuća količina Cs i La i dodata je voda do oznake.

Sadržaji K, Na, Mg, Zn, Ca, Cu i Fe mereni su atomskim apsorpcionim spektrofotometrom (Varian SPECTRAA-10, SAD), uz parametre (talasna dužina, prorez, stehiometrija plamena) podešene prema preporuci proizvođača. Standardni rastvori K, Na, Mg, Zn, Ca, Cu i Fe

koncentracije 1000 µg/ml nabavljeni su od kompanije AccuStandard (New Haven, SAD). Sve korišćene kalibracione krive su bile u linearnom opsegu ( $R = 0,999$ ).

### **3.3.1.10. Određivanje sadržaja aminokiselina**

Analiza aminokiselina u medu vršena je primenom jonoizmenjivačke hromatografije korišćenjem automatskog analizatora aminokiselina Biochrom 30+ (Biochrom, Cambridge, Velika Britanija) prema proceduri Spackman-a i saradnika (1958). Razdvojene aminokiseline su nakon eluiranja podrgrnute bojenoj reakciji sa ninhidrinom i detektovane fotometrijski na 570 nm i 440 nm (prolin).

Uzorci meda (3–5 g) rastvoreni su u ultra čistoj vodi (25 ml). Rastvor meda je filtriran kroz PTFE filter veličine pora 0,22 µm (Plano, Teksas, SAD), a filtrat je prebačen u bočicu (Agilent Technologies, SAD) i čuvan u frižideru do analize. Pikovi aminokiselina (asparaginska kiselina, treonin, serin, glutaminska kiselina, prolin, glicin, alanin, cistin, valin, metionin, izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin, histidin, lizin i arginin) su identifikovani na osnovu vremena zadržavanja na koloni u poređenju sa vremenima zadržavanja standarda aminokiselina (standardni rastvor aminokiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)). Rezultati su izraženi u mg/kg u suvoj materiji.

## **3.3.2. Određivanje antioksidativnog potencijala meda**

### **3.3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola**

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola (total phenolic content – TPC) korišćena je Folin-Ciocalteuova metoda, opisana u radu Ferreira i saradnika (2009), uz određene modifikacije. Uzorak meda (1 g) rastvoren je u 20 ml destilovane vode. U 8 ml vodenog rastvora meda dodato je 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa (koncentrovani komercijalni Folin-Ciocalteu reagens razblažen je destilovanom vodom u odnosu 1:2). Nakon 3 minuta, u smešu je dodat 1,5 ml 25% natrijum karbonata. Smeša je mešana vorteksom, a epruvete su pokrivene i ostavljene da stoje na tamnom mestu na 25 °C u toku 2 h. Nakon 2 h izmerena je apsorbancija reakcione smeše na talasnoj dužini 750 nm u odnosu na slepu probu (Specord M40, Carl Zeiss, Jena, Nemačka).



Kao standard za konstrukciju kalibracione krive korišćena je galna kiselina (1,25–31,25 mg/ml), a sadržaj ukupnih fenola je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) (mg GAE/100 g meda).

### **3.3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida**

Uzorak meda (0,5 g) rastvoren je u 1 ml destilovane vode. Rastvor meda je pomešan sa 0,3 ml 5% NaNO<sub>2</sub>. Nakon 5 minuta, u smešu je dodato 0,3 ml 10% AlCl<sub>3</sub> i smeša je mešana vorteksom. Posle 6 minuta, rastvor je neutralisan dodavanjem 2 ml 1 mol/l NaOH. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini 510 nm u odnosu na slepu probu (Specord M40, Carl Zeiss, Jena, Nemačka) (Zhishen et al., 1999).

Kao standard za konstrukciju kalibracione krive korišćen je katehin (1,25–50,0 mg/ml), a sadržaj ukupnih flavonoida je izražen kao ekvivalent katehina (CAE) (mg CAE/100 g meda)

### **3.3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida**

Određivanje sadržaja ukupnih karotenoida (total carotenoid content – TCC) sprovedeno je korišćenjem metode koju su opisali Ferreira i saradnici (2009), uz određene modifikacije. Dva grama uzorka meda pomešana su sa 10 ml n-butanola zasićenog vodom. Uzorak je zatim ostavljen da stoji u mraku na sobnoj temperaturi 18 h. Nakon toga, uzorak je filtriran kroz filter papir (Whatman, Grade 4 Chr, Velika Britanija). Apsorbanca je merena na talasnoj dužini 436 nm u odnosu na slepu probu (Specord M40, Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

Kao standard za konstrukciju kalibracione krive korišćen je β-karoten (0,24–3,84 mg/ml), a sadržaj ukupnih karotenoida je izražen kao ekvivalent β-karotena (BCE) (mg BCE/kg meda).

### **3.3.2.4. Određivanje antiradikalske aktivnosti na DPPH•**

Sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH•) određena je primenom spektrofotometrijske metode Hatano i saradnika (1988), uz određene modifikacije. Uzorak meda (2 g) rastvoren je u 10 ml destilovane vode, centrifugiran (3000 o/min) i filtriran. Potom je u 0,1 ml serije razblaženja meda (25,0, 50,0, 100, 200, 400 i 800 mg/ml) dodato 2,9 ml

metanola, a nakon toga je u smešu dodat 1 ml 90 mmol/l metanolnog rastvora DPPH'. Kontrolni uzorak je umesto rastvora meda sadržao destilovanu vodu. Reakcione smeše su mešane vorteksom i ostavljene da stoje u mraku na sobnoj temperaturi 1 h. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini 517 nm u odnosu na slepu probu (Specord M40, Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

Vrednost IC<sub>50</sub> (mg/ml) je definisana kao koncentracija meda koja je bila potrebna da neutrališe 50% početne količine DPPH'.

### 3.3.3. Određivanje antibakterijske aktivnosti meda

Rastvori meda su pripremljeni razblaživanjem meda sterilnom destilovanom vodom neposredno pre analize kako bi se se dobio opseg razblaženja (37,5%, 18,7%, 9,3%, 4,6% i 2,3%). Uzorci su inkubirani u mraku na 30 °C tokom 30 minuta. Antibakterijska aktivnost meda je određena u odnosu na gram-negativne bakterije – *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Escherichia coli I* (klinički soj), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 35554) i *Proteus mirabilis I* (klinički soj) i gram-pozitivne bakterije – *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus I* (klinički soj), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određena je modifikovanom mikrodilucionom analizom (Szweda, 2017).

Čisti sojevi bakterija su subkultivisani na hranljivim agarima na 37 °C tokom 24 h, dok su suspenzije testiranih sojeva odgovarale McFarlandovoj 0,5 optičkoj gustini  $\approx 1,5 \times 10^8$  CFU/ml.

Mikrotitar ploče su inkubirane na 37 °C tokom 18 h, nakon čega je u svaki bunarčić mikrotitar ploče dodato 10  $\mu$ l 1% rastvora 2,3,5-trifenil tetrazolium hlorida (TTC), koji se delovanjem dehidrogenaza vijabilnih bakterijskih ćelija redukuje do formazana crvene boje. Mikrotitar ploče su dodatno inkubirane na 37 °C tokom 2 h, nakon čega je određena MIC vrednost za svaki uzorak meda.

Najniža koncentracija meda potrebna da spreči pojavu crvene boje formazana smatrana je MIC vrednošću.

Određivanje MIC izvršeno je u tri ponavljanja i tri nezavisna eksperimenta.

### 3.3.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti meda

Za procenu antiproliferativne aktivnosti meda korišćene su humane tumorske linije HeLa (karcinom grlića materice), MCF7 (adenokarcinom epitela dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MRC-5 (normalni fetalni fibroblasti pluća). Čelijske linije su uzgajane u Dulbecco-ovom modifikovanom Eagle's medijumu (DMEM; PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austrija) sa 4,5% glukoze, dopunjenim sa 10% toplotno inaktiviranim fetalnim telećim serumom (fetal calf serum – FCS; PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austrija), 100 IU/ml penicilina i 100 µg/ml streptomocina (Galenika, Beograd, Srbija). Čelijske linije su kultivisane u bocama od 25 ml (Corning, New York, SAD) na 37 °C u uslovima atmosfere sa 5% CO<sub>2</sub> i visoke vlažnosti, subkultivisane dva puta nedeljno. Jednoćelijska suspenzija je dobijena korišćenjem 0,1% tripsina (Serva, Hajdelberg, Nemačka) sa 0,04% EDTA.

Uzorci meda i standard (glukoza) su rastvoreni i razblaženi u 0,9% NaCl da bi se dobio opseg od deset koncentracija (0,15–50 mg/ml). Svi uzorci su filtrirani kroz Millipore (Millek-GV) membranske filtere veličine pora 0,22 µm da bi se postigla sterilnost. Čelijske linije su sakupljene i postavljene u mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića (Sarstedt, Newton, SAD) pri gustini zasejavanja od 4–8 × 10<sup>3</sup> ćelija po bunarčiću, zapremine 180 µl, prethodno inkubirane u medijumu sa dodatkom 5% FCS na 37 °C tokom 24 h. Serija razblaženja (20 µl po bunarčiću) je dodata u ispitne i kontrolne bunarčiće. Mikroploče su zatim inkubirane na 37 °C dodatnih 48 h. Rast ćelija je procenjen korišćenjem kolorimetrijskog testa sulforhodamina B (SRB) po metodi Skehan i saradnika (1990), uz određene modifikacije (Četojević-Simin et al., 2008).

Antiproliferativna aktivnost meda na rast ćelija izračunava se kao udeo ćelija u odnosu na kontrolu, odnosno antiproliferativna aktivnost =  $(A_t/A_c) \cdot 100$  (%), gde je  $A_t$  apsorbanca uzorka, a  $A_c$  je apsorbanca kontrole.

Antiproliferativna aktivnost izražena je kao IC<sub>50</sub> vrednost (koncentracija uzorka koja inhibira rast ćelija za 50%). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD za četiri merenja (n = 4 uzorka i standard) i osam merenja (n = 8 uzoraka i kontrola).

### 3.3.4. Određivanje indeksa relativnog antioksidantnog kapaciteta i indeksa relativne antibakterijske aktivnosti

Centralna tendencija je najčešće primenjena metoda za poređenje antioksidativne aktivnosti kompleksnih uzoraka hrane dobijene primenom različitih metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta (Sun and Ho, 2001). Uzorci se ocenjuju na osnovu minimalno-maksimalne normalizacije, korišćenjem ekstremnih vrednosti antioksidativnog kapaciteta uzoraka dobijenih primenom različitih metoda za određivanje antioksidativnog potencijala. Normalizovane vrednosti antioksidativnih pokazatelja određene su korišćenjem sledećih jednačina:

$$\bar{x}_i = 1 - \frac{\max_i x_i - x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i \quad (1)$$

u slučaju kriterijuma „što viši, to bolji“ (koji se koriste za sadržaje fenola, flavonoida i karotenoida) (1) ili

$$\bar{x}_i = \frac{\max_i x_i - x_i}{\max_i x_i - \min_i x_i}, \quad \forall i \quad (2)$$

u slučaju kriterijuma „što niži, to bolji“ (koji se koriste za vrednosti antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>•</sup> i MIC) (2), gde  $x$  predstavlja eksperimentalne podatke.

Prosek rezultata različitih analiza za određeni uzorak daje bezdimenzionalnu vrednost koja se naziva indeksom relativnog antioksidativnog kapaciteta (relative antioxidant capacity index – RACI). Isti princip je korišćen i pri izračunavanju relativnog antibakterijskog indeksa (relative antibacterial index – RAI).

### 3.3.5. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti u okviru disertacije izvedeni su u tri nezavisna ponavljanja, osim u slučaju određivanja boje uzoraka, koje je obavljeno u 25 ponavljanja, kao i u slučaju određivanja antiproliferativne aktivnosti, koje je obavljeno u 4 ponavljanja, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Utvrđivanje statističke značajnosti razlika između

aritmetičkih sredina sprovedeno je primenom analize varijanse (analysis of variance, ANOVA) i Tukey HSD (honest significant difference) testa višestrukih poređenja sa pragom značajnosti 0,05. Podaci su obrađeni primenom softverskih paketa Microsoft Excel 2010 for Windows i StatSoft Statistica (data analysis software system), version 12.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, SAD).

Analiza glavnih komponenti (principal component analysis – PCA) korišćena je za otkrivanje mogućih korelacija između merenih parametara i za klasifikaciju uzoraka na osnovu njihovog pozicioniranja u PCA dijagramu.

### 3.3.6. Modelovanje veštačke neuronske mreže

Višeslojni perceptron (multilayer perceptron – MLP), koji se sastoji od tri sloja (ulazni, skriveni i izlazni sloj), korišćen je za uspostavljanje modela predikcije (Hu and Weng, 2009). Pre izračunavanja, i ulazni i izlazni podaci su normalizovani da bi se poboljšalo ponašanje veštačke neuronske mreže (artificial neural network – ANN). Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) algoritam je korišćen kao interaktivni metod za rešavanje neograničenih problema nelinearne optimizacije u modelovanju ANN (Griew et al., 2011).

Eksperimentalna baza podataka za ANN je nasumično podeljena na podatke za obuku, unakrsnu validaciju i testiranje (sa 60%, 20% i 20% eksperimentalnih podataka, respektivno). Skup podataka za obuku je korišćen za ciklus učenja ANN, kao i za procenu optimalnog broja neurona u skrivenom sloju i težinskih koeficijenata svakog neurona u mreži.

Težinski koeficijenti povezani sa skrivenim slojem grupisani su u matrice  $W_1$  i  $B_1$ , dok su težinski koeficijenti povezani sa izlaznim slojem grupisani u matrice  $W_2$  i  $B_2$ . Neuronska mreža je obično predstavljena korišćenjem matrične notacije ( $Y$  je matrica izlaznih promenljivih,  $f_1$  i  $f_2$  su prenosne funkcije u skrivenom i izlaznom sloju, respektivno, a  $X$  je matrica ulaznih promenljivih) (Kollo and von Rosen, 2006):

$$Y = f_1(W_2 f_2(W_1 X + B_1) + B_2) \quad (3)$$

Elementi matrica  $W_1$  i  $W_2$  su određeni tokom ciklusa učenja ANN, u interaktivnoj proceduri, korišćenjem algoritma optimizacije da bi se minimizirala greška između izlaznih vrednosti i

eksperimentalnih rezultata (Trelea et al., 1997). Koeficijenti determinacije su korišćeni kao parametri za proveru performansi dobijenog ANN modela.

### 3.3.7. Analiza osetljivosti

Analiza osetljivosti je korišćena za ispitivanje uticaja ulaznih promenljivih u posmatranim izlazima razvijenog ANN modela (Montaño and Palmer, 2003). Neuronske mreže mogu da aproksimiraju eksperimentalne rezultate, koji mogu odstupati i/ili biti delimično neprecizni, pa je, stoga, neophodna analiza osetljivosti kako bi se proverilo da li bi neuronska mreža mogla pogrešno da funkcioniše (Taylor, 2005). Stoga su svakoj ulaznoj promenljivoj dodati beskonačno (infinitezno) mali iznosi (+0,0001%) u 10 podjednako raspoređenih pojedinačnih tačaka obuhvaćenih minimumom i maksimumom eksperimentalnih podataka.

### 3.3.8. Sinteza jonskih tečnosti

Sinteza jonskih tečnosti na bazi holina sprovedena je potenciometrijskom titracijom. Kao titraciono sredstvo korišćen je vodeni rastvor holin hidroksida (ChOH), čija je koncentracija ( $c = 3,50915 \text{ mol/l}$ ) određena titracijom sa standardnim rastvorom dihidrata oksalne kiseline. Odmerena masa nikotinske, buterne i propanske kiseline rastvorena je u vodi na sobnoj temperaturi i rastvor je titrisan holin hidroksidom uz praćenje promena pH vrednosti. Rastvor je pretitrisan dodatkom ChOH sa ciljem određivanja završne tačke titracije. Na osnovu nule drugog izvoda titracione krive, očitana je pH vrednost u završnoj tački titracije i podešena dodatkom nikotinske, buterne i propanske kiseline da odgovara pH vrednosti u završnoj tački titracije ( $\text{pH}_{[\text{Ch}][\text{Nicot}]} = 7,95$ ;  $\text{pH}_{[\text{Ch}][\text{But}]} = 10,40$ ;  $\text{pH}_{[\text{Ch}][\text{Prop}]} = 10,30$ ).

Višak vode je uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi vodenog kupatila  $T = 343,15 \text{ K}$  tokom 120 min. Postupak je nastavljen upotrebom jače (industrijske) vakuum pumpe uz zagrevanje, do potpunog uklanjanja vode. Nakon uparavanja do konstantne mase, jonske tečnosti su čuvane u eksikatoru nad fosfor(V)-oksidom.

Strukture sintetisanih jonskih tečnosti potvrđene su snimanjem infracrvenih spektara (Slika P1a–c).

### 3.3.9. Određivanje faznih dijagrama

Konstrukcija binodalnih krivih zasnovana je na metodi titracije do tačke zamućenja na temperaturi  $T = 298 \pm 1$  K i atmosferskom pritisku. Rastvor kalijum fosfata u 20% rastvoru meda ( $\omega_{\text{sol}} = 55\%$ ) dodavan je u kapima u rastvor jonske tečnosti u 20% rastvoru meda ( $\omega_{\text{JT}} = 60\%$ ) do postizanja zamućenja smeše, a količina dodane soli merena je na analitičkoj vagi (Mettler Toledo ME204, Greifensee, Švajcarska) sa mernom nesigurnošću od  $\pm 10^{-4}$  g. Potom je u smešu dodavan vodeni rastvor meda dok smeša nije postala bistra, a količina dodatog rastvora meda je merena na analitičkoj vagi. Nakon svakog dodavanja, smeša je mešana vorteksom. Ovaj postupak je ponavljan sve dok nije dobijeno dovoljno tačaka za konstruisanje binodalnih krivih. Ternarni fazni dijagrami su konstruisani korišćenjem Merčukove jednačine (4) (Merchuk et al., 1998):

$$Y = A \exp(BX^{0.5} - CX^3) \quad (4)$$

gde su Y i X maseni udeli jonskih tečnosti i soli, dok parametri A, B i C odgovaraju konstantama dobijenim regresijom najmanjih kvadrata.

### 3.3.10. Priprema ternarnih smeša

Pripremljene su ternarne smeše koje sadrže 25% jonske tečnosti, 35%  $K_3PO_4$  i 40% rastvora meda. Smeše su mućkane 2 minuta, centrifugirane 10 minuta na 10.000 o/min i ostavljene 3 h da bi se faze uravnotežile. Faze su potom pažljivo razdvojene mikropipetom, a sadržaj HMF je određen po metodi navedenoj u 3.3.1.7. *Određivanje sadržaja 5-hidroksimetilfurfurala.*

### 3.3.11. Računarske simulacije

Svi proračuni izvedeni su u softveru Jaguar, koji je implementiran kao deo paketa Schrodinger Suite 2015. Inicijalna faza je razmatrala geometrijsku optimizaciju svakog molekula. Optimizacija je izvršena u fazi implicitne solvatacije u vodi, primenom PBF modela rastvarača. Nakon uspešne optimizacije, kombinovani su optimizovani molekuli jonske tečnosti i HMF, a molekulski par je korišćen za dalje simulacije. Nakon početne geometrijske

optimizacije, primenjeni su DFT proračuni. Korišćeni funkcional je bio B3LIP razmena – korelacioni funkcional (B3LYP-D3) praćen 6-31+G (d,p) osnovnim skupom. Validnost rezultata proverena je Hessian analizom, koja je pokazala da nema imaginarnih frekvencija koje dokazuju da su sve optimizovane strukture pravi minimumi. Nevalentne interakcije (non-covalent interactions – NCI) u optimizovanim strukturama analizirane su metodom Johnsona i saradnika (2010). Na osnovu DFT proračuna, izračunate su energije vezivanja jonskog para ( $\Delta G_{bin}$ ) između svih molekula. Da bi se izbegla greška superpozicije baznog skupa (BSSE), energije vezivanja ( $\Delta G_{bin}$ ) su korigovane korišćenjem standardnog pristupa Boys i Bernardija (1970). Dobijen je konačni izraz za  $\Delta G_{bin}$  (5):

$$\Delta G_{bin} = E_{cp}(I-II) - E_{min}(I) - E_{min}(II) + \Delta ZPVE \quad (5)$$

gde su  $E_{CP}(I-II)$  elektronska energija korigovane protivteže ispitivanog para, a  $E_{min}(I)$  i  $E_{min}(II)$  su elektronske energije jonskih tečnosti i HMF u njihovim geometrijama minimalne energije. Energije vibracija nulte tačke ( $\Delta ZPVE$ ) su izračunate korišćenjem skaliranih B3LYP/6-31+G (d) frekvencija vibracija.



# 4. REZULTATI I DISKUSIJA

## 4.1. ISPITIVANJE KVALITETA I TERAPEUTSKIH SVOJSTAVA MEDA

Kvalitet meda regulisan je Codex Alimentarius-om (2001) na međunarodnom nivou, dok je na nacionalnom on definisan Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela (2015), usklađenim sa međunarodnom legislativom. Regulativa propisuje analizu broja polenovih zrna, senzorska i fizičko-hemijska svojstva meda. U okviru fizičko-hemijskih parametara meda određuju se minimalne ili maksimalne količine u odnosu na parametre zrelosti, čistoće i kvara meda. Zrelost meda sagledava se određivanjem sadržaja šećera i vlage, dok se u pogledu čistoće analiziraju sadržaj pepela, električna provodljivost i sadržaj nerastvorljivih čvrstih materija u vodi. U svrhu sticanja uvida u starost (skladištenje ili kvar) meda proverava se sadržaj HMF, kiselost i aktivnost diastaze.

Sagledavanje kvaliteta uzoraka meda sakupljenih u regionu Republike Srbije, sa područja Zapadnog Balkana i iz nekih susednih zemalja sprovedeno je tokom tri uzastopne godine (2016–2018) i to:

- **2016. godina:** 45 uzoraka meda različitog floralnog porekla (bagremov, suncokretov i livadski med) sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine (Republika Srbija);
- **2017. godina:** 100 uzoraka meda različitog floralnog porekla (bagremov, suncokretov, livadski i šumski med) prikupljenih iz devet evropskih zemalja (Srbija, Albanija, Hrvatska, Crna Gora, Rumunija, Bugarska, Bosna i Hercegovina, Severna Makedonija i Mađarska) i

- **2018 godina:** 20 uzoraka specifičnih vrsta meda sa područja Zapadnog Balkana praćenjem fizičko-hemijskih pokazatelja kvaliteta, kao i nekih terapijskih svojstava meda (antioksidativna, antibakterijska i antiproliferativna aktivnost).

Na osnovu antioksidativne i antibakterijske aktivnosti uzoraka meda sakupljenih tokom druge godine istraživanja (uzorci meda iz 2017. godine) određeni su novi parametri, indeks relativnog antioksidantnog kapaciteta (relative antioxidant capacity index – RACI) i indeks relativne antibakterijske aktivnosti (relative antibacterial index – RAI), koji su poslužili za određivanje novodefinisanog svojstva – *Moći meda*, namenjenog za predviđanje zdravstvenog potencijala meda na osnovu lako odredivih parametara kvaliteta meda. Ova predikcija namenjena je brzom i lakom sagledavanju nekih vidova terapijskog potencijala meda, s obzirom da je određivanje antioksidativnog, antibakterijskog i antiproliferativnog profila meda vremenski zahtevno i podrazumeva posedovanje sofisticirane i skupe opreme.

#### **4.1.1. Kvalitet uzoraka meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine**

Kvalitet uzoraka tri vrste meda (bagremov, suncokretov i livadski med), prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine (Srem, Banat i Bačka) tokom 2016. godine, određen je ispitivanjem fizičko-hemijskih parametara, mineralnog sastava, parametara boje i aminokiselinskog profila meda. U tabeli 1 prikazani su parametri fizičko-hemijskog kvaliteta meda (vlaga, kiselost, pH, pepeo, električna provodljivost, glukoza, fruktoza i HMF).

##### **4.1.1.1. Fizičko-hemijski pokazatelji kvaliteta meda**

Sadržaj vlage meda zavisi od njegovog botaničkog porekla, relativne vlažnosti u regionu i uslova obrade i skladištenja (da Silva et al., 2016; Yücel and Sultanoglu, 2013). Niži sadržaj vlage može dovesti do odigravanja reakcije karamelizacije i Maillard-ove reakcije tokom skladištenja meda, dok viši sadržaj vlage može izazvati fermentaciju meda i stvaranje sirćetne kiseline (Chirifie et al., 2006), što se smatra nepoželjnim. Sadržaj vlage može uticati na mnoge parametre kvaliteta meda – kristalizaciju, viskoznost, rastvorljivost, ukus, boju i druge pokazatelje kvaliteta (Escuredo et al., 2013).

Sadržaj vlage kretao se u rasponu od 13,2–21,3%, 15,6–19,7% i 10,2–24,1% za bagremov, livadski i suncokretov med, respektivno, iz čega se može zaključiti da su pojedini uzorci premašili granicu (> 20%) propisanu EU regulativom (Codex Alimentarius, 2001). Uzorci meda koji nisu ispunjavali kriterijum u pogledu sadržaja vlage mogli su ispoljiti nestabilnost tokom skladištenja i biti podložni kvarenju usled fermentacije kvasaca. Iako je u literaturi zabeleženo variranje u sadržaju vlage uzoraka meda različitog botaničkog porekla (Gallina et al., 2010), ispitivanje sadržaja ovog parametra u slučaju uzoraka bagremovog, suncokretovog i livadskog meda, prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. Godine, nije pokazalo statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između ispitivanih vrsta meda.

**Tabela 1.** Fizičko-hemijski parametri uzoraka bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine

Vrsta meda		Vlaga (%)	Kiselost (meq/kg)	pH	Pepeo (%)	Električna provodljivost (mS/cm)	Glukoza (%)	Fruktoza (%)	HMF (mg/kg)
Bagremov med (n = 15)	Srednja vrednost ± SD	16,6±1,82 <sup>a</sup>	9,77±2,08 <sup>a</sup>	3,99±0,14 <sup>a</sup>	0,08±0,02 <sup>a</sup>	0,25±0,03 <sup>a</sup>	30,1±1,56 <sup>a</sup>	34,3±2,08 <sup>a</sup>	2,57±1,96 <sup>b</sup>
	Min	13,2	6,55	3,74	0,05	0,20	27,8	31,7	0,44
	Max	21,3	13,4	4,19	0,11	0,28	33,1	39,4	8,20
	Uzorci prelaze granice	1	0	-	-	0	-	-	0
Livadski med (n = 15)	Srednja vrednost ± SD	17,8±1,55 <sup>a</sup>	19,3±1,88 <sup>b</sup>	3,95±0,12 <sup>a</sup>	0,13±0,03 <sup>b</sup>	0,71±0,0,08 <sup>b</sup>	30,6±1,44 <sup>a</sup>	33,7±1,24 <sup>a</sup>	3,37±2,77 <sup>b</sup>
	Min	15,6	16,0	3,79	0,08	0,43	28,4	31,8	0,58
	Max	19,7	22,5	4,19	0,17	0,76	33,8	36,2	69,5
	Uzorci prelaze granice	0	0	-	-	0	-	-	5
Suncokretov med (n = 15)	Srednja vrednost ± SD	17,7±3,18 <sup>a</sup>	19,1±3,19 <sup>b</sup>	3,88±0,25 <sup>a</sup>	0,15±0,04 <sup>c</sup>	0,73±0,07 <sup>b</sup>	31,2±1,52 <sup>a</sup>	35,9±1,25 <sup>b</sup>	1,19±1,12 <sup>a</sup>
	Min	10,2	8,30	3,38	0,08	0,57	29,4	31,8	0,50
	Max	24,1	21,5	4,16	0,22	0,83	34,1	36,2	5,14
	Uzorci prelaze granice	3	0	-	-	0	-	-	0

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost  
Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koje su prethodno objavili Vanhanen i saradnici (2011) i Boussaid i saradnici (2018). Lazarević i saradnici (2012) su analizirali uzorke meda iz

Srbije, te stoga vredi istaći da su sadržaji vlage dobijeni od strane pomenutih autora (bagremov med  $16,48 \pm 1,3\%$  i suncokretov med  $18,07 \pm 1,5\%$ ) u skladu sa rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima (Tabela 1). Sadržaji vlage u uzorcima meda iz Hrvatske (Šarić et al., 2008) su, takođe, u skladu sa rezultatima prikazanim u tabeli 1.

Kiselost meda se može dovesti u vezu sa prisustvom organskih kiselina i drugih jedinjenja u medu (laktoni, estri i neorganski joni) (da Silva et al., 2016). Tokom kvarenja meda dolazi do fermentacije šećera u organske kiseline, što dovodi do povećanja slobodne kiselosti. Maksimalno dozvoljen nivo kiselosti u medu je  $50,00$  meq/kg (Codex Alimentarius, 2001) i u pogledu ovog parametra kvaliteta svi ispitivani uzorci meda su ispunjavali propisani zahtev (Tabela 1). Med sa najnižom kiselošću bio je bagremov, sa srednjom vrednošću kiselosti  $9,77 \pm 2,08$  meq/kg, dok je livadski med okarakterisan najvišom srednjom vrednošću kiselosti meda ( $19,3 \pm 1,88$  meq/kg), koja se nije razlikovala od suncokretovog meda ( $19,1 \pm 3,19$  meq/kg). Lazarević i saradnici (2012) su, takođe, izmerili najnižu vrednost slobodne kiselosti u bagremovom medu ( $11,6$  meq/kg), dok je najviša zabeležena u suncokretovom medu ( $27,2$  meq/kg). Slične rezultate slobodne kiselosti meda objavili su i Šarić i saradnici (2008), koji su utvrdili postojanje značajne razlike u kiselosti između bagremovog i livadskog meda.

Vrednosti pH meda kreću se između 3,2 i 4,5 (Alves et al., 2013; Gomes et al., 2010; Sakač et al., 2019b), iz čega proizilazi da prirodna kiselost meda inhibira rast mikroorganizama, s obzirom da je optimalna pH vrednost za većinu mikroorganizama između 7,2 i 7,4 (Suárez-Luque et al., 2002). Stoga se može smatrati da je pH vrednost meda pokazatelj mogućeg mikrobnog kvara. Srednje pH vrednosti uzoraka meda iz Vojvodine bile su kisele, relativno bliske i kretale su se u rasponu od  $3,88 \pm 0,25$  za suncokretov med do  $3,99 \pm 0,14$  za bagremov med (Tabela 1). Iako su postojale statistički značajne razlike u kiselosti između ispitivanih vrsta meda, nije bilo varijacija u pH vrednostima ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). Alqarni i saradnici (2016) su, takođe, pokazali da ova dva parametra nisu direktno povezana jedan sa drugim zbog puferskog delovanja različitih kiselina i prisustva minerala. Opseg pH vrednosti uzoraka meda (3,49–4,56) koji su objavili Lazarević i saradnici (2012) je u skladu sa rezultatima prikazanim u tabeli 1.

Sadržaj HMF ukazuje na stepen kvarenja meda uzrokovanog a) jakim i/ili produženim termičkim tretmanom u svrhu razgradnje kristala meda ili supresije njegove mikrobiološke kontaminacije (Kabbani et al., 2011) i b) neadekvatnim ili produženim uslovima skladištenja (Önür et al., 2018). HMF nastaje razgradnjom monosaharida u medu ili tokom Maillard-ove

reakcije. Codex Alimentarius (2001) definiše maksimalan nivo od 40,0 mg/kg za HMF u medu poreklom iz netropskih regiona.

Većina uzoraka bagremovog, livadskog i suncokretovog meda mogla se smatrati svežim, jer su njihove srednje vrednosti HMF (Tabela 1) bile niže od 4,12 mg/kg, sadržaj koji su Tornuk i saradnici (2013) okarakterisali kao granicu za svež med. Uzorci suncokretovog meda razlikovali su se u pogledu sadržaja HMF od druge dve ispitivane vrste meda, ali nije bilo statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) u sadržaju HMF između bagremovog i livadskog meda. U pet uzoraka livadskog meda detektovan je sadržaj HMF viši od maksimalno dozvoljenog nivoa, te, stoga, oni ne ispunjavaju kriterijum definisan Codex Alimentarius-om (2001). Pošto se smatra da je količina od 10 mg/kg HMF prirodno prisutna u medu (Alqarni et al., 2016), ovo značajno povećanje sadržaja HMF u uzorcima livadskog meda moglo bi se pripisati pregrevanju ili neadekvatnom skladištenju (Yücel and Sultanoglu, 2013) ili može biti rezultat falsifikovanja meda dodavanjem invertnog sirupa (Al-Farsi et al., 2018; Capuano and Fogliano, 2011).

Srednja vrednost sadržaja glukoze kretala se od 30,1% do 31,2% za sve ispitivane uzorke meda bez postojanja statistički značajnih razlika ( $p \leq 0,05$ ) između ispitivanih vrsta meda, dok je sadržaj fruktoze varirao između 33,7% i 35,9% i bio je različit u slučaju suncokretovog meda (Tabela 1). Prema Codex Alimentarius-u (2001), ukupni sadržaj glukoze i fruktoze treba da bude iznad 60%. Srednja vrednost ukupnog sadržaja glukoze i fruktoze bila je 64,4% u bagremovom, 64,3% u livadskom i 67,1% u suncokretovom medu, što je u skladu sa zahtevima navedene regulative. Šarić i saradnici (2008) naveli su slične vrednosti za ukupni sadržaj glukoze i fruktoze u uzorcima bagremovog (65,0–75,7%) i livadskog (62,1–76,1%) meda prikupljenim na teritoriji Hrvatske.

Električna provodljivost je uobičajeno određivan parametar u kontroli kvaliteta meda, koji je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem pepela i kiselosti zbog prisustva jona, organskih kiselina i proteina (Yücel and Sultanoglu, 2013). Minerali u med dospevaju prvenstveno polenom, pa je, posledično, električna provodljivost u korelaciji sa sadržajem polena u monofloralnim vrstama meda, odnosno sa botaničkim poreklom meda (Kaškonienė et al., 2010) i može poslužiti u njegovom određivanju (Terrab et al., 2003). Uzorci bagremovog meda okarakterisani su najnižom električnom provodljivošću ( $0,25 \pm 0,03$  mS/cm) (Tabela 1), što je bilo korisno za distinkciju ove vrste meda. Ipak, ovaj parametar nije mogao da se iskoristi za razlikovanje livadskog i suncokretovog meda. Dobijene srednje vrednosti električne provodljivosti uzoraka

meda iz Vojvodine bile su generalno niže od maksimalne vrednosti (0,800 mS/cm) definisane Codex Alimentarius-om (2001) i slične rezultatima električne provodljivosti meda koje su prethodno objavili Lazarević i saradnici (2012) i Šarić i saradnici (2008).

Sadržaj pepela u svim ispitivanim uzorcima meda varirao je između 0,05% i 0,22% i razlike su bile statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1), što je u slučaju ispitivanih vrsta meda moglo da ukaže na mogućnost razlikovanja po botaničkom poreklu, mada sadržaj minerala pre svega ukazuje na geografsko poreklo, jer zavisi od vrste zemljišta na kome rastu biljke sa kojih je sakupljan nektar (Karabagias et al., 2014; Suárez-Luque et al., 2005).

Iako Codex Alimentarius (2001) ne definiše zahteve po pitanju sadržaja minerala u medu, uzorci bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljeni sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine podvrgnuti su ispitivanju sadržaja minerala (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sadržaj minerala uzoraka bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine

Vrsta meda		K	Na	Mg	Zn	Ca	Cu	Fe
		(mg/kg)						
Bagremov med (n = 15)	Srednja vrednost	239 <sup>a</sup>	< 50	6,20 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	32,8 <sup>a</sup>	< 1	1,24 <sup>a</sup>
	Min	23,8		2,50	0,10	1,67		0,50
	Max	763		22,6	4,50	172		10,8
Livadski med (n = 15)	Srednja vrednost	468 <sup>b</sup>	< 50	20,1 <sup>b</sup>	1,84 <sup>a</sup>	137 <sup>b</sup>	< 1	0,79 <sup>a</sup>
	Min	136		2,50	0,10	8,81		0,50
	Max	755		35,5	6,69	219		1,59
Suncokretov med (n = 15)	Srednja vrednost	590 <sup>c</sup>	< 50	24,5 <sup>b</sup>	1,73 <sup>a</sup>	162 <sup>b</sup>	< 1	0,89 <sup>a</sup>
	Min.	217		14,8	0,49	97,1		0,50
	Max.	1192		30,8	9,04	269		5,19

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost

Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

Sabiranjem sadržaja pojedinačno određenih minerala u medu dobijena je srednja vrednost ukupnog sadržaja minerala, koja se kretala od 297 mg/kg (bagremov med) do 793 mg/kg (suncokretov med), a razlike između ispitivanih vrsta meda bile su statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ). Dobijene vrednosti su uporedive sa onima koje su dobili Vanhanen i saradnici (2011), koje su se kretale u rasponu od 126–4060 mg/kg za srednju vrednost ukupnog sadržaja minerala dobijenu

za izmerenih 18 pojedinačnih minerala u monofloralnim vrstama meda sa Novog Zelanda. Najniža srednja vrednost ukupnog sadržaja minerala u bagremovom medu prethodno je potvrđena od strane Šarića i saradnika (2008).

Preovlađujući mineral u svim ispitivanim uzorcima meda iz Vojvodine bio je K, slede ga Ca, Mg, Zn i Fe, dok su Na i Cu bili ispod limita detekcije (LOQ) za te minerale ( $< 50$  i  $< 1$ , respektivno) (Tabela 2). Sličan sadržaj minerala identifikovali su i Alqarni i saradnici (2014). Činjenica da je kalijum najzastupljeniji mineral u medu (da Silva et al., 2016) potvrđena je i rezultatima prikazanim u tabeli 2. Najveći sadržaj K identifikovan je u suncokretovom medu (srednja vrednost 590 mg/kg), dok je najniži određen u bagremovom medu (srednja vrednost 239 mg/kg). Suprotno rezultatima prikazanim u tabeli 2, Alqarni i saradnici (2014) su ustanovili da bagremov med iz Saudijske Arabije karakteriše najveći sadržaj K u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama meda, što ukazuje da vrsta zemljišta utiče na profil minerala u medu (geografsko poreklo meda).

Dobijeni sadržaji K u uzorcima meda iz Vojvodine u saglasnosti su sa količinama K detektovanim u uzorcima monofloralnog meda sa Novog Zelanda (Vanhanen et al., 2011), što predstavlja 74% ukupnog sadržaja minerala u livadskom i suncokretovom medu, dok je ovaj udeo iznosio čak 86% za bagremov med. Vanhanen i saradnici (2011) su utvrdili da je udeo K u ukupnom sadržaju minerala 73%, Fernandez-Torres i saradnici (2005) navode da on iznosi 72%, dok su Bogdanov i saradnici (2007) otkrili da sadržaj K odgovara samo jednoj trećini sadržaja ukupnih minerala.

Suncokretov med odlikovao je ne samo najveći sadržaj K, nego i Ca i Mg (srednje vrednosti 162 mg/kg i 24,5 mg/kg, respektivno) (Tabela 2). Utvrđene srednje vrednosti Ca u uzorcima suncokretovog i livadskog meda bile su veće od rezultata koje su objavili Vanhanen i saradnici (2011) i Alqarni i saradnici (2014) (7,21–94,3 mg/kg i 63,8–99,9 mg/kg, respektivno). Suprotno tome, sadržaj Mg u uzorcima meda iz Vojvodine bio je znatno niži od rezultata koje su objavili Alqarni i saradnici (2014). Navedeni autori su, takođe, ustanovili sadržaj Na u medu ispod 27 mg/kg, što je u skladu sa rezultatima sadržaja Na prikazanim u tabeli 2.

Sadržaj Fe u uzorcima meda iz Vojvodine (srednje vrednosti 0,79 mg/kg za livadski med i 1,24 mg/kg za bagremov med) bio je značajno niži od istog u uzorcima meda iz Saudijske Arabije (67–98 mg/kg) (Alqarni et al., 2014), dok su razlike između sadržaja Zn bile manje. Naime, rezultati Alqarni i saradnika (2014) kretali su se u opsegu 3,44–5,72 mg/kg, dok su

sadržaji Zn u medu iz Vojvodine bili u rasponu od 0,78 mg/kg za bagremov med do 1,84 mg/kg za livadski med (Tabela 2).

Boja meda je senzorski parametar važan za potrošače. Prirodna boja meda posledica je različitih faktora, kao što su mineralni sastav, botaničko poreklo, uslovi skladištenja, klima i drugi i može biti korisna u klasifikaciji monofloralnih vrsta meda (Gonzales et al., 1999). Prirodni med sa većim sadržajem minerala ima tendenciju da bude tamniji (González-Miret et al., 2005). Podaci u tabeli 3 ilustruju parametre boje ispitivanih uzoraka meda iz Vojvodine. Srednja vrednost svetloće uzoraka bagremovog meda bila je najveća ( $73,9 \pm 8,90$ ), što ukazuje da je ovaj med bio najsvetliji, dok su suncokretov i livadski med bili tamniji, sa  $L^*$  vrednošću  $64,5 \pm 7,11$  i  $57,0 \pm 6,10$ , respektivno. Zeleni ton je bio prisutan u svim uzorcima (negativna  $a^*$  vrednost), dominantno u medu od suncokreta. Žuti ton ( $b^*$ ) bio je najniži kod bagremovog meda, dok su livadski i suncokretov med shodno tom parametru boje pripadali istoj grupi.

**Tabela 3.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine

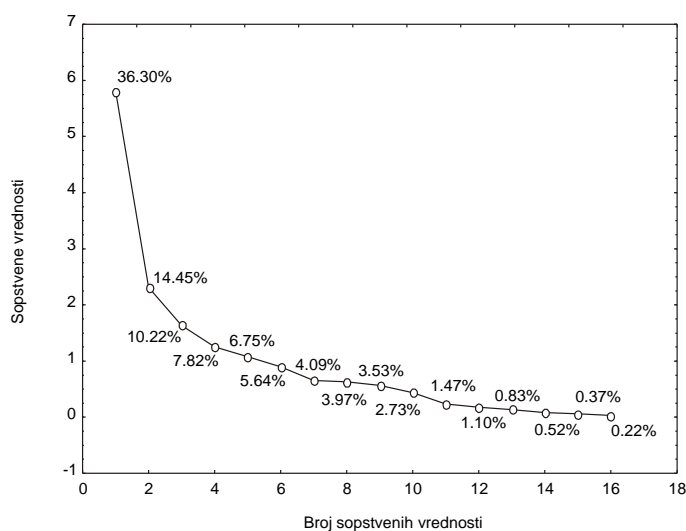
Vrsta meda		Parametri boje		
		$L^*$	$a^*$	$b^*$
Bagremov med (n = 15)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$73,9 \pm 8,90^c$	$-2,24 \pm 0,63^a$	$13,9 \pm 4,15^a$
	Min	51,6	-2,86	8,45
	Max	82,4	-0,67	24,9
Livadski med (n = 15)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$57,0 \pm 6,10^a$	$-1,68 \pm 1,15^a$	$31,0 \pm 4,65^b$
	Min	46,3	-4,28	24,6
	Max	68,1	-0,12	40,1
Suncokretov med (n = 15)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$64,5 \pm 7,11^b$	$-3,48 \pm 1,15^b$	$29,4 \pm 5,30^b$
	Min	52,8	-5,47	23,2
	Max	76,9	-1,86	40,1

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost  
Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).



#### 4.1.1.2. Analiza glavnih komponenti (PCA) uzoraka meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine

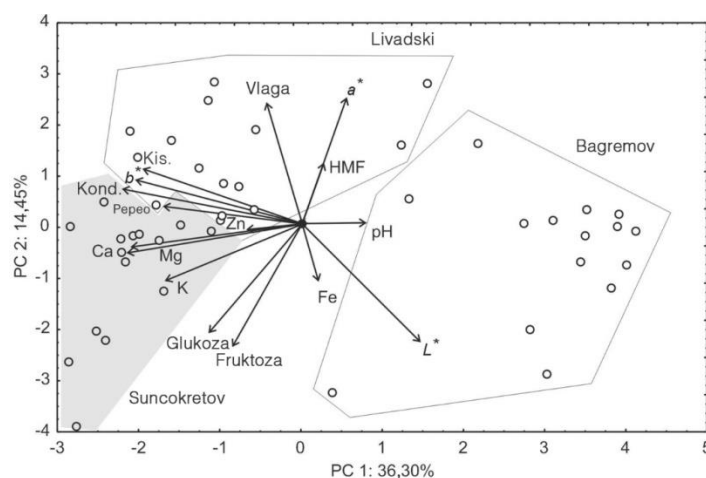
Nakon određivanja fizičko-hemijskih parametara meda, primenjena je analiza glavnih komponenti (PCA) za utvrđivanje sličnosti između različitih vrsta meda prikupljenih sa različitih lokacija teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine. PCA je korišćena da bi se na reprezentativan i lako saglediv način prezentovali određeni parametri kvaliteta meda i ispitivani uzorci različitih vrsta meda u dvodimenzionalnom dijagramu. Prema rezultatima sa slike 19, prvih pet glavnih komponenti imaju sopstvene vrednosti veće od 1. Ovih pet komponenti opisuju 75,53% varijacije podataka. Međutim, sa dijagrama prikazanog na slici 19 uočljivo je da sopstvene vrednosti počinju da menjaju nagib nakon druge glavne komponente, što dovodi do zaključka da samo prve dve glavne komponente (koje opisuju 50,75% varijacije) mogu da se koriste za adekvatno objašnjenje podataka. Procenat opisane varijanse promenljivih je uziman u obzir kako bi se procenile korelacije između promenljivih.



**Slika 19.** Sopstvene vrednosti korelacione matrice

PCA prezentovanih fizičko-hemijskih parametara objašnjava da prve dve glavne komponente čine 50,75% od ukupne varijanse (36,30% i 14,45%, respektivno) za šesnaest promenljivih (vlaga, kiselost, pH, pepeo, provodljivost, glukoza, fruktoza, HMF,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , K, Mg, Zn, Ca i Fe) (Slika 20). Shodno PCA dijagramu, negativan uticaj na prvu glavnu komponentu (PC1) zabeležen je za nekoliko parametara. Doprinos kiselosti je bio 11,5% od ukupne varijanse, dok je

za pepeo on iznosio 8,80%, za provodljivost 14,5% i za  $b^*$  12,4%. Pored toga, doprinosi K, Mg i Ca ukupnoj varijansi iznosili su 8,5%, 13,9%, odnosno 13,2%, respektivno.



**Slika 20.** Analiza glavnih komponenti (PCA) bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine

Parametar boje  $a^*$  (17,9%) i vlaga (15,9%) ispoljili su pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu (PC2), dok su parametar boje  $L^*$  (16,0%), sadržaj glukoze (13,1%) i sadržaj fruktoze (16,8%) pokazali negativan uticaj na drugu glavnu komponentu (PC2).

Chakir i saradnici (2016) su, ispitujući uzorke različitih vrsta meda, ustanovili da su promenljive koje su upečatljivo doprinosile prvoj glavnoj komponenti (PC1) u PC analizi kiselost meda, boja, HMF i aktivnost dijastaze, dok je električna provodljivost značajno doprinosila drugoj glavnoj komponenti (PC2). Terrab i saradnici (2002) su došli do zaključka da su sadržaj vlage, kiselost i sadržaj prolina najvažniji klasifikacioni faktori, dok Oroian i Ropciuc (2017) navode da su parametar boje  $a^*$ , sadržaj pepela i električna provodljivost ključni za razlikovanje vrsta meda primenom PCA. Oroian i Ropciuc (2017) su, takođe, ustanovili da su uzorci suncokretovog meda i polifloralne vrste meda bliske u PCA dijagramu, jer polifloralni med odlikuje prisustvo više vrsta polena, što se odražava na njegovu neizdvojenost u PCA dijagramu. Identičan zaključak mogao bi se izvesti na osnovu PCA dijagrama sa slike 20 kada je u pitanju polifloralni livadski med. Generalno, iako rezultati PCA analize sa slike 20 idu u prilog već publikovanim opservacijama, u PC analizi treba biti oprezan, jer rezultati PCA analize,

odnosno usmerenost vektora promenljivih, veoma zavise od broja i vrste promenljivih, te ih, stoga, treba smatrati donekle uporedivima.

Na osnovu PC analize prikazane na slici 20, diverzitet različitih vrsta meda moguće je odrediti na osnovu vrednosti parametra boje  $L^*$  (negativan doprinos drugoj glavnoj komponenti PC2), povećanog sadržaja minerala (Ca, Mg i K) (negativan doprinos prvoj glavnoj komponenti PC1), povećane vlage meda (pozitivan doprinos prvoj glavnoj komponenti PC1) i na osnovu vrednosti parametra boje  $a^*$  (pozitivan uticaj na PC2).

Uzorci bagremovog meda nalaze se na desnoj strani PCA dijagrama i karakteriše ih najveća vrednost  $L^*$ . Na suprotnoj, levoj strani dijagrama, mogu se uočiti uzorci suncokretovog meda, koje odlikuju povećani sadržaji Ca, Mg i K. Povećana vrednost parametra  $b^*$  i povećan nivo kiselosti i električne provodljivosti su, takođe, specifični za uzorke suncokretovog meda u poređenju sa uzorcima bagremovog meda. Uzorci livadskog meda su pozicionirani između grupe uzoraka suncokretovog meda i grupe uzoraka bagremovog meda, odnosno smešteni su u gornjem delu PCA dijagrama. Uzorke livadskog meda odlikuju najveći sadržaji vlage i povećane vrednosti parametra boje  $a^*$  u poređenju sa drugim ispitivanim uzorcima meda.

Generalno, PC analiza ispitivanih uzoraka tri vrste meda karakterističnih za region Autonomne Pokrajine Vojvodine dovela je do zaključka da se na osnovu određenih fizičko-hemijskih parametara kvaliteta meda uzorci mogu diferencirati na PCA dijagramu, s tim da uzorci bagremovog meda čine klaster, dok se uzorci suncokretovog i livadskog meda pozicioniraju jedni do drugih, sa izvesnom mogućnošću distinkcije na osnovu pojedinih promenljivih.

Na osnovu svega izloženog, analizom uzoraka meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine zaključeno je da su za većinu uzoraka bili ispunjeni zakonom definisani kriterijumi kvaliteta, osim za četiri uzorka u pogledu sadržaja vlage i pet uzoraka u pogledu sadržaja HMF, odnosno 20% svih ispitanih uzoraka meda (45) nije bilo u skladu sa regulativom EU.

#### ***4.1.1.3. Aminokiselinski profil uzoraka meda iz Autonomne Pokrajine Vojvodine***

Proteini i aminokiseline u medu se pripisuju animalnim i biljnim izvorima, mada je njihovo poreklo primarno vezano za polen (Escuredo et al., 2013; Sak-Bosnar and Sakač, 2012). Stoga se

aminokiselinski profil meda može smatrati karakterističnim za botaničko poreklo meda (Anklam, 1998; da Silva et al., 2016; Hermosín et al., 2003). Postoje radovi koji ukazuju na mogućnost razlikovanja različitih vrsta meda na osnovu aminokiselinskog profila (Hermosin et al., 2003; Kečkeš et al., 2013; Rebane and Herodes, 2008; Sun et al., 2017), što je bio i razlog da ispitivanjem uzoraka bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine bude ustanovljeno da li postoji osnova za distinkciju ispitivanih uzoraka meda na osnovu njegovog aminokiselinskog sastava.

U tabeli 4 prikazan je aminokiselinski profil uzoraka bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine.

**Tabela 4.** Aminokiselinski profil uzoraka bagremovog, suncokretovog i livadskog meda prikupljenih sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine tokom 2016. godine

Aminokiseline (mg/kg)	Parametri	Vrsta meda i broj uzoraka		
		Bagremov med (15)	Suncokretov med (15)	Livadski med (15)
Asparaginska kiselina	Srednja vrednost ± SD	30,3 ± 51,4 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00	15,9 ± 35,5 <sup>a</sup>
	Min	0	0,00	0
	Max	139	0,00	104
Treonin	Srednja vrednost ± SD	7,02 ± 15,1 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00	6,49 ± 14,4 <sup>a</sup>
	Min	0	0,00	0
	Max	48,0	0,00	41,7
Serin	Srednja vrednost ± SD	51,3 ± 18,0 <sup>a</sup>	68,7 ± 19,5 <sup>a</sup>	56,8 ± 15,7 <sup>a</sup>
	Min	24,6	20,4	21,5
	Max	76,2	86,2	75,8
Glutaminska kiselina	Srednja vrednost ± SD	100 ± 41,3 <sup>a</sup>	413 ± 196 <sup>b</sup>	134 ± 110 <sup>a</sup>
	Min	13,4	103	12,6
	Max	155	638	394
Prolin	Srednja vrednost ± SD	541 ± 180 <sup>a</sup>	745 ± 224 <sup>b</sup>	459 ± 91,8 <sup>a</sup>
	Min	168	279	299
	Max	745	931	634
Glicin	Srednja vrednost ± SD	51,8 ± 30,5 <sup>a</sup>	70,8 ± 23,6 <sup>a</sup>	45,5 ± 25,2 <sup>a</sup>
	Min.	4,40	19,3	20,4
	Max.	97,4	95,7	101
Alanin	Srednja vrednost ± SD	46,8 ± 25,2 <sup>a</sup>	109 ± 24,9 <sup>b</sup>	36,4 ± 18,7 <sup>a</sup>
	Min	7,31	80,2	10,4

	Max	80,3	154	75,7
Cistin	Srednja vrednost ± SD	22,9 ± 10,7 <sup>a</sup>	12,4 ± 5,65 <sup>a</sup>	38,4 ± 56,8 <sup>a</sup>
	Min	13,1	3,80	7,54
	Max	41,0	22,0	193
Valin	Srednja vrednost ± SD	30,4 ± 13,0 <sup>a</sup>	57,0 ± 31,6 <sup>b</sup>	30,6 ± 23,7 <sup>a</sup>
	Min	4,12	19,5	5,69
	Max	46,2	117	73,2
Metionin	Srednja vrednost ± SD	48,7 ± 85,6 <sup>a</sup>	35,2 ± 24,5 <sup>a</sup>	30,3 ± 31,8 <sup>a</sup>
	Min	0	17,7	0
	Max	283	86,6	98,4
Izoleucin	Srednja vrednost ± SD	16,5 ± 8,57 <sup>ab</sup>	32,9 ± 18,2 <sup>b</sup>	14,3 ± 17,3 <sup>a</sup>
	Min	0	9,90	0
	Max	28,3	67,6	54,8
Leucin	Srednja vrednost ± SD	25,3 ± 15,7 <sup>a</sup>	61,9 ± 40,5 <sup>b</sup>	37,8 ± 31,3 <sup>ab</sup>
	Min	0	30,2	3,84
	Max	47,4	150	102
Tirozin	Srednja vrednost ± SD	18,8 ± 11,1 <sup>a</sup>	52,0 ± 77,1 <sup>a</sup>	72,0 ± 86,8 <sup>a</sup>
	Min	8,14	9,05	0
	Max	43,5	268	308
Fenilalanin	Srednja vrednost ± SD	138 ± 41,7 <sup>a</sup>	135 ± 29,8 <sup>a</sup>	125 ± 22,6 <sup>a</sup>
	Min	97,7	92,4	93,8
	Max	226	193	157
Histidin	Srednja vrednost ± SD	19,9 ± 13,0 <sup>a</sup>	38,1 ± 5,08 <sup>b</sup>	20,3 ± 10,9 <sup>a</sup>
	Min	0	29,4	0
	Max	45,6	45,0	39,1
Lizin	Srednja vrednost ± SD	28,3 ± 15,8 <sup>a</sup>	48,2 ± 9,06 <sup>b</sup>	33,2 ± 22,8 <sup>ab</sup>
	Min	0,02	37,3	0
	Max	55,2	63,5	71,7
Arginin	Srednja vrednost ± SD	18,3 ± 11,3 <sup>a</sup>	13,6 ± 8,42 <sup>a</sup>	15,5 ± 16,6 <sup>a</sup>
	Min	0	1,27	0
	Max	32,0	27,2	58,3
<b>Ukupne aminokiseline</b>		<b>1195 ± 226</b>	<b>1893 ± 346</b>	<b>1171 ± 353</b>

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost

Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

Ukupan sadržaj aminokiselina u ispitivanim uzorcima meda varirao je u zavisnosti od vrste meda i iznosio je  $1171 \pm 353$  mg/kg,  $1195 \pm 226$  mg/kg i  $1893 \pm 346$  mg/kg za livadski, bagremov i suncokretov med, respektivno (Tabela 4). Skoro sve ispitivane aminokiseline utvrđene su u medu karakterističnom za region Vojvodine (sa izuzetkom asparaginske kiseline i

treonina u uzorcima suncokretovog meda), uključujući aminokiseline koje sadrže sumpor, a koje nisu detektovane u medu iz Estonije (Rebane and Herodes, 2008) i medu iz Kine (Sun et al., 2017), dok su identifikovane u medu iz Španije i Francuske (Cotte et al., 2004; Hermosin et al., 2003). Ukupan sadržaj aminokiselina u uzorcima meda sakupljenim u Vojvodini bio je veći nego u medu iz Estonije i Francuske (Cotte et al., 2004; Rebane and Herodes, 2008).

Dominantna aminokiselina u svim ispitivanim uzorcima meda bila je prolin sa udelom od oko 46%, 41% i 39% u bagremovom, livadskom i suncokretovom medu, respektivno. Njegov udeo u ukupnim aminokiselinama manji je od udela navedenog u radu Pawlovske i Armstronga (1994), koji su ustanovili da 50–85% od ukupnih aminokiselina u medu pripada prolinu. Takođe, Sun i saradnici (2017) otkrili su da prolin čini 50% aminokiselina u medu iz Kine.

Sadržaj prolina u svim ispitivanim uzorcima meda iz Vojvodine bio je iznad 180 mg/kg (Tabela 4), koliko je definisano kao minimalni nivo u medu vrhunskog kvaliteta (Hermosin et al., 2003).

Sadržaj prolina bio je najveći u uzorcima suncokretovog meda u poređenju sa drugim ispitivanim uzorcima (Tabela 4). Razlike između sadržaja prolina su statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) u slučaju livadskog i suncokretovog meda, odnosno bagremovog i suncokretovog meda, ali nema statistički značajne razlike kada se porede srednje vrednosti sadržaja prolina za bagremov i livadski med. Ova konstatacija ukazuje da sadržaj prolina ne može da posluži u slučaju ispitivanih vrsta meda za njihovo razlikovanje.

Sadržaj prolina u uzorcima meda prikupljenim na lokacijama u Vojvodini bio je veći od ranije utvrđenih sadržaja navedenih u literaturi. Rebane i Herodes (2008) su utvrdili da je sadržaj prolina u polifloralnim vrstama meda iz Estonije  $382 \pm 154$  mg/kg, što je niža vrednost od one izmerene u uzorcima polifloralnog meda iz Vojvodine ( $459 \pm 91,8$  mg/kg u livadskom medu) (Tabela 4).

Pored prolina i druge aminokiseline su prisutne u medu – glutaminska kiselina > fenilalanin > glicin > serin u uzorcima bagremovog i livadskog meda, dok se suncokretov med odlikovao većim količinama alanina u odnosu na serin (Tabela 4).

## 4.1.2. Kvalitet uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja

Tokom 2017. godine prikupljeni su uzorci meda različitog floralnog porekla (bagremov, suncokretov, livadski i šumski med) sa teritorije devet evropskih zemalja (Srbija, Albanija, Hrvatska, Crna Gora, Rumunija, Bugarska, Bosna i Hercegovina, Severna Makedonija i Mađarska) i ispitivani su njihovi fizičko-hemijski parametri. Pored niza fizičko-hemijskih parametara određena je i njihova antioksidativna i antibakterijska aktivnost sa ciljem identifikacije korelacija koje je trebalo da posluže u izboru parametara svrsishodnih u proceni zdravstveno dobrobitnih svojstava meda, izraženih kao *Moć meda*. Korišćenje modela veštačke neuronske mreže omogućilo je da se predvidi *Moć meda*, dobijena kao prosek indeksa relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI) i indeksa relativne antibakterijske aktivnosti (RAI).

### 4.1.2.1. Fizičko-hemijski pokazatelji uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja

U tabeli 5 prikazani su fizičko-hemijski parametri različitih vrsta meda (bagremov, suncokretov, livadski i šumski med) prikupljenih iz devet evropskih zemalja (Srbija, Albanija, Hrvatska, Crna Gora, Rumunija, Bugarska, Bosna i Hercegovina, Severna Makedonija i Mađarska) tokom 2017. godine.

Sadržaj vlage se kretao u rasponu od 15,4–18,7%, 16,2–20,4%, 15,2–20,3% i 15,2–19,1% za bagremov, livadski, suncokretov i šumski med, što znači da su pojedini uzorci (1 uzorak u grupi livadskog i 1 uzorak u grupi suncokretovog meda) premašili granicu ( $> 20\%$ ) propisanu EU regulativom (Codex Alimentarius, 2001). Iako je u literaturi zabeležena varijacija u sadržaju vlage između uzoraka meda različitog botaničkog porekla (Gallina et al., 2010), nije bilo statistički značajnih razlika ( $p \leq 0,05$ ) u ovom parametru između ispitivanih vrsta meda. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koje su objavili Poppek i saradnici (2017) i Oroian i saradnici (2018).

Slobodna kiselost je rezultat prisustva H donora u medu, odnosno prisustva organskih kiselina u ravnoteži sa odgovarajućim laktonima i nekim neorganskim jonima. Fermentacija šećera u organske kiseline dovodi do povećane kiselosti meda. Maksimalno dozvoljen nivo kiselosti u medu je 50,0 meq/kg (Codex Alimentarius, 2001) i u pogledu ovog definisanog nivoa jedan uzorak livadskog meda nije ispunio ovaj kriterijum (Tabela 5). Med sa najnižom kiselošću

bio je bagremov sa srednjom vrednošću kiselosti  $16,1 \pm 6,28$  meq/kg, dok je šumski med okarakterisan najvišom srednjom vrednošću ( $38,0 \pm 5,42$  meq/kg). Vrednosti slobodne kiselosti za livadski med su u skladu sa rezultatima studije Matovića i saradnika (2018), koji su ispitali uzorke livadskog i bagremovog meda prikupljene u urbanim sredinama Srbije, dok su Albu i saradnici (2022) detektovali slične vrednosti slobodne kiselosti suncokretovog meda prikupljenog u Rumuniji. Derewiaka i saradnici (2021) potvrdili su najvišu vrednost slobodne kiselosti šumskog meda u poređenju sa ostalim tradicionalnim i netradicionalnim vrstama meda iz Poljske.

**Tabela 5.** Fizičko-hemijski parametri uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine

Vrsta meda		Vlaga (%)	Kiselost (meq/kg)	pH	Električna provodljivost (mS/cm)	Glukoza (%)	Fruktoza (%)	HMF (mg/kg)
Bagremov med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	17,6 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	16,1 $\pm$ 6,28 <sup>a</sup>	4,54 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	0,15 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	29,9 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	33,0 $\pm$ 2,29 <sup>ab</sup>	15,2 $\pm$ 11,3 <sup>a</sup>
	Min	15,4	5,27	3,56	0,08	27,9	28,9	0,90
	Max	18,7	33,5	5,77	0,29	31,8	37,4	46,2
	Uzorci prelaze granice	0	0	-	0	-	-	<b>1</b>
Livadski med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	17,9 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	22,8 $\pm$ 10,4 <sup>ab</sup>	4,41 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>	0,32 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	30,0 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>	32,1 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	27,4 $\pm$ 19,8 <sup>a</sup>
	Min	16,2	3,50	3,56	0,03	27,8	29,1	0,25
	Max	20,4	51,7	5,54	0,49	32,9	35,7	84,8
	Uzorci prelaze granice	1	1	-	0	-	-	<b>3</b>
Suncokretov med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	17,2 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	27,7 $\pm$ 4,16 <sup>ab</sup>	3,77 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	31,2 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>	34,6 $\pm$ 1,81 <sup>b</sup>	21,4 $\pm$ 13,1 <sup>a</sup>
	Min	15,2	22,0	3,21	0,27	28,2	30,2	0,89
	Max	20,3	38,5	4,96	0,45	33,9	37,2	47,8
	Uzorci prelaze granice	1	0	-	0	-	-	<b>1</b>
Šumski med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	17,7 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	38,0 $\pm$ 5,42 <sup>b</sup>	4,51 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	0,51 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	29,9 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	33,4 $\pm$ 2,06 <sup>ab</sup>	30,6 $\pm$ 27,6 <sup>a</sup>
	Min	15,2	20,5	3,56	0,11	27,0	30,5	5,32
	Max	19,1	49,3	5,23	1,38	33,0	37,4	150
	Uzorci prelaze granice	0	0	-	1	-	-	<b>3</b>

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost

Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).



Srednje vrednosti pH uzoraka meda iz devet evropskih zemalja su kisele i relativno bliske ( $4,54 \pm 0,46$ ,  $4,51 \pm 0,52$  i  $4,41 \pm 0,44$ ) za bagremov, šumski i livadski med, respektivno, dok su uzorci suncokretovog meda imali nešto nižu pH vrednost ( $3,77 \pm 0,57$ ) (Tabela 5). Iako su postojale razlike u kiselosti između ispitivanih vrsta meda, one nisu bile statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) kada su u pitanju bagremov, livadski i suncokretov med, dok se kiselost šumskog meda statistički značajno razlikovala ( $p \leq 0,05$ ) od drugih ispitivanih vrsta meda (Tabela 5).

Električna provodljivost uzoraka meda kretala se u rasponu 0,03–1,38 mS/cm (Tabela 5). Uzorci bagremovog meda okarakterisani su najnižom električnom provodljivošću ( $0,15 \pm 0,05$  mS/cm), što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Uršulin-Trstenjaka i saradnika (2017) i Albu i saradnika (2021), koji su analizirali uzorke bagremovog meda iz istočne Rumunije. Šumski med je imao višestruko veće vrednosti električne provodljivosti (1,38 mS/cm) od bagremovog, livadskog i suncokretovog meda. Dobijeni rezultati električne provodljivosti su u skladu sa nacionalnom zakonskom regulativom, koja propisuje vrednosti električne provodljivosti ispod 0,8 mS/cm za bagremov i poliflorni med i više od 0,8 mS/cm za šumski med. Visoke vrednosti električne provodljivosti šumskog meda su u skladu sa rezultatima koje su objavili Vasić i saradnici (2019) i Kuš i saradnici (2017).

Srednja vrednost sadržaja glukoze kretala se od 29,9% do 31,2% za sve ispitivane uzorke meda bez statistički značajnih razlika ( $p \leq 0,05$ ) između vrsta meda, dok je sadržaj fruktoze varirao između 32,1% i 34,6% (Tabela 5). Srednja vrednost ukupnog sadržaja glukoze i fruktoze bila je 62,9% u bagremovom, 62,1% u livadskom, 63,3% u šumskom i 65,8% u suncokretovom medu, što je bilo u skladu sa zahtevima Codex Alimentarius-a (2001). Slične vrednosti za ukupan sadržaj glukoze i fruktoze u medu objavili su i Rodríguez-Flores i saradnici (2019) u uzorcima meda iz Španije i Nedić i saradnici (2022), koji su okarakterisali uzorke meda sakupljene na planini Tari u Srbiji.

U uzorcima meda sakupljenim tokom 2017. godine detektovan je sadržaj HMF viši od dozvoljenog nivoa (1 uzorak bagremovog, 1 uzorak suncokretovog, 3 uzorka livadskog i 3 uzorka šumskog meda), te stoga 8% od ukupno ispitivanih uzoraka meda nije ispunjavalo kriterijum za HMF koji je definisan Codex Alimentarius-om (2001). U pojedinim uzorcima livadskog i šumskog meda detektovan je izuzetno visok sadržaj HMF (84,8 mg/kg i 150 mg/kg, respektivno), što je ukazalo na neophodnost kontinuiranog monitoringa u pogledu kvaliteta i zdravstvene bezbednosti meda.

Sadržaj ukupnih minerala analiziranih uzoraka meda prikazan je u tabeli 6. Dobijena srednja vrednost ukupnog sadržaja minerala kretala se od  $140 \pm 101$  mg/kg (bagremov med) do  $1289 \pm 367$  mg/kg (šumski med), a razlike između ispitivanih vrsta meda bile su statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ). U literaturi je dokumentovano da med koji sadrži sekret medljike ili ima tamnu boju (npr. medljika, jela, šumsko cveće i drugi) karakteriše veći sadržaj minerala u odnosu na nektarski med (Bogdanov et al., 2007). Dobijene vrednosti uporedive su sa podacima koje su objavili Chessum i saradnici (2022), koji su ispitivali šumski med sa Novog Zelanda. Najnižu srednju vrednost sadržaja ukupnih minerala u bagremovom medu potvrdili su Pătruică i saradnici (2021), analizirajući deset različitih vrsta meda iz banatske regije u Rumuniji.

**Tabela 6.** Sadržaj ukupnih minerala uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine

Vrsta meda		Ukupni minerali (mg/kg)
Bagremov med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$140 \pm 101^a$
	Min	49,7
	Max	404
Livadski med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$527 \pm 257^b$
	Min	62,6
	Max	1073
Suncokretov med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$309 \pm 77,8^{ab}$
	Min	223
	Max	529
Šumski med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	$1289 \pm 367^c$
	Min	906
	Max	2695

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost  
Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

Podaci u tabeli 7 ilustruju parametre boje ispitivanih uzoraka meda. Srednja vrednost parametra boje  $L^*$  uzoraka bagremovog meda bila je najveća ( $78,5 \pm 5,05$ ), što ukazuje da je ovaj med najsvetliji, dok su livadski, šumski i suncokretov med bili tamniji, sa  $L^*$  od  $75,3 \pm 4,59$ ,  $54,9 \pm 3,32$  i  $49,2 \pm 3,29$ , respektivno. Zeleni ton je bio prisutan u uzorcima bagremovog, livadskog i suncokretovog meda (negativna  $a^*$  vrednost), dominirajući u medu od bagrema.

Crveni ton (pozitivna  $a^*$  vrednost) zabeležen je u šumskom medu. Udeo žutog tona ( $b^*$ ) bio je najniži kod bagremovog meda, a najviši u uzorcima šumskog meda (Tabela 7).

**Tabela 7.** Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine

Vrsta meda		Parametri boje		
		$L^*$	$a^*$	$b^*$
Bagremov med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	78,5 $\pm$ 5,05 <sup>b</sup>	-2,65 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 8,23 <sup>a</sup>
	Min	64,6	-4,61	6,22
	Max	84,5	-0,91	32,0
Livadski med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	75,3 $\pm$ 4,59 <sup>b</sup>	-2,12 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	21,6 $\pm$ 8,82 <sup>ab</sup>
	Min	64,2	-3,60	10,3
	Max	81,6	-1,22	42,6
Suncokretov med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	49,2 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	-2,55 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	30,2 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>
	Min	42,3	-2,95	26,3
	Max	56,1	-1,76	35,2
Šumski med (n = 25)	Srednja vrednost $\pm$ SD	54,9 $\pm$ 3,32 <sup>a</sup>	13,1 $\pm$ 3,50 <sup>b</sup>	46,5 $\pm$ 4,41 <sup>c</sup>
	Min	48,5	9,13	40,9
	Max	62,3	21,1	56,4

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost  
Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2.2. Antioksidativni kapacitet uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja

Antioksidantna aktivnost meda pripisuje se primarno polifenolima (Alves et al., 2013). Poznato je da polifenolna jedinjenja poseduju sposobnost smanjivanja oksidativnih oštećenja delujući kao antioksidansi. Oni mogu direktno da neutrališu slobodne radikale ili da ih uklone nizom reakcija u sprezi sa delovanjem antioksidativnih enzima (Álvarez-Suarez et al., 2012).

Flavonoidi upečatljivo doprinose ukupnoj antioksidativnoj delotvornosti meda, obezbeđujući dobrobitno delovanje u slučaju mnogih bolesti (Alvarez-Suarez et al., 2012), ali je od značaja i antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina prisutnih u medu (Trautvetter et al., 2009).

U tabeli 8 prikazan je sadržaj fenola, flavonoida i karotenoida i antiradikalska aktivnost na DPPH radikale uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine.

Najveći sadržaj ukupnih polifenola detektovan je u uzorcima šumskog meda ( $23,0 \pm 3,87$  mg GAE/100 g), dok je med od bagrema odlikovao najmanji sadržaj ukupnih polifenola ( $16,5 \pm 2,51$  mg GAE/100 g) (Tabela 8). Slične rezultate sadržaja ukupnih polifenola zabeležili su Yayinie i saradnici (2022), koji su odredili sadržaj ukupnih polifenola u rasponu od  $17,0 \pm 3,87$  do  $32,1 \pm 5,91$  mg GAE/100 g u medu iz Etiopije. Rezultati sadržaja ukupnih polifenola uzoraka suncokretovog i livadskog meda u saglasnosti su sa rezultatima Pauliuc i saradnika (2020).

**Tabela 8.** Sadržaj fenola, flavonoida i karotenoida i antiradikalna aktivnost na DPPH radikale uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine

Vrsta meda		Ukupni polifenoli (mg GAE/100 g)	Ukupni flavonoidi (mg CAE/100 g)	Ukupni karotenoidi (mg BCE/kg)	DPPH <sup>*</sup> , IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Bagremov med (n = 25)	Srednja vrednost ± SD	$16,5 \pm 2,51^a$	$4,15 \pm 1,40^a$	$1,67 \pm 0,23^a$	$313 \pm 82,7^b$
	Min	11,1	0,99	1,24	129
	Max	22,4	6,93	2,08	499
Livadski med (n = 25)	Srednja vrednost ± SD	$21,3 \pm 4,36^{ab}$	$6,14 \pm 2,21^a$	$2,78 \pm 0,67^b$	$260 \pm 58,3^{ab}$
	Min	9,87	0,56	1,82	127
	Max	28,9	10,8	4,35	397
Suncokretov med (n = 25)	Srednja vrednost ± SD	$22,1 \pm 1,96^{ab}$	$10,9 \pm 1,20^b$	$3,86 \pm 0,23^c$	$322 \pm 72,3^b$
	Min	17,8	9,25	3,21	202
	Max	25,8	14,0	4,21	629
Šumski med (n = 25)	Srednja vrednost ± SD	$23,0 \pm 3,87^b$	$11,4 \pm 1,67^b$	$2,53 \pm 0,32^b$	$104 \pm 79,8^a$
	Min	10,3	7,99	1,84	50,2
	Max	27,8	15,2	3,63	474

SD – standardna devijacija; Min – minimalna vrednost; Max – maksimalna vrednost  
Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).  
GAE – ekvivalent galne kiseline; CAE – ekvivalent katehina; BCE – ekvivalent β-karotena

Sadržaj ukupnih flavonoida kretao se u rasponu od  $4,15 \pm 1,40$  mg CAE/100 g u bagremovom medu do  $11,4 \pm 1,67$  mg CAE/100 g u šumskom medu (Tabela 8) i bio je niži u odnosu na sadržaje ukupnih polifenola. Anand i saradnici (2018) i Rababah i saradnici (2014) su ustanovili nešto niže sadržaje ukupnih flavonoida u ispitivanim vrstama meda iz Australije

(2,49–5,39 mg CAE/100 g) i Jordana (0,9–4,6 mg CAE/100 g). Šumski med je okarakterisan kao izuzetno bogat u pogledu sadržaja ukupnih flavonoida ( $10,18 \pm 1,04$  mg CAE/100 g), shodno rezultatima studije Selvaraju i saradnika (2019), što je u skladu sa rezultatima prikazanim u tabeli 8.

Sadržaj karotenoida u medu uslovljen je geografskim područjem, kao i faktorima životne sredine i promenama godišnjih doba. Ranije publikovane studije pokazale su da je sadržaj karotenoida u linearnoj korelaciji sa parametrima boje meda (Boussaid et al., 2018). Rezultati sadržaja karotenoida bili su u opsegu od  $1,67 \pm 0,23$  do  $3,86 \pm 0,23$  mg BCE/kg, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Boussaid et al., 2018; Leyva-Daniel et al., 2017).

Antioksidativna aktivnost uzoraka meda procenjena je DPPH testom i značajno se razlikovala među uzorcima (Tabela 8). Antiradikalska aktivnost na DPPH<sup>•</sup>, izražena kao IC<sub>50</sub> vrednost, kretala se u rasponu od  $104 \pm 79,8$  mg/ml (šumski med) do  $322 \pm 72,3$  mg/ml (suncokretov med) (Tabela 8). Iako je poređenje dobijenih rezultata sa podacima drugih autora bilo otežano zbog razlika u načinu izražavanja antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>•</sup> (% inhibicije, IC<sub>50</sub> vrednosti ili neki drugi), Đogo Mračević i saradnici (2020) su ustanovili da je šumski med antioksidativno najpotentniji, a slede ga livadski med < suncokretov med < bagremov med. Rezultati antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>•</sup>, prikazani u tabeli 8, u skladu su sa redosledom pominjanja gorenavedenih autora, osim uzoraka suncokretovog meda, koji su ispoljili najslabiju antiradikalnu aktivnost na DPPH<sup>•</sup> (Tabela 8).

#### **4.1.2.3. Antibakterijska aktivnost uzoraka meda iz Srbije i okolnih zemalja**

Antibakterijska svojstva meda mogu se pripisati individualnom ili sinergijskom delovanju kiselosti i osmolarnosti meda (Bogdanov, 1997; Bose, 1982), kao i prisustvu vodonik peroksida, koji se generiše konverzijom glukoze posredstvom glukoza oksidaze iz meda (Deng et al., 2018). Generisanje vodonik peroksida je dominantan mehanizam kojim med ispoljava bakteriostatsko i baktericidno dejstvo. Količina vodonik peroksida proizvedena u medu značajno korelira sa minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) i minimalnom baktericidnom koncentracijom (MBC). Značajno smanjenje antibakterijske aktivnosti nakon tretmana meda katalazom, koja hidrolizuje vodonik peroksid u vodu i kiseonik, potvrđuje da je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> glavni antibakterijski agens u medu (Brudzynski, 2020).

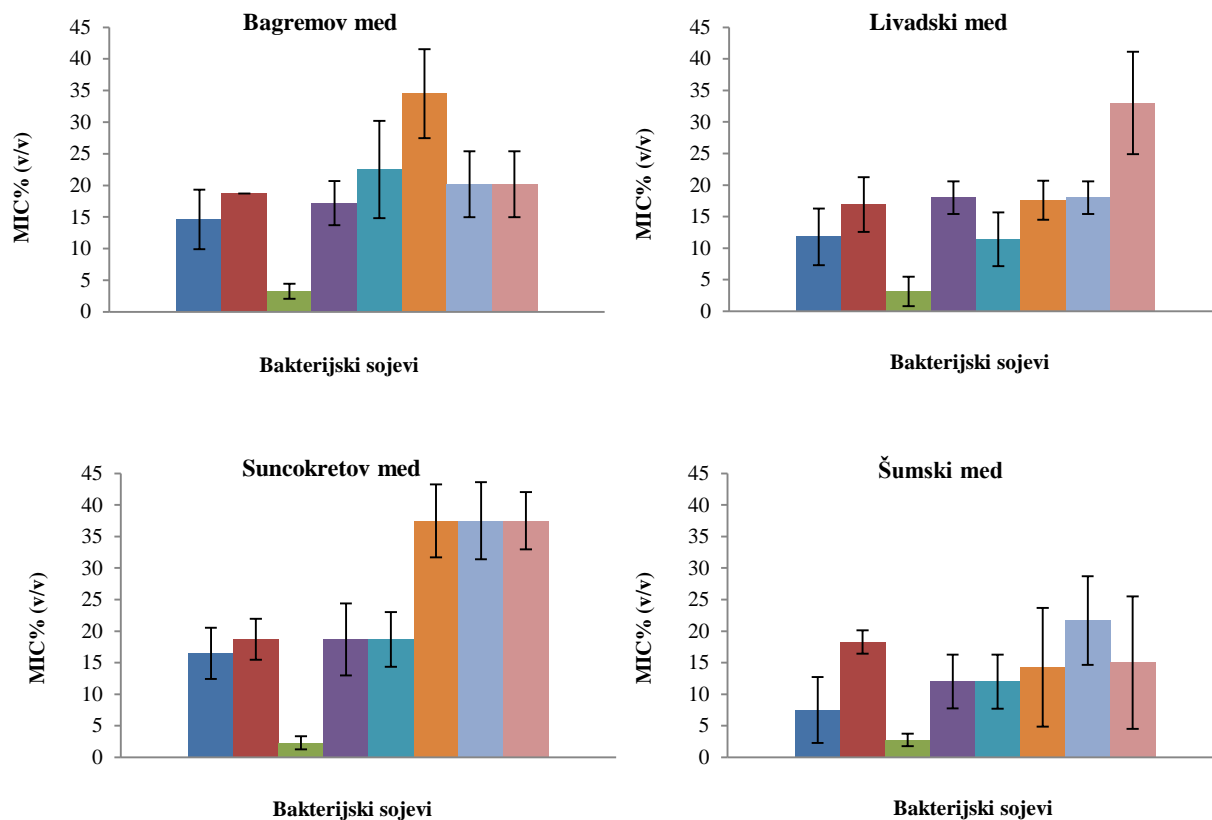
Osmoza se odigrava kao rezultat visoke koncentracije šećera u medu. Visok sadržaj šećera dovodi do dehidratacije bakterijskih ćelija koje ne mogu da opstanu u hipertoničnom rastvoru (Almasaudi, 2021).

Prisustvo polifenola meda doprinosi, takođe, antibakterijskoj aktivnosti meda (Güneş et al., 2017; Leyva-Jimenez et al., 2019). Dokazano je da metil siringat ispoljava antiradikalnu aktivnost na superoksid anjon radikale i tako deluje kao antibakterijski agens u medu (Almasaudi et al., 2017). Takođe, utvrđeno je da i neka druga jedinjenja, poput metilglioksala iz manuka meda, deluju antibakterijski (Szweda, 2017).

Ispitivana je antibakterijska aktivnost uzoraka meda na gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Escherichia coli I* (klinički soj), *Proteus mirabilis I* (klinički soj) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 35554) i gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (klinički soj), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) i *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), a rezultati su izraženi kao vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i prikazani su na slici 21.

Svi uzorci meda ispoljili su antibakterijsku aktivnost na ispitivane bakterijske sojeve. Ispitivani uzorci meda ispoljili su jače inhibitorno dejstvo na gram-pozitivne bakterije, osim u slučaju livadskog meda, koji je ispoljio jako inhibitorno dejstvo protiv *Escherichia coli* (ATCC 11229) ( $11,4 \pm 4,27$  %), što je u skladu sa rezultatima Đogo Mračević i saradnika (2020), koji su došli do zaključka da med iz različitih regiona Srbije poseduje upečatljiv antibakterijski potencijal protiv *Escherichia coli*.

Svi uzorci meda su ispoljili superioran antibakterijski potencijal protiv *Staphylococcus aureus*, dok je najslabija antibakterijska aktivnost ispoljena protiv *Proteus mirabilis* (Slika 21). Ovakvi rezultati su u skladu sa istraživanjem Nemo i Bacha (2021), koji su utvrdili da je *Staphylococcus aureus* najosetljivija bakterijska vrsta u seriji ispitivanih bakterija kada je u pitanju antibakterijsko delovanje meda.



**Slika 21.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine u slučaju testiranih sojeva: ■ *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), ■ *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), ■ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), ■ *Staphylococcus aureus*, ■ *Escherichia coli* (ATCC 11229), ■ *Escherichia coli I*, ■ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 35554) i ■ *Proteus mirabilis I*

#### 4.1.2.4. Korelacije između fizičko-hemijskih parametara, antioksidativnih i antibakterijskih svojstava meda

Procena antioksidativnog potencijala meda izvršena je na osnovu sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i karotenoida, kao i antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>•</sup> (Tabela 8). Pozitivne korelacije su uočene između sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida ( $r = 0,7135$ ;  $p < 0,001$ ), dok su negativne korelacije uočene između sadržaja ukupnih polifenola ili flavonoida i antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>•</sup> ( $r = -0,3187$  i  $r = -0,3863$ , respektivno;  $p < 0,001$ ) (Tabela

P1). Slične korelacije između sadržaja polifenola i flavonoida sa antiradikalnom aktivnošću na DPPH' primećene su, takođe, u slučaju uzoraka meda iz Tunisa (Boussaid et al., 2018), Turske (Gül and Pehlivan, 2018) i Brazila (Nascimento et al., 2018).

Razmatrajući zavisnost između sadržaja ispitivanih terapijski aktivnih jedinjenja za koja se smatra da su potencijalno odgovorna za antibakterijsku aktivnost, izdvojene su sledeće negativne korelacije – sadržaj ukupnih polifenola i supresija gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* ( $r = -0,5278$ ;  $p < 0,001$ ) i *Escherichia coli* I ( $r = -0,3815$ ;  $p < 0,001$ ), sadržaj ukupnih polifenola i supresija gram-pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus* I ( $r = -0,3408$ ;  $p < 0,001$ ), *Bacillus subtilis* ( $r = -0,4367$ ;  $p < 0,001$ ) i *Enterococcus faecalis* ( $r = -0,2113$ ;  $p = 0,035$ ) (Tabela P1). Negativna korelacija između sadržaja fenola i antibakterijske aktivnosti uočena je, takođe, prilikom ispitivanja uzoraka meda iz Maroka (Bouhlali et al., 2016). Štaviše, uočene su statistički značajne korelacije između sadržaja flavonoida i karotenoida i supresije *Pseudomonas aeruginosa* ( $r = -0,3925$  i  $r = -0,617$ , respektivno;  $p < 0,001$ ). Primećeno je, takođe, da je sadržaj karotenoida u negativnoj korelaciji sa supresijom *Proteus mirabilis* I ( $r = -0,5491$ ;  $p < 0,001$ ). Izrazita korelacija uočena je i između antiradikalne aktivnosti na DPPH' i supresije *Escherichia coli* I ( $r = 0,6021$ ;  $p < 0,001$ ) i *Staphylococcus aureus* I ( $r = 0,6156$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela P1).

U cilju pronalazjenja parametara fizičko-hemijskog profila uzoraka meda (Tabela 5) i parametara njihove boje (Tabela 7) koji bi se mogli smatrati svrsishodnim u proceni Moći meda, novodefinisanog svojstva koje oslikava zbirnu antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost, razmatrane su i korelacije između antioksidativne (Tabela 8) i antibakterijske aktivnosti (Slika 21) sa serijom parametara fizičko-hemijskog profila i boje uzoraka meda (Tabela P1).

Statistički značajne korelacije ( $p < 0,001$ ) pronađene su između slobodne kiselosti ispitivanih uzoraka meda i sadržaja ukupnih polifenola ( $r = 0,7068$ ), flavonoida ( $r = 0,7864$ ), antiradikalne aktivnosti na DPPH' ( $r = -0,4752$ ), *Bacillus subtilis* ( $r = -0,4890$ ), *Staphylococcus aureus* ( $r = -0,4979$ ), *Escherichia coli* ( $r = -0,4705$ ) i *Escherichia coli* I ( $r = -0,4119$ ) (Tabela P1). Ustanovljeno je da je ukupan sadržaj polifenola u korelaciji sa koordinatama boje meda  $L^*$  i  $b^*$  ( $r = -0,4534$ ,  $r = 0,4952$ ;  $p < 0,001$ , respektivno), kao što je i sadržaj ukupnih flavonoida u tesnoj vezi sa istim parametrima boje ( $r = 0,8305$ ,  $r = 0,7395$ ;  $p < 0,001$ , respektivno), što je uporedivo sa ranije publikovanih korelacijama ispitivanih uzoraka meda iz Malezije (Kek et al., 2014).



Visoke vrednosti koeficijenta korelacije između antiradikalske aktivnosti na DPPH i parametra boje  $a^*$  ( $r = -0,7153$ ;  $p < 0,001$ ) i  $b^*$  ( $r = -0,5708$ ;  $p < 0,001$ ) u skladu su sa rezultatima ispitivanih uzoraka meda iz Tunisa (Boussaid et al., 2018).

Pored toga, električna provodljivost je uslovljena sadržajem minerala ( $r = 0,6285$ ;  $p < 0,001$ ), koji variraju u zavisnosti od botaničkog porekla (Chakir et al., 2016) i proizvoda disocijacije slobodnih organskih kiselina prisutnih u medu ( $r = 0,6694$ ;  $p < 0,001$ ). Veći sadržaj polifenola podstiče disocijaciju organskih kiselina prisutnih u medu ( $r = 0,7068$ ;  $p < 0,001$ ), što ima za posledicu intenzivnije heliranja metala ( $r = 0,5178$ ;  $p < 0,001$ ) i istovremeni porast antioksidativne aktivnosti polifenolnih jedinjenja.

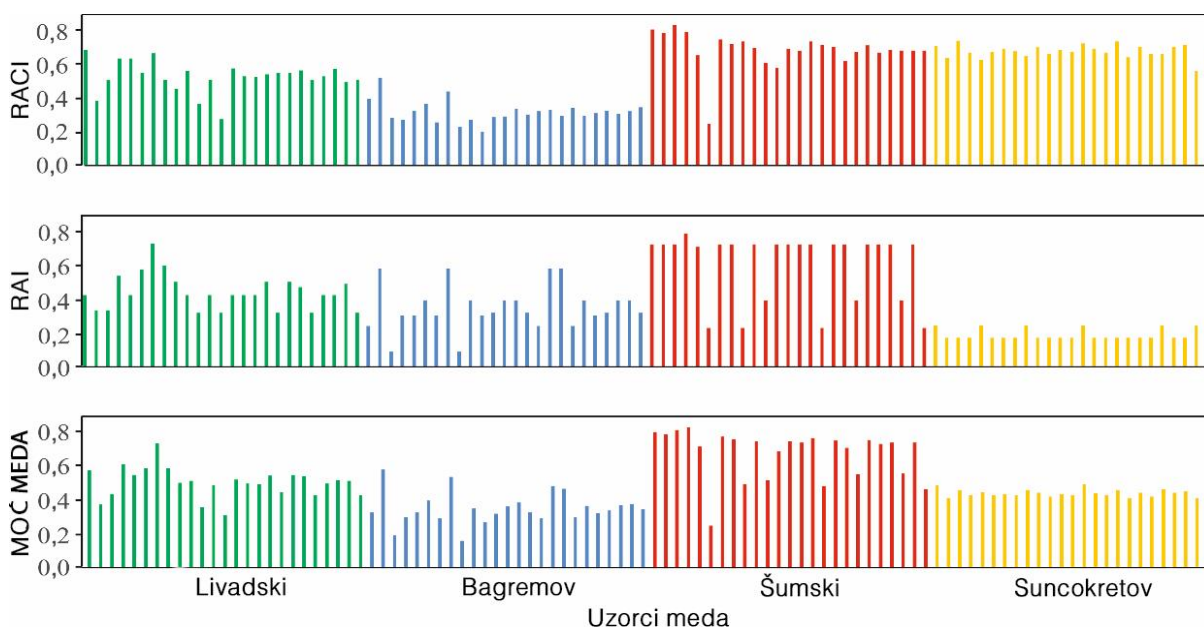
#### 4.1.2.5. Izbor parametara modela veštačke neuronske mreže

Odsustvo statistički značajne korelacije između sadržaja glukoze i fruktoze i parametara antioksidativne aktivnosti eliminisalo je uticaj sadržaja šećera na ovu aktivnost. Međutim, primećena je korelacija između sadržaja glukoze i antibakterijske aktivnosti na *Enterococcus faecalis* ( $r = 0,2235$ ;  $p = 0,025$ ) i *Escherichia coli* I ( $r = 0,2026$ ;  $p = 0,043$ ) i između sadržaja fruktoze i antibakterijske aktivnosti na *Pseudomonas aeruginosa* ( $r = 0,3464$ ;  $p < 0,001$ ). Sadržaj vlage i HMF nije, takođe, ispoljio statistički značajan uticaj na parametre antioksidativne i antibakterijske potentnosti. Ovakav rezultat podržava ranije publikovanu tvrdnju da formiranje HMF ne utiče na promene antioksidativne aktivnosti različitih vrsta meda sakupljenog na teritoriji Poljske, osim u slučaju meda od lipe (Kowalski, 2013).

U cilju pronalaženja fizičko-hemijskih parametara i parametara boje za razvijanje statističkog modela za lako predviđanje antioksidativnih i antibakterijskih svojstava meda, odnosno svojstva nazvanog *Moć meda*, uzeti su u obzir dostupnost instrumenata za analizu uzoraka meda, vreme potrebno za analizu i troškovi analize. Na osnovu navedenog, kao i na osnovu koeficijenta korelacija, za razvijanje ANN modela odabrani su sledeći parametri: slobodna kiselost meda i parametri boje meda  $L^*$  i  $a^*$ .

#### 4.1.2.6. Parametri RACI, RAI i Moć meda

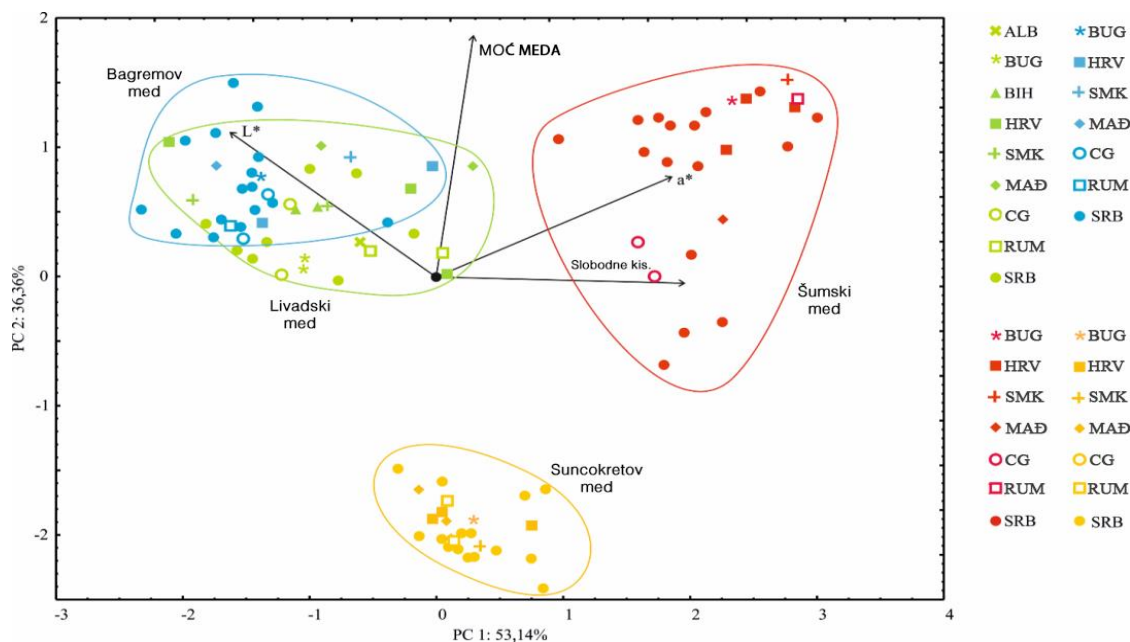
Birajući između različitih vrsta meda, potrošačima je od izuzetnog značaja informacija o zdravstvenom/terapeutskom potencijalu meda. Deo terapeutskih svojstava bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine može se sagledati izračunavanjem parametra *Moć meda*. Razlika u vrednostima RACI, RAI i *Moći meda* može se sagledati na slici 22, sa koje su jasno uočljive razlike u pojedinim botaničkim vrstama meda, uz napomenu da su uzorci šumskog meda bili najpotentniji.



**Slika 22.** Indeks relativnog antioksidativnog kapaciteta (RACI), indeks relativne antibakterijske aktivnosti (RAI) i *Moć meda* uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine

#### 4.1.2.7. Analiza glavnih komponenti (PCA)

Na slici 23 prikazana je PCA analiza uzoraka bagremovog, livadskog, suncokretovog i šumskog meda prikupljenih sa teritorije Srbije i okolnih zemalja tokom 2017. godine.



**Slika 23.** PCA dijagram dobijen na osnovu analize korelacija sadržaja slobodnih kiselina, parametara boje meda  $L^*$ ,  $a^*$  i Moći meda

Analiza glavnih komponenti prezentovanih podataka ukazuje da prve dve komponente čine 89,49% ukupne varijanse (53,14% i 36,36%, respektivno) u prostoru četiri promenljive (slobodne kiseline, parametri boje  $L^*$  i  $a^*$  i Moć meda). Imajući u vidu PCA analizu, slobodne kiseline (koje čine 38,1% od ukupne varijanse) i parametar boje  $a^*$  (33,9%) su ispoljili pozitivan uticaj na prvu glavnu komponentu (PC1). Nasuprot tome, parametar boje  $L^*$  (27,2%) negativno utiče na prvu glavnu komponentu (Slika 23). Pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu (PC2) uočen je za parametar boje  $L^*$  (23,4% od ukupne varijanse) i Moć meda (65,1%).

Najveće vrednosti parametra boje  $a^*$ , slobodne kiselosti i novog parametra Moć meda uočene su za uzorke šumskog meda (Slika 23), dok veće vrednosti parametra boje  $L^*$  karakterišu uzorke bagremovog i livadskog meda.

PCA analiza je rezultirala grupisanjem ispitivanih uzoraka meda u četiri grupe, koje odgovaraju botaničkom poreklu. Uzorci suncokretovog i šumskog meda separisani su u zasebne klustere, dok se uzorci bagremovog i livadskog meda nisu mogli razdvojiti na osnovu ispitivanih fizičko-hemijskih parametara.

#### 4.1.2.8. Model veštačke neuronske mreže (ANN)

Dobijeni optimalni model neuronske mreže pokazao je dobru sposobnost generalizacije za eksperimentalne podatke i mogao bi se koristiti za precizno predviđanje *Moći meda*. Prema performansama ANN, optimalan broj neurona u skrivenom sloju za proračun *Moći meda* bio je 10 (mrežni MLP 3-10-1) za dobijanje visokih vrednosti  $r^2$  (ukupno 0,856) i niskih vrednosti SOS (Tabela 9). Termin *performanse* pokazuje koeficijent determinacije, dok termin *greška* ukazuje na nedostatak podataka za model ANN.

**Tabela 9.** Rezime modela veštačke neuronske mreže (performanse i greške) za cikluse obuke, testiranja i validacije

Mreža	Performanse			Greška			Algoritam za učenje mreže	Funkcija greške	Aktivaciona funkcija za skriveni sloj mreže	Aktivaciona funkcija za izlazni sloj mreže
	Train.	Test	Valid.	Train.	Test	Valid.				
MLP 3-10-1	0,856	0,941	0,857	0,003	0,001	0,003	BFGS 12	SOS	Logistic	Logistic

Train. – ciklus obuke; Test – ciklus testiranja; Valid. – ciklus validacije; SOS – zbir kvadrata

ANN model je prilično dobro predvideo eksperimentalne vrednosti za *Moć meda* za širok opseg vrednosti sadržaja slobodnih kiselina i parametara boje  $L^*$  i  $a^*$ . SOS vrednosti dobijene pomoću ANN modela bile su istog reda veličine eksperimentalnih greški, kao što je prethodno objavljeno u literaturi (Basheer and Hajmeer, 2000). Model ANN je složen (51 težinski koeficijenti–nulti članovi) zbog velike nelinearnosti razvijenog sistema (Chattopadhyay and Rangarajan, 2014). Tabela 10 predstavlja elemente matrice  $W_1$  i vektora  $B_1$  (nulti član), dok su u tabeli 11 prikazani elementi matrice  $W_2$  i vektora  $B_2$  (nulti član) za skriveni sloj koji se koristi za proračun u jednačini 3.

Beznačajno malo odstupanje između eksperimentalnih vrednosti i modela ukazalo je da je model ANN na zadovoljavajući način predvideo *Moć meda*. Visok  $r^2$  ukazao je da je varijacija uzeta u obzir i da se podaci na zadovoljavajući način uklapaju u predloženi model.

**Tabela 10.** Elementi matrice  $W_1$  i vektora  $B_1$  (prikazani u redu “nulti član”)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$L^*$	-5,138	13,50	4,866	21,35	7,121	6,577	2,363	3,858	22,49	6,662
$a^*$	-3,305	8,452	2,709	13,62	4,459	4,378	-0,368	3,155	14,14	4,294
Slobodna kiselost	0,015	-0,248	0,105	-0,531	-0,236	-0,139	-0,312	-0,225	-0,741	-0,243
Nulti član	0,038	-0,032	0,251	-0,054	-0,253	0,176	1,099	-0,564	-0,196	0,045

**Tabela 11.** Elementi matrice  $W_2$  i vektora  $B_2$  (prikazani u koloni “nulti član”)

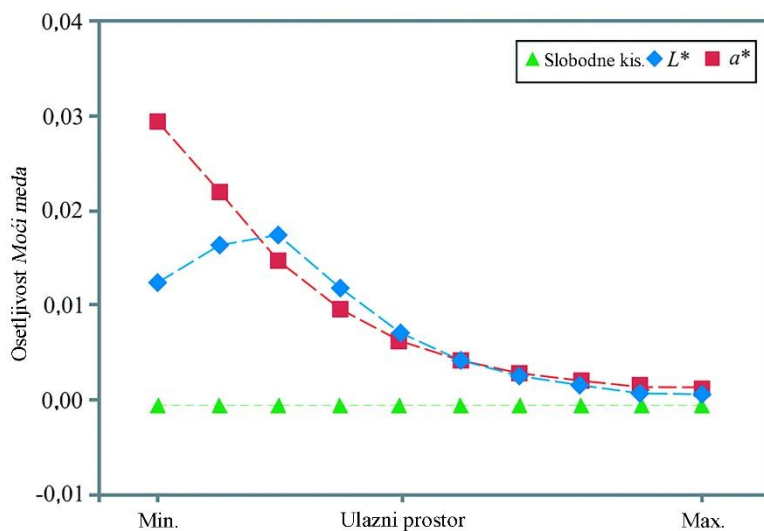
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nulti član
<i>Moć meda</i>	1,716	-12,84	-29,16	-28,48	-15,31	43,34	-3,580	10,28	28,52	12,96	-4,963

#### 4.1.2.9. Analiza osetljivosti

Analiza osetljivosti je korišćena za ispitivanje uticaja ulaznih promenljivih u posmatranim izlazima razvijenog ANN modela (Montaño and Palmer, 2003). Vrednosti osetljivosti su izvodi prvog reda procenjeni na specifičnim centilnim tačkama svake ulazne promenljive. Za svaki ulaz uzet je prvi izvod u odnosu na deset ravnomerno raspoređenih tačaka sa posmatranim minimalnim i maksimalnim vrednostima. Tačne vrednosti su izračunate korišćenjem Tayler-ove formule (Turányi and Tomlin, 2014). Uticaj ulaza na izlazne promenljive, odnosno izračunate promene izlaznih promenljivih za infinitezimalne promene ulaznih promenljivih, kao i važnost ulazne promenljive u datoj tački na ulazu prikazan je na slici 24.

Dobijene vrednosti su odgovarale nivou eksperimentalnih grešaka i pokazale su, takođe, kako vrednosti sadržaja slobodnih kiselina, kao i parametara boje  $L^*$  i  $a^*$  utiču na *Moć meda*.

Kao što se može videti na slici 24, male promene u koordinatama boja  $L^*$  i  $a^*$  pozitivno su uticale na *Moć meda* u čitavom ulaznom prostoru, najintenzivnije na minimumu ( $a^*$ ) i u sredini ( $L^*$ ) ulaznog prostora.



**Slika 24.** Analiza osetljivosti

Dobijeni rezultati ANN modela su pokazali da su uzorci šumskog meda ispoljili najveće vrednosti *Moći meda* (u poređenju sa uzorcima bagremovog, livadskog i suncokretovog meda), što ukazuje da šumski med ima najveći zdravstveni potencijal. Razvijeni ANN model se može primeniti u početnom ispitivanju zdravstvenog potencijala meda korišćenjem jednostavnih analiza.

#### 4.1.3. Kvalitet uzoraka meda sa područja Zapadnog Balkana

Za razliku od 2016. i 2017. godine, tokom kojih su ispitivane najčešće zastupljene vrste meda u Srbiji i regionu, 2018. godine prikupljeno je 19 uzoraka različitih, pretežno specifičnih, vrsta meda (bagrem, lipa, vresak, uljana repica, suncokret, facelija, bosiljak, anis, žalfija, kesten, glog, lavanda i livadski med) sa područja Zapadnog Balkana (Republika Srbija, Bosna i Hercegovina i Severna Makedonija). Uzorci su analizirani u pogledu fizičko-hemijskih parametara, antioksidativnog, antibakterijskog i antiproliferativnog dejstva.

## 4.1.3.1. Fizičko-hemijski pokazatelji uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana

U tabeli 12 prikazani su fizičko-hemijski parametri različitih vrsta meda (bagrem, lipa, vresak, uljana repica, suncokret, facelija, bosiljak, anis, žalfija, kesten, glog, lavanda i livadski med) prikupljenih sa područja Zapadnog Balkana tokom 2018. godine.

**Tabela 12.** Fizičko-hemijski parametri različitih vrsta meda (bagrem, lipa, vresak, uljana repica, suncokret, facelija, bosiljak, anis, žalfija, kesten, glog, lavanda i livadski med) prikupljenih sa područja Zapadnog Balkana tokom 2018. godine

Vrsta meda	Vlaga (%)	pH	Električna provodljivost (mS/cm)	Kiselost (meq/kg)	HMF (mg/kg)
Bagrem 1	17,3 ± 0,10 <sup>c</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>gh</sup>	0,136 ± 0,004 <sup>no</sup>	13,8 ± 0,26 <sup>h</sup>	4,02 ± 0,04 <sup>fg</sup>
Bagrem 2	16,4 ± 0,35 <sup>ef</sup>	4,51 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,114 ± 0,003 <sup>o</sup>	16,3 ± 0,30 <sup>g</sup>	3,23 ± 0,11 <sup>gh</sup>
Lipa 1	15,8 ± 0,06 <sup>hi</sup>	4,62 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,488 ± 0,011 <sup>h</sup>	16,1 ± 0,21 <sup>g</sup>	7,04 ± 0,98 <sup>c</sup>
Lipa 2	17,1 ± 0,23 <sup>cd</sup>	4,72 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,608 ± 0,002 <sup>f</sup>	14,5 ± 0,12 <sup>gh</sup>	5,46 ± 0,21 <sup>d</sup>
Vresak 1	16,7 ± 0,21 <sup>de</sup>	4,32 ± 0,11 <sup>d</sup>	0,834 ± 0,008 <sup>d</sup>	39,2 ± 2,19 <sup>a</sup>	5,41 ± 0,17 <sup>de</sup>
Vresak 2	15,6 ± 0,21 <sup>i</sup>	3,36 ± 0,03 <sup>l</sup>	0,809 ± 0,008 <sup>d</sup>	30,7 ± 1,30 <sup>bc</sup>	3,27 ± 0,06 <sup>gh</sup>
Uljana repica 1	19,4 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,01 ± 0,04 <sup>efg</sup>	0,224 ± 0,004 <sup>l</sup>	21,3 ± 0,68 <sup>f</sup>	2,42 ± 0,09 <sup>hi</sup>
Uljana repica 2	18,4 ± 0,26 <sup>b</sup>	4,10 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,191 ± 0,008 <sup>m</sup>	16,3 ± 0,46 <sup>g</sup>	7,15 ± 1,00 <sup>c</sup>
Suncokret	17,0 ± 0,53 <sup>cd</sup>	3,38 ± 0,22 <sup>kl</sup>	0,366 ± 0,013 <sup>j</sup>	28,9 ± 1,78 <sup>de</sup>	9,41 ± 0,70 <sup>a</sup>
Facelija	15,0 ± 0,21 <sup>j</sup>	3,66 ± 0,06 <sup>i</sup>	0,295 ± 0,005 <sup>k</sup>	37,2 ± 2,00 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,30 <sup>i</sup>
Bosiljak	16,0 ± 0,20 <sup>gh</sup>	3,84 ± 0,03 <sup>h</sup>	0,413 ± 0,007 <sup>i</sup>	27,9 ± 0,35 <sup>de</sup>	3,14 ± 0,13 <sup>gh</sup>
Anis	16,4 ± 0,30 <sup>efg</sup>	4,34 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,879 ± 0,009 <sup>c</sup>	31,2 ± 0,89 <sup>b</sup>	5,58 ± 0,86 <sup>d</sup>
Žalfija	15,1 ± 0,21 <sup>j</sup>	4,07 ± 0,06 <sup>ef</sup>	0,557 ± 0,009 <sup>g</sup>	37,7 ± 1,94 <sup>a</sup>	4,94 ± 0,84 <sup>def</sup>
Kesten	16,5 ± 0,25 <sup>ef</sup>	4,54 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,251 ± 0,042 <sup>a</sup>	27,1 ± 0,26 <sup>e</sup>	4,43 ± 0,42 <sup>ef</sup>
Glog	19,1 ± 0,31 <sup>a</sup>	4,41 ± 0,04 <sup>cd</sup>	0,163 ± 0,012 <sup>mn</sup>	20,3 ± 0,36 <sup>f</sup>	8,25 ± 0,42 <sup>b</sup>
Lavanda	15,8 ± 0,26 <sup>hi</sup>	3,65 ± 0,04 <sup>i</sup>	1,040 ± 0,054 <sup>b</sup>	38,9 ± 1,63 <sup>a</sup>	7,73 ± 1,01 <sup>bc</sup>
Livada 1	14,9 ± 0,15 <sup>j</sup>	3,59 ± 0,09 <sup>ij</sup>	0,353 ± 0,012 <sup>j</sup>	37,8 ± 2,76 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,12 <sup>i</sup>
Livada 2	17,4 ± 0,40 <sup>c</sup>	3,95 ± 0,04 <sup>fgh</sup>	0,715 ± 0,012 <sup>e</sup>	20,1 ± 0,70 <sup>f</sup>	3,41 ± 0,34 <sup>gh</sup>
Livada 3	16,3 ± 0,12 <sup>fg</sup>	3,50 ± 0,15 <sup>jk</sup>	0,470 ± 0,024 <sup>h</sup>	29,5 ± 0,75 <sup>bcd</sup>	1,81 ± 0,58 <sup>i</sup>

Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

Sadržaj vlage ispitivanih uzoraka meda kretao se u rasponu od  $14,9 \pm 0,15$  do  $19,4 \pm 0,15\%$ , pri čemu je najveći sadržaj vlage zabeležen u uzorku meda od uljane repice 1, a najmanji u uzorku livadskog meda 1 (Tabela 12). Svi uzorci meda ispunjavali su kriterijum za sadržaj vlage (maksimalno 20%) koji je definisan Codex Alimentarius-om (2001).

Slobodna kiselost je rezultat prisustva H donora u medu, tj. prisustva organskih kiselina u ravnoteži sa njihovim odgovarajućim laktonima i nekim neorganskim jonima. Fermentacija šećera u organske kiseline dovodi do povećane kiselosti meda. Ovaj parametar je ograničen na 50,0 meq/kg (Codex Alimentarius, 2001), a svi ispitivani uzorci su ispunili ovaj zahtev (Tabela 12).

Vrednosti pH u ispitivanim uzorcima meda bile su između  $3,36 \pm 0,03$  i  $4,72 \pm 0,02$ , što je u skladu sa rezultatima Badolato i saradnika (2017).

Električna provodljivost uzoraka meda kretala se od 0,114 do 1,251 mS/cm (Tabela 12). Bagremov med se odlikovao najnižom provodljivošću ( $0,114 \pm 0,003$  mS/cm), što je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima za bagremov med i druge vrste svetlog meda (Can et al., 2015). Nasuprot tome, tamne vrste meda karakteriše veća provodljivosti (Alqarni et al., 2016), posebno med od kestena ( $1,251 \pm 0,042$  mS/cm) (Tabela 12), čija je provodljivost u korelaciji sa visokim sadržajem minerala (Can et al., 2015; Ghidotti et al., 2021). U oba slučaja (bagremov i kestenov med) električna provodljivost može biti marker botaničkog porekla meda. Svi uzorci su bili u skladu sa zahtevima zakonske regulative (Codex Alimentarius, 2001) osim uzoraka meda od vreska i kestena, za koje je poznato da imaju vrednosti električne provodljivosti iznad 0,8 mS/cm (Alves et al., 2013) i stoga predstavljaju izuzetke u regulativi o medu (Codex Alimentarius, 2001). Rezultati provodljivosti su u skladu sa ranije objavljenim rezultatima ispitivanja različitih vrsta meda iz Srbije (Đogo Mračević et al., 2020; Lazarević et al., 2012).

HMF je marker svežine meda. Ovaj proizvod Maillard-ove reakcije je prihvatljiv pri vrednostima ispod 40 mg/kg za med koji potiče iz netropskih regiona (Codex Alimentarius, 2001). Sadržaj HMF u ispitivanim uzorcima kretao se od  $1,81 \pm 0,58$  mg/kg (livadski med 3) do  $9,41 \pm 0,70$  mg/kg (suncokretov med) (Tabela 12). Poznato je da je količina od 10 mg/kg HMF prirodno prisutna u medu (Alqarni et al., 2016), pa se, stoga, ispitivani uzorci meda mogu okarakterisati kao sveži.



#### 4.1.3.2. Sadržaj ukupnih fenola i antioksidantni potencijal uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana

Dominantni antioksidansi prisutni u medu su polifenoli (Alves et al., 2013), koji, pored antioksidativnog delovanja, ispoljavaju i baktericidno, antiinflamatorno, antialergijsko, antikoagulantno i antikancerogeno dejstvo (Cornara et al., 2017).

**Tabela 13.** Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidantni potencijal različitih vrsta meda (bagrem, lipa, vresak, uljana repica, suncokret, facelija, bosiljak, anis, žalfija, kesten, glog, lavanda i livadski med) prikupljenih sa područja Zapadnog Balkana tokom 2018. godine

Vrsta meda	Sadržaj ukupnih polifenola (mg GAE/100 g)	DPPH <sup>·</sup> , IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Bagrem 1	14,4 ± 0,49 <sup>kl</sup>	442 ± 19,3 <sup>b</sup>
Bagrem 2	13,5 ± 0,35 <sup>lm</sup>	388 ± 10,1 <sup>d</sup>
Lipa 1	67,3 ± 2,57 <sup>f</sup>	115 ± 9,00 <sup>l</sup>
Lipa 2	53,7 ± 3,37 <sup>g</sup>	223 ± 12,3 <sup>g</sup>
Vresak 1	79,3 ± 1,01 <sup>e</sup>	137 ± 7,55 <sup>k</sup>
Vresak 2	84,0 ± 3,83 <sup>g</sup>	156 ± 10,3 <sup>j</sup>
Uljana repica 1	11,5 ± 0,70 <sup>m</sup>	646 ± 8,72 <sup>a</sup>
Uljana repica 2	11,9 ± 0,25 <sup>lm</sup>	640 ± 22,5 <sup>a</sup>
Suncokret	27,5 ± 0,50 <sup>i</sup>	324 ± 5,51 <sup>e</sup>
Facelija	89,7 ± 0,99 <sup>c</sup>	175 ± 4,36 <sup>hi</sup>
Bosiljak	101 ± 2,72 <sup>a</sup>	162 ± 5,29 <sup>ij</sup>
Anis	98,7 ± 0,90 <sup>a</sup>	186 ± 4,04 <sup>b</sup>
Žalfija	90,1 ± 1,76 <sup>c</sup>	184 ± 9,29 <sup>b</sup>
Kesten	88,8 ± 1,55 <sup>c</sup>	193 ± 11,0 <sup>b</sup>
Glog	36,7 ± 1,34 <sup>h</sup>	415 ± 14,0 <sup>c</sup>
Lavanda	95,6 ± 1,06 <sup>b</sup>	88,2 ± 2,11 <sup>m</sup>
Livada 1	24,5 ± 1,01 <sup>j</sup>	266 ± 6,03 <sup>f</sup>
Livada 2	26,5 ± 0,76 <sup>ij</sup>	224 ± 6,11 <sup>g</sup>
Livada 3	16,8 ± 0,50 <sup>k</sup>	428 ± 14,2 <sup>bc</sup>

Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim superskriptom su statistički različite ( $p \leq 0,05$ ).

Razlike u sadržaju ukupnih polifenola između ispitivanih uzoraka meda bile su statistički značajne ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 13) i proizilaze su iz razlika u botaničkom i geografskom poreklu meda (da Silva et al., 2016).

Najveći sadržaj ukupnih polifenola utvrđen je u uzorku meda od bosiljka ( $101 \pm 2,72$  mg GAE/100 g), dok je najmanji sadržaj određen u uzorku meda od uljane repice 1 ( $11,5 \pm 0,70$  mg GAE/100 g) (Tabela 13). Slični nivoi sadržaja ukupnih polifenola su dokumentovani u radu Liu i saradnika (2013), koji su odredili sadržaj ukupnih polifenola u medu u rasponu od  $0,307 \pm 0,01$  do  $0,822 \pm 0,03$  mg GAE/g i u publikaciji Can i saradnika (2015), u kojoj se sadržaj ukupnih polifenola kretao između 16,02 i 120,04 mg GAE/100 g. Uzorci bagremovog meda 1 i 2, koji pripadaju svetlim vrstama meda, bili su siromašni polifenolima, kako je i navedeno u radu Marića i saradnika (2021) za bagremov med iz regiona Srbije. U kategoriji tamnih vrsta meda uzorci meda od vreska 1 i 2 odlikovali su se visokim sadržajima TPC ( $79,3 \pm 1,01$  mg GAE/100 g i  $84,0 \pm 3,83$  mg GAE/100 g, respektivno), što je u skladu sa rezultatima Alves i saradnika (2013) i Can i saradnika (2015) za med od vreska. Med od anisa karakteriše visok sadržaj TPC ( $98,7 \pm 0,90$  mg GAE/100 g) i ovaj rezultat je uporediv sa rezultatima Gül i Pehlivana (2018) ( $113,2 \pm 0,46$  mg GAE/100 g). Uzorci meda od facelije i žalfije bogati su, takođe, polifenolima (Tabela 13). Med od kestena je imao nešto niži sadržaj polifenola ( $88,8 \pm 1,55$  mg GAE/100 g) (Tabela 13) u poređenju sa rezultatom Can i saradnika (2015) ( $98,26 \pm 17,77$  mg GAE/100 g) i Kaygusuz i saradnika (2016) (52,4–105,0 mg GAE/100 g) za med od kestena iz Turske, ali je, uprkos nižem sadržaju, klasifikovan kao med bogat polifenolima, kao što je i navedeno u radu Can i saradnika (2015). Med od lavande sa lokaliteta na Fruškoj gori bio je bogatiji u ukupnim polifenolima ( $95,6 \pm 1,06$  mg GAE/100 g) u odnosu na istu vrstu meda koju su ispitivali Can i saradnici (2015) ( $53,39 \pm 23,34$  mg GAE/100 g). Uzorci meda od uljane repice 1 i 2 predstavljaju vrstu meda siromašnu polifenolima. TPC u medu od uljane repice iz Poljske bio je nešto viši ( $18,3 \pm 3,61$  mg GAE/100 g) (Kuś et al., 2014). Iako su Piljac-Žegarac i saradnici (2009) ustanovili da je polifloralni med iz Hrvatske odlikovala najveća srednja vrednost sadržaja TP ( $58,75$  mg GAE/100 g) od ukupno dvadeset šest uzoraka meda različitog floralnog porekla (11 monofloralnih, 7 polifloralnih i 8 specijalnih), uzorke livadskog meda 1–3 karakterisao je znatno niži sadržaj ukupnih polifenola ( $16,8 \pm 0,50$  do  $26,5 \pm 0,76$  mg GAE/100 g), kako je već ranije utvrđeno u radu Marića i saradnika (2021). Rezultati Alves i

saradnika (2013) potvrđuju, takođe, da polifloralne vrste meda svetle boje imaju nizak sadržaj ukupnih polifenola.

Antioksidativna aktivnost uzoraka meda procenjena je DPPH testom i značajno se razlikovala među uzorcima (Tabela 13). Antiradikalska aktivnost na DPPH<sup>·</sup>, izražena kao IC<sub>50</sub> vrednost, kretala se u rasponu od 88,2 ± 2,11 mg/ml (med od lavande) do 646 ± 8,72 mg/ml (uzorak meda od uljane repice 1) (Tabela 13). Uzorak meda od lipe 1 (geografsko poreklo Fruška gora) pokazao je izrazitu antiradikalsku potentnost (IC<sub>50</sub> = 115 ± 9,00 mg/ml), kao i uzorak meda od vreska 1 (IC<sub>50</sub> = 137 ± 7,55 mg/ml), dok su uzorci bagremovog meda ispoljili nisku antioksidativnu aktivnost (IC<sub>50</sub> oko 400 mg/ml). Najslabija antioksidativna aktivnost zabeležena je u slučaju meda od uljane repice (IC<sub>50</sub> oko 640 mg/ml). Iako je poređenje dobijenih rezultata sa podacima drugih autora otežano zbog razlika u ekspresiji antioksidativne aktivnosti na DPPH<sup>·</sup> (% inhibicije, IC<sub>50</sub> vrednosti ili neko drugo), rezultati antioksidativnog potencijala uzoraka meda od vreska su slični rezultatima koji su publikovali Kuš i saradnici (2014), koji su ranije ukazali na visoku antioksidativnu aktivnost meda od vreska. Nasuprot toga, bagremov med je odlikovala niska antiradikalska aktivnost na DPPH<sup>·</sup> (Tabela 13), o kojoj, takođe, svedoče i Gül i Pehlivan (2018). Wilczyńska (2014) je ustanovila da je bagremov med najmanje potentan med u smislu antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>·</sup>, a slede ga zlatica < uljana repica < limeta < nektar-medljika < polifloralni < heljda < medljika < facelija < vresak. Rezultati antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>·</sup> prikazani u tabeli 13 u skladu su sa redosledom koji navodi Wilczyńska (2014), osim uzoraka meda od uljane repice 1 i 2, koji su bili najniži u pogledu antiradikalske aktivnosti na DPPH<sup>·</sup>.

Rezultati antioksidativne aktivnosti meda su u korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola u uzorcima meda ( $r = -0,816$ ), što potvrđuje da je antioksidativna aktivnost meda prvenstveno posledica prisustva polifenola, što su navodila i ranija istraživanja (Gül and Pehlivan, 2018; Kuš et al., 2014).

#### **4.1.3.3. Antibakterijska aktivnost uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana**

Antibakterijska svojstva meda mogu se pripisati individualnim ili sinergijskim efektima kiselosti meda, osmolarnosti, prisustvu enzimatski generisanog vodonik peroksida i prisustvu

polifenola (Güneş et al., 2017; Leyva-Jimenez et al., 2019) ili nekih drugih jedinjenja (na primer, metilglioksala u medu od manuke) (Szweda, 2017).

Ispitivana je antibakterijska aktivnost uzoraka meda na gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli* I (klinički soj) i *Proteus mirabilis* (klinički soj) i gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermitrain* i *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), a rezultati su izraženi kao vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i prikazani su u tabeli 14.

**Tabela 14.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, %) različitih vrsta meda (bagrem, lipa, vresak, uljana repica, suncokret, facelija, bosiljak, anis, žalfija, kesten, glog, lavanda i livadski med) prikupljenih sa područja Zapadnog Balkana tokom 2018. godine u odnosu na testirane sojeve *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus faecalis* (ATCC 25923)

Vrsta meda	MIC % u odnosu na različite sojeve bakterija					
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)
Bagrem 1	25	25	25	25	12,5	> 25
Bagrem 2	25	25	25	12,5	25	> 25
Lipa 1	25	25	12,5	3,12	6,25	25
Lipa 2	25	25	12,5	12,5	12,5	25
Vresjak 1	25	25	12,5	6,25	12,5	25
Vresjak 2	25	25	25	12,5	12,5	25
Uljana repica 1	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
Uljana repica 2	> 25	> 25	25	25	25	> 25
Suncokret	25	25	12,5	12,5	12,5	25
Facelija	12,5	25	12,5	6,25	3,12	25
Bosiljak	25	25	12,5	12,5	12,5	25
Anis	25	25	12,5	6,25	12,5	25
Žalfija	25	25	25	12,5	12,5	25
Kesten	25	25	25	12,5	12,5	25
Glog	>25	>25	25	25	25	25
Lavanda	25	25	25	12,5	12,5	25
Livada 1	25	25	25	12,5	12,5	25
Livada 2	25	25	12,5	6,25	6,25	25
Livada 3	25	25	25	12,5	12,5	25

Određivanje MIC je izvršeno u tri ponavljanja.

Navedeni bakterijski sojevi su odabrani za ispitivanje antibakterijske aktivnosti s obzirom da se upravo oni smatraju najčešćim uzročnicima ozbiljnih bakterijskih infekcija kod ljudi (Szweda, 2017). Svi uzorci meda su ispoljili antibakterijsku aktivnost na ispitivane bakterijske sojeve shodno sledećem nizu rezistentnosti: *Escherichia coli* > *Escherichia coli* ATCC 8739 > *Enterococcus Faecalis* > *Proteus mirabilis* > *Staphilococcus aureus* > *Staphilococcus epidermidis* (Tabela 14).

Ispitivani uzorci meda ispoljili su jače inhibitorno dejstvo na gram-pozitivne bakterije. Isti efekat meda su prethodno registrovali Farkasovska i saradnici (2019) i Szweda (2017). Razlika u osetljivosti gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija na antibakterijsku aktivnost meda proizilazi iz razlike u sastavu njihovih ćelijskih zidova. U poređenju sa gram-negativnim bakterijama, gram-pozitivne bakterije nemaju spoljašnju membranu za zaštitu peptidoglikanskog sloja, što olakšava prodiranje antimikrobnih agenasa i izazivanje oštećenja (Matzen et al., 2018).

Najjaču antibakterijsku aktivnost ispoljili su uzorak lipovog meda 1 (sa Fruške gore) i uzorci meda od facelije 1 i 2. Prosečne vrednosti MIC od 3,12% i 6,25% protiv gram-pozitivnih bakterija *Staphilococcus aureus* i *Staphilococcus epidermidis* utvrđene su za lipov med, dok su uzorci meda od facelije imali MIC vrednosti od 6,25% i 3,12% protiv *Staphilococcus aureus* i *Staphilococcus epidermidis*, respektivno (Tabela 14). Junie i saradnici (2016) su, takođe, ispitivali antimikrobnu aktivnost 10 različitih uzoraka meda i ukazali da su najosetljivije bakterije na delovanje meda *Staphilococcus aureus* i *Staphilococcus epidermidis*. Nemo i Bacha (2021) navode da je *Staphilococcus aureus* najosetljivija bakterijska vrsta u seriji ispitivanih bakterija kada je u pitanju antibakterijsko delovanje meda. Suprotno navedenim rezultatima, Đogo Mračević i saradnici (2020) su u istraživanjima došli do zaključka da med iz različitih regiona Srbije poseduje superiorni antibakterijski potencijal protiv *Escherichia coli* u poređenju sa *Staphilococcus aureus*. Razlog za postojanje ovakvih razlika može se pripisati raznolikosti u botaničkom i geografskom poreklu raznih vrsta meda. Antibakterijski potencijal lipovog meda mogao bi se povezati sa metil siringatom, za koji je utvrđeno da je najzastupljenija komponenta u lipovom medu (Qiao et al., 2020), a poznato je da deluje kao antibakterijski agens ispoljavajući antiradikalnu aktivnost na superoksid anjon radikale (Almasaudi et al., 2017). Ranije je utvrđeno da med od facelije ispoljava najjaču antibakterijsku aktivnost na *Staphilococcus aureus* među ispitivanim vrstama meda, sa prosečnom vrednošću MIC od 13,9%, dok su bagremov i med od uljane repice pokazali slabije delovanje (Bucekova et al., 2019).

#### 4.1.3.4. Antiproliferativna aktivnost uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana

Antiproliferativna aktivnost ispitivana je u širokom koncentracijskom opsegu uzoraka meda (0,15–50 mg/ml). Najaktivniji uzorci bili su uzorak lipovog meda 1 ( $IC_{50}^{MCF7} = 7,46 \pm 1,18$  mg/ml i  $IC_{50}^{HeLa} = 12,4 \pm 2,00$  mg/ml) i uzorak livadskog meda 2 ( $IC_{50}^{MCF7} = 12,0 \pm 0,57$  mg/ml,  $IC_{50}^{HeLa} = 16,9 \pm 1,54$  mg/ml i  $IC_{50}^{HT-29} = 23,7 \pm 1,33$  mg/ml) prema ćelijskim linijama humanog adenokarcinoma dojke (MCF7), grlića materice (HeLa) i debelog creva (HT-29) (Tabela 15). Antiproliferativno najpotentniji uzorci, uzorak lipovog meda 1 i uzorak livadskog meda 2, uticali su, takođe, na rast MRC-5 ćelija fibroblasta pluća sa vrednostima  $IC_{50}^{MRC-5} = 9,93 \pm 0,68$  mg/ml i  $IC_{50}^{MRC-5} = 12,9 \pm 0,34$  mg/ml, respektivno. Ćelijska linija HT-29 je bila najmanje osetljiva na ispitivane uzorke meda. Standard glukoze je ispoljio niži i ujednačen efekat na rast ispitivanih ćelijskih linija sa vrednostima  $IC_{50}$  u rasponu 33–40 mg/ml, što ukazuje da su aktivne komponente u uzorcima meda primarno obezbedile antiproliferativnu aktivnost, pre nego šećer.

#### 4.1.3.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) uzoraka meda sa teritorije Zapadnog Balkana

Analiza glavnih komponenti (PCA) je jasno odvojila (74,20%) uzorke sa visokom antiproliferativnom aktivnošću (treći kvadrant) od onih sa niskom antiproliferativnom i niskom antioksidativnom aktivnošću (oba uzorka bagremovog meda i meda od uljane repice, med od gloga i livadski med uzorak 3) (Slika 25).

Zanimljivo je da su uzorci sa visokom antiproliferativnom aktivnošću imali umerenu antioksidativnu aktivnost sa srednjim vrednostima sadržaja ukupnih polifenola. Slični rezultati, koji ukazuju da antioksidativna aktivnost nije uvek u korelaciji sa antiproliferativnom aktivnošću, navedeni su i u prethodnim studijama (Boumendjel et al., 2008; Gorinstein et al., 2009).

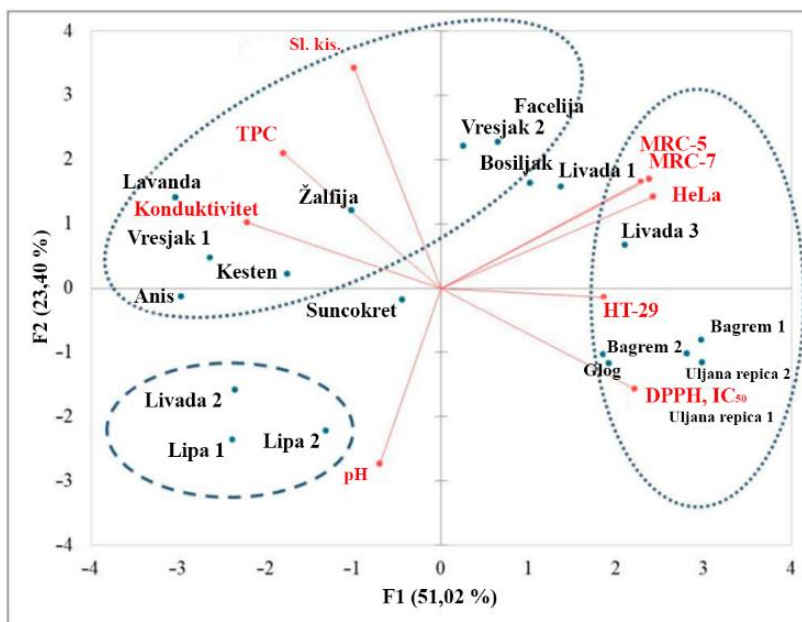
Antiproliferativnu aktivnost meda ispoljenu na različite ćelijske linije tumora identifikovali su i Jaganathan i Mandalin (2009). Uprkos tvrdnji da polifenoli imaju jednu od ključnih uloga u suzbijanju rasta ćelija tumora (Četojević-Simin, 2015), rezultati ispitivanja uzoraka meda prikupljenih tokom 2018. godine ukazali su da drugi mehanizmi/jedinjenja doprinose ovoj pojavi. Lipov med je odlikovala najveća aktivnost prema istraživanim ćelijskim linijama tumora

(Tabela 15), iako je njegov sadržaj TP bio mnogo niži u poređenju sa medom od bosiljka (Tabela 14), čija aktivnost u suzbijanju rasta tumorskih ćelija nije utvrđena (Tabela 15). Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da različiti polifenoli ne doprinose podjednako aktivnosti rasta tumorskih ćelija. Neke fenolne kiseline, kao što su elaginska ili galna kiselina, i flavonoid kempferol imaju izuzetnu antiproliferativnu aktivnost ( $IC_{50} = 2$  mg/ml), dok je aktivnost ferulne i siringične kiseline i flavonoida rutina slaba (Četojević-Simin, 2015).

**Tabela 15.** Efekti uzoraka meda na rast odabranih ljudskih ćelijskih linija

Vrsta	$IC_{50}$ (mg/ml)*			
	HeLa	MCF7	HT-29	MRC-5
Bagrem 1	> 50 <sup>g</sup>	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>e</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Bagrem 2	> 50 <sup>g</sup>	> 50 <sup>f</sup>	30,4 ± 5,95 <sup>b</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Lipa 1	12,4 ± 2,00 <sup>a</sup>	7,46 ± 1,18 <sup>a</sup>	43,3 ± 3,68 <sup>d</sup>	9,93 ± 0,68 <sup>a</sup>
Lipa 2	25,9 ± 1,68 <sup>d</sup>	17,2 ± 5,24 <sup>c</sup>	41,5 ± 2,36 <sup>d</sup>	19,8 ± 1,38 <sup>b</sup>
Vresjak 1	24,0 ± 1,54 <sup>d</sup>	18,5 ± 0,52 <sup>c</sup>	30,0 ± 2,49 <sup>b</sup>	25,2 ± 0,41 <sup>c</sup>
Vresjak 2	> 50 <sup>g</sup>	40,4 ± 8,75 <sup>e</sup>	42,9 ± 1,36 <sup>d</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Uljana repica 1	> 50 <sup>g</sup>	35,8 ± 10,1 <sup>e</sup>	> 50 <sup>e</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Uljana repica 2	> 50 <sup>g</sup>	> 50 <sup>f</sup>	42,3 ± 3,58 <sup>d</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Suncokret	24,8 ± 0,28 <sup>d</sup>	27,7 ± 1,95 <sup>d</sup>	35,6 ± 2,68 <sup>c</sup>	20,7 ± 2,56 <sup>b</sup>
Facelija	> 50 <sup>g</sup>	> 50 <sup>f</sup>	36,7 ± 2,16 <sup>c</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Bosiljak	> 50 <sup>g</sup>	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>e</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Anis	21,0 ± 0,56 <sup>c</sup>	14,7 ± 2,42 <sup>b</sup>	28,4 ± 6,64 <sup>b</sup>	21,9 ± 2,58 <sup>b</sup>
Žalfija	35,2 ± 7,50 <sup>e</sup>	26,7 ± 0,20 <sup>d</sup>	34,3 ± 0,82 <sup>c</sup>	45,0 ± 2,31 <sup>e</sup>
Kesten	40,3 ± 1,71 <sup>f</sup>	25,6 ± 0,27 <sup>d</sup>	37,2 ± 0,86 <sup>c</sup>	34,8 ± 0,89 <sup>d</sup>
Glog	> 50 <sup>g</sup>	35,1 ± 11,7 <sup>e</sup>	49,0 ± 0,06 <sup>e</sup>	44,7 ± 2,28 <sup>e</sup>
Lavanda	20,8 ± 2,66 <sup>c</sup>	24,5 ± 2,52 <sup>d</sup>	32,0 ± 4,93 <sup>b</sup>	17,3 ± 0,53 <sup>b</sup>
Livada 1	> 50 <sup>g</sup>	49,0 ± 0,71 <sup>f</sup>	37,4 ± 1,30 <sup>c</sup>	> 50 <sup>f</sup>
Livada 2	16,9 ± 1,54 <sup>b</sup>	12,0 ± 0,57 <sup>b</sup>	23,7 ± 1,33 <sup>a</sup>	12,9 ± 0,34 <sup>a</sup>
Livada 3	> 50 <sup>g</sup>	> 50 <sup>f</sup>	> 50 <sup>e</sup>	40,3 ± 8,93 <sup>e</sup>
Standard glukoze	40,0 ± 3,02 <sup>f</sup>	33,2 ± 5,57 <sup>e</sup>	34,5 ± 0,44 <sup>c</sup>	39,8 ± 1,07 <sup>e</sup>

\*Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± SD od četiri (n = 4; ispitni uzorci i standard) ili osam (n = 8, kontrola) merenja dobijena u opsegu koncentracija 0,15–50 mg/ml. Srednje vrednosti unutar svake kolone sa različitim slovima značajno se razlikuju ( $p \leq 0,05$ ). HeLa – HeLa ćelijska linija humanog karcinoma grlića materice; MCF7 – MCF7 ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke; HT-29 – HT-29 ćelijska linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma; MRC-5 – MRC-5 ćelijska linija fibroblasta pluća



**Slika 25.** Analiza glavnih komponenti (PCA) fizičko-hemijskih parametara, antioksidativnih i antiproliferativnih aktivnosti na osnovu korelacija komponenti za uzorke meda prikupljene sa teritorije Zapadnog Balkana tokom 2018. godine

Takođe, kestenov med je pokazao slabu aktivnost u slučaju ćelija tumora dojke bez uticaja na druge ispitivane linije (Tabela 15), iako je njegov sadržaj polifenola bio relativno visok (Tabela 14). Nasuprot tome, med od kestena iz Anadolije je okarakterisan kao moćan izvor fenolnih jedinjenja, čiji je sadržaj u korelaciji sa njegovim citotoksičnom dejstvom prema ćelijama tumora dojke (Seyhan et al., 2017). Iz tog razloga, neophodno je sprovesti detaljnije ispitivanje polifenolnog profila različitih vrsta meda i njihove antiproliferativne aktivnosti kako bi se ustanovio njihov nivo korelacije.



## 4.2. Ekstrakcija HMF iz meda primenom jonskih tečnosti

Sagledavanje kvaliteta uzoraka meda sakupljenih u regionu Republike Srbije, sa područja Zapadnog Balkana i iz nekih susednih zemalja sprovedeno je tokom tri uzastopne godine (2016–2018) praćenjem fizičko-hemijskih pokazatelja kvaliteta, kao i nekih terapijskih svojstava meda (antioksidativna, antibakterijska i antiproliferativna aktivnost) dovelo je do saznanja da je relativno upečatljiv udeo uzoraka meda karakterisao sadržaj HMF iznad maksimalno propisanog (Codex Alimentarius, 2001). Stoga se javila ideja o potrebi da se primenom netoksičnih ekstrakcionih tehnika izoluje HMF i dobije med koji bi zadovoljavao zahteve zakonske regulative. Podaci o potencijalnoj toksičnosti HMF, odnosno činjenica da se HMF može konvertovati u citotoksičan i mutageni 5-sulfoksimetilfurfural (Capuano and Fogliano, 2011), dodatno su podstakli razmišljanja na ovu temu.

Do sada su najčešće korišćene metode ekstrakcije HMF iz hrane, pa i iz meda, uglavnom zasnovane na primeni čvrsto-tečne ekstrakcije. Driffield i saradnici (2005) koristili su ekstrakciju na čvrstoj fazi za izolovanje HMF iz meda korišćenjem toksičnih rastvarača. Gürkan i Altunay (2015) razvili su metodu predkoncentrovanja i odvajanja HMF primenom ultrazvučne ekstrakcije pomoću micela. U svrhu ekstrakcije HMF korišćene su i tečno-tečna ekstrakcija uz pomoć isoljavanja (Chen et al., 2019) i disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija (Madani-Tonekaboni et al., 2015), koja, takođe, koristi toksične i isparljive aromatične ili hlorovane organske rastvarače.

Dosadašnja istraživanja bazirana na korišćenju zelenih rastvarača, pre svega jonskih tečnosti, fokusirana su isključivo za konverziju biomaterijala (fruktoza, celuloza, saharoza) u HMF, prekursor za sintezu širokog spektra hemikalija i biogoriva (Chinnappan et al., 2016; Jadhav et al., 2012; Ramli and Amin, 2020).

Činjenica da do danas ne postoje literaturni zapisi o ekstrakciji HMF iz meda primenom jonskih tečnosti stvorila je prostor da se ispita 1) uticaj biodegradabilnih holinskih jonskih tečnosti na formiranje dvofaznih vodenih sistema i 2) primena ovih sistema za ekstrakciju HMF iz meda. Ispitan je uticaj anjona sintetisanih holinskih jonskih tečnosti na građenje dvofaznih sistema, kod kojih je kao sredstvo za isoljavanje korišćena so  $K_3PO_4$ . Potom, ispitana je ekstrakcija HMF u ovim sistemima, a primenom računarskih simulacija objašnjeni su mehanizmi ekstrakcije HMF primenom jonskih tečnosti.

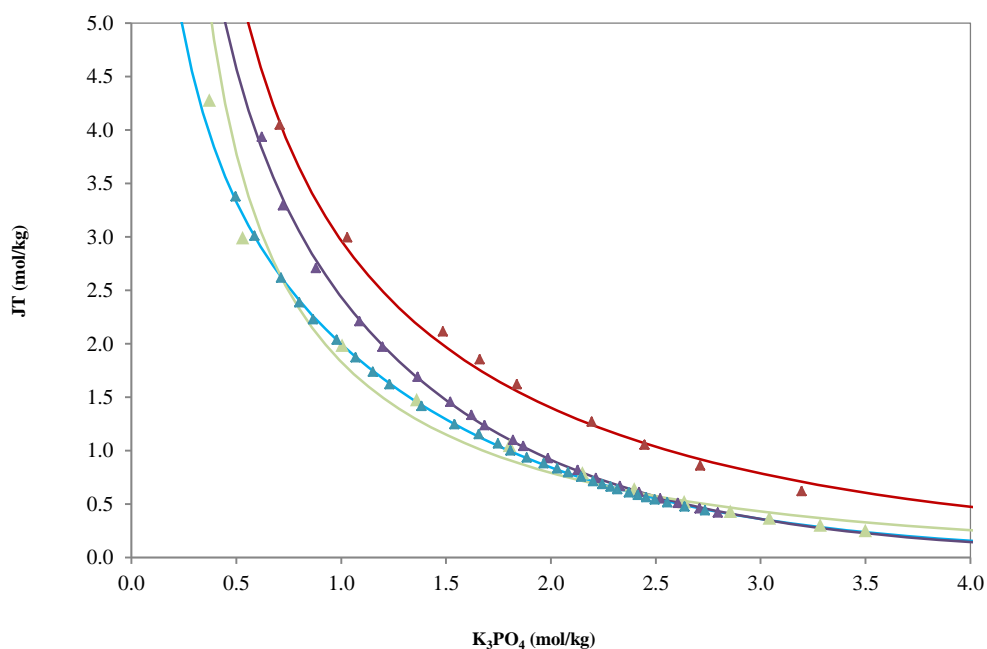
#### 4.2.1. Određivanje tečno-tečne ravnoteže dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti sa različitim anjonima

U cilju ispitivanja uticaja anjonskog dela biodegradabilnih jonskih tečnosti na građenje dvofaznih vodenih sistema korišćene su sledeće jonske tečnosti – holin hlorid ([Ch][Cl]), holin nikotinat ([Ch][Nic]), holin propanoat ([Ch][Prop]) i holin butirat ([Ch][But]). U tabeli 16 prikazane su hemijske strukture tri sintetisane jonske tečnosti, kao i komercijalno dostupnog [Ch][Cl] ( $\omega \geq 98\%$ ). Hemijske strukture sintetisanih jonskih tečnosti potvrđene su primenom infracrvene spektroskopije (IR), a korespondirajući spektri su prikazani u prilogu (Slika P1a-c). Ravnotežni dijagrami za trokomponentne sisteme (jonska tečnost + neorganska so + voda) dobijeni su primenom metode titracije do tačke zamućenja na sobnoj temperaturi ( $23 \pm 1$  °C) i atmosferskom pritisku 0,1 MPa. Kao izoljavajući agens korišćena je neorganska so  $K_3PO_4$ . Fazni dijagrami dvofaznih vodenih sistema na bazi jonskih tečnosti i soli prikazani su na slici 26. Fazni dijagrami su prikazani u jedinicama molaliteta, molovima rastvorene supstance (jonske tečnosti ili soli) po kilogramu rastvarača, što omogućava poređenje dijagrama dobijenih za različite jonske tečnosti.

Dobijeni eksperimentalni podaci za konstrukciju binodalne krive su fitovani na osnovu Merčukove jednačine (jednačina 4) i obrađeni primenom regresione analize metodom najmanjih kvadrata, pri čemu su dobijeni parametri Merčukove jednačine A, B i C (Tabela 17). Na osnovu izračunatih standardnih devijacija i regresionih parametara može se zaključiti da su eksperimentalno dobijene binodalne krive uspešno fitovane primenom Merčukove jednačine.

**Tabela 16.** Hemijske strukture sintetisanih jonskih tečnosti na bazi holina

Naziv JT	IUPAC naziv	Skraćenica	Struktura
Holin hlorid	2-hidroksi- <i>N,N,N</i> -trimetiletan-1-aminium hlorid	[Ch][Cl]	
Holin nikotinat	2-hidroksi- <i>N,N,N</i> -trimetiletan-1-aminium piridin-3-karboksilat	[Ch][Nic]	
Holin propanoat	2-hidroksi- <i>N,N,N</i> -trimetiletan-1-aminium propanoat	[Ch][Prop]	
Holin butirat	2-hidroksi- <i>N,N,N</i> -trimetiletan-1-aminium butirat	[Ch][But]	

**Slika 26.** Fazni dijagrami dvofaznih vodenih sistema sa jonskim tečnostima na bazi holina i soli (jonska tečnost +  $K_3PO_4$  +  $H_2O$ )

▲ [Ch][Prop], ▲ [Ch][But], ▲ [Ch][Nic] i ▲ [Ch][Cl]

**Tabela 17.** Parametri Merčukove jednačine na osnovu koje su fitovani eksperimentalno dobijeni podaci faznih dijagrama za ispitivane dvofazne vodene sisteme

Jonska tečnost	$A \pm \sigma$	$B \pm \sigma$	$C \pm \sigma$	$R^2$
[Ch][Cl]	121,4 ± 6,64	-0,32 ± 0,019	$(7,27 \pm 2,01) \cdot 10^{-6}$	0,994
[Ch][Prop]	151,7 ± 25,6	-0,42 ± 0,058	$(6,54 \pm 4,72) \cdot 10^{-6}$	0,978
[Ch][Nic]	111,79 ± 4,09	-0,24 ± 0,01	$1,82 \cdot 10^{-5} \pm 6,21 \cdot 10^{-7}$	0,999
[Ch][But]	83,00 ± 1,36	-0,23 ± 0,0045	$1,69 \cdot 10^{-5} \pm 3,07 \cdot 10^{-7}$	1

$\sigma$  – standardna greška;  $R^2$  – koeficijent korelacije

Na osnovu faznog dijagrama dobija se uvid u oblast mešljivosti/nemešljivosti faza u zavisnosti od sastava smeše (masenog udela joneke tečnosti i neorganske soli). Ukoliko je kriva rastvorljivosti bliža koordinatnim osama, odnosno što je dvofazna oblast šira, potrebna je manja količina soli da isoli određenu količinu jonske tečnosti. Eksperimentalni podaci masenih udela komponenata jonske smeše potrebnih da bi se nagradio dvofazni vodeni sistem dati su u prilogu (Tabela P2).

Fazni dijagrami dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti i soli (Slika 26) pružaju uvid u uticaj jonske tečnosti na sposobnost formiranja dvofaznog vodenog sistema.

Kada se so visoke gustine naelektrisanja, kao što je  $K_3PO_4$ , rastvori u vodi, izolovani joni su okruženi slojem molekula vode, što je fenomen poznat kao hidratacija i efekat isolvavanja („salting-out“ efekat). Dakle, kada se  $K_3PO_4$  doda u vodeni medijum koji sadrži jonsku tečnost, dve rastvorene supstance se takmiče za molekule rastvarača. Neorganski joni su sposobniji da formiraju hidratacione komplekse i, stoga, dolazi do „migracije“ molekula rastvarača od jona jonske tečnosti ka jonima neorganske soli, što posledično dovodi do razdvajanja dve vodene faze: faza u kojoj je značajno veći udeo jonske tečnosti (JT-faza) i faza u kojoj je značajno veći udeo soli (so-faza).

Uslov za formiranje dvofaznog vodenog sistema je da joni jonske tečnosti poseduju delokalizovano naelektrisanje i, posledično, budu slabo hidratizani u rastvoru. Shodno tome, holinske jonske tečnosti sa alifatičnim anjonom ili sa potpuno hidrogenizovanim C-atomima anjona mogu da ostvare fazno razdvajanje uz dodavanje rastvora fosfatne soli.

Poređenjem faznih dijagrama dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti koji sadrže istu neorgansku so moguće je analizirati uticaj anjona jonske tečnosti na sposobnost

formiranja sistema (Slika 26). Sposobnost ispitivanih jonskih tečnosti da formiraju dvofazni vodeni sistem sa  $K_3PO_4$  opada sledećim redosledom:  $[Ch][But] \approx [Ch][Prop] > [Ch][Nic] > [Ch][Cl]$ .

Povećanje broja ugljenikovih atoma u jonskoj tečnosti dovodi do smanjenja njene hidrofilne prirode, što podrazumeva slabiji afinitet prema vodi. Međutim, sa slike 26 se može uočiti da i  $[Ch][Nic]$  gradi dvofazni vodeni sistem, a ta sposobnost se može pripisati prisustvu aromatičnog prstena sa velikim brojem ugljenikovih atoma, koji doprinose efikasnosti formiranja dvofaznih vodenih sistema. Uzimajući u obzir vrednosti koeficijenta raspodele n-oktanol-voda ( $\log K_{ow}$ ) za anjone jonskih tečnosti, kao meru diferencijalne rastvorljivosti date supstance između oktanela i vode, odnosno meru hidrofobnosti četiri jonske tečnosti na bazi holina, dobijamo sledeći niz:  $\log K_{ow}([But]) = 0,78 > \log K_{ow}([Prop]) = 0,25 > \log K_{ow}([Nic]) = 0,15 > \log K_{ow}([Ch][Cl]) = -3,70$  (www.chemspider.com). Niz vrednosti  $\log K_{ow}$  za ispitivane jonske tečnosti slaže se sa dobijenim kapacitetima za formiranje dvofaznih jonskih sistema sa slike 26, odnosno što je veća hidrofobnost jonske tečnosti, ona se lakše isoljava kalijum fosfatom.

Uprkos tome, treba naglasiti da je sposobnost jonskih tečnosti na bazi holina za razdvajanje faza niža od sposobnosti jonskih tečnosti koje sadrže druge vrste katjona. Tako se, na primer, jonske tečnosti sa hloridnim anjonom, a različitim katjonima, 1-butil-3-metilimidazolijumom, 1-butil-1-metilpirolidinijumom, tetrabutilfosfonijumom ili tetrabutilamonijumom, lakše isoljavaju od  $[Ch][Cl]$ . Ovo je inherentna posledica prisustva tri metil-grupe i hidroksilne grupe na katjonu holina, koje pojačavaju njegov afinitet prema vodi (Passos et al., 2012a). Prisustvo -OH grupe sa kojom molekuli vode formiraju jake vodonične veze i dipol-dipol interakcije i odsustvo dužih hidrofobnih lanaca u molekulu holina dovode do slabljenja hidrofobne solvatacije molekula (Vraneš et al., 2018).

#### **4.2.2. Primena ispitanih dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti za ekstrakciju HMF iz meda**

Okarakterisani dvofazni vodeni sistemi na bazi jonskih tečnosti  $[Ch][Cl]$ ,  $[Ch][Nic]$ ,  $[Ch][Prop]$  i  $[Ch][But]$  i kalijum fosfata primenjeni su za ekstrakciju HMF iz uzoraka meda. Na osnovu faznih dijagrama (Slika 26) određen je adekvatan sastav dvofaznih vodenih sistema za ekstrakciju HMF, koji podrazumeva isti sastav za sve ispitivane sisteme čije su koordinate na

dijagramu u nemešljivoj oblasti. Napravljena je serija dvofaznih trokomponentnih sistema sledećeg sastava: 25% jonska tečnost, 35%  $K_3PO_4$  i 40% vodeni rastvor meda (20% v/v), u kojima je koncentracija HMF bila 5, 10, 20, 40 i 60 mg/kg. Nakon postizanja termodinamičke ravnoteže, faze su razdvojene, a sadržaj HMF u jonskoj tečnosti je određen primenom tečne hromatografije sa DAD detekcijom (Slika 27). U svim slučajevima, koncentracija HMF u donjoj fazi (so) bila je ispod granice detekcije (0,1 mg/kg), što ukazuje na visoke koeficijente raspodele u gornjoj fazi bogatoj jonskom tečnošću. Efikasnost ekstrakcije HMF ekstrahovanog različitim dvofaznim vodenim sistemima izračunata je merenjem koncentracije HMF u fazi bogatoj jonskom tečnošću. U tabeli 18 prikazane su jednačine prave (zavisnost odgovora detektora od koncentracije) za HMF i vrednosti koeficijenta korelacije dobijene primenom HPLC-DAD.

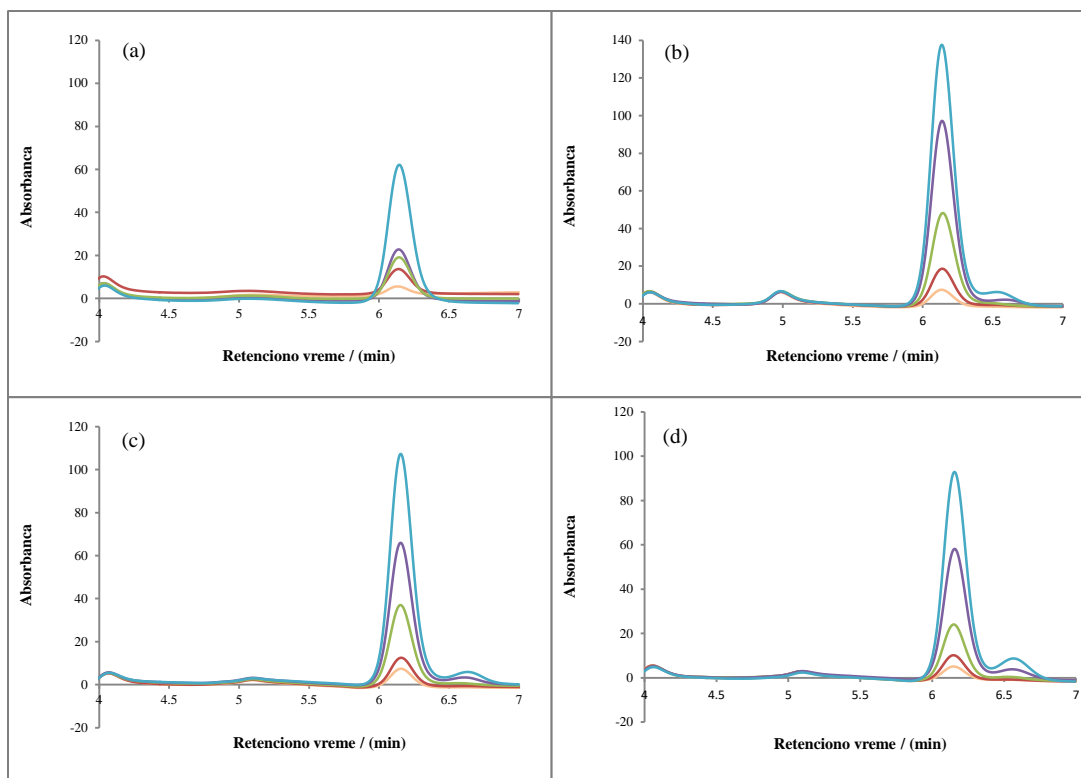
**Tabela 18.** Jednačine prave za određivanje koncentracije HMF u sistemima sa različitim holinijumskim jonskim tečnostima

Jonska tečnost	Jednačina prave	$R^2$
[Ch][Cl]	$y = 13,576x - 14,741$	0,9971
[Ch][Nic]	$y = 29,327x - 14,940$	0,9952
[Ch][But]	$y = 25,410x - 59,656$	0,9980
[Ch][Prop]	$y = 19,092x - 48,863$	0,9964

Efikasnost ekstrakcije HMF ( $EE_{HMF}$ ) primenom dvofaznih vodenih sistema određena je pomoću jednačine:

$$EE_{HMF}(\%) = \frac{c_{JT}V_{JT}}{c_0V_0} \times 100\% \quad (6)$$

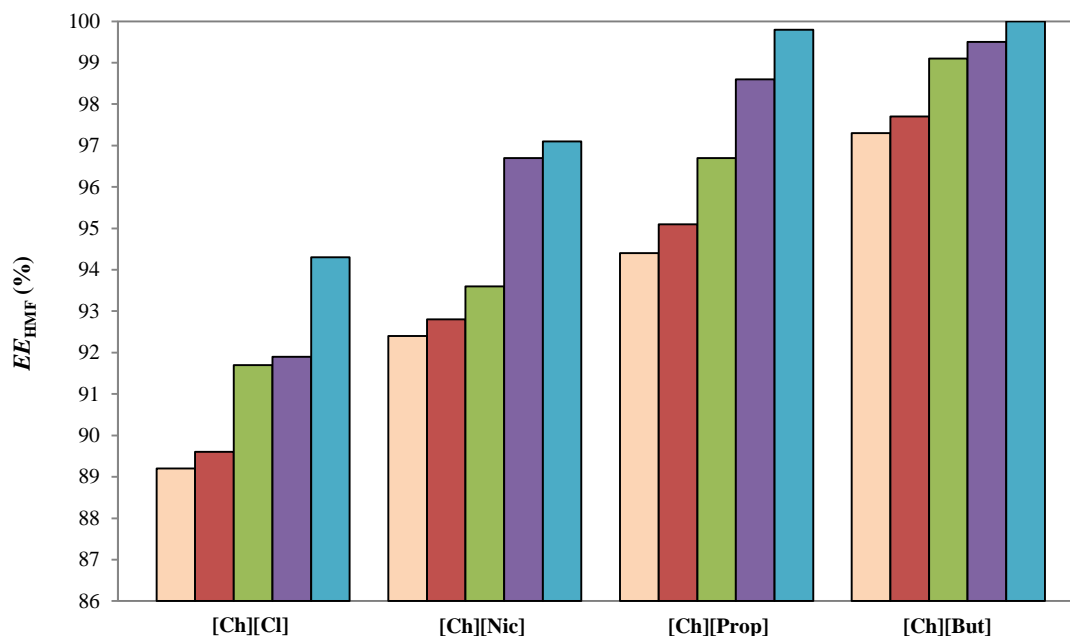
gde su:  $c_{JT}$  i  $c_0$  koncentracije analita u fazi sa jonskom tečnošću (gornja faza) i početna koncentracija analita u rastvoru dodatog uzorka, respektivno, a  $V_{JT}$  i  $V_0$  su zapremine faze sa jonskom tečnošću i rastvora dodatog uzorka, respektivno. Na slici 28 predstavljene su efikasnosti ekstrakcije HMF izračunate na osnovu jednačine 6.



**Slika 27.** Hromatogrami HMF detektovanog u fazi sa jonskom tečnošću (a) [Ch][Cl] (b) [Ch][Nic] (c) [Ch][But] i (d) [Ch][Prop]

■ 5 mg/kg, ■ 10 mg/kg, ■ 20 mg/kg, ■ 40 mg/kg i ■ 60 mg/kg HMF

Iz grafika prikazanog na slici 28 može se uočiti da je primenom svih ispitivanih sistema postignuta efikasnost ekstrakcije veća od 89%. Potpuna ekstrakcija ( $EE_{\text{HMF}} = 100\%$ ) postignuta je primenom ekstrakcionog sistema sa [Ch][But], dok je najslabiju sposobnost da ekstrahuje HMF pokazao sistem sa [Ch][Cl]. Objašnjenje mehanizma ekstrakcije, odnosno tipova interakcija koje se pri upotrebi dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti ostvaruju, te posledično vode odgovarajućim efikasnostima ekstrakcije, može se dobiti primenom računarske simulacije.



**Slika 28.** Efikasnost ekstrakcije HMF primenom različitih dvofaznih vodenih sistema

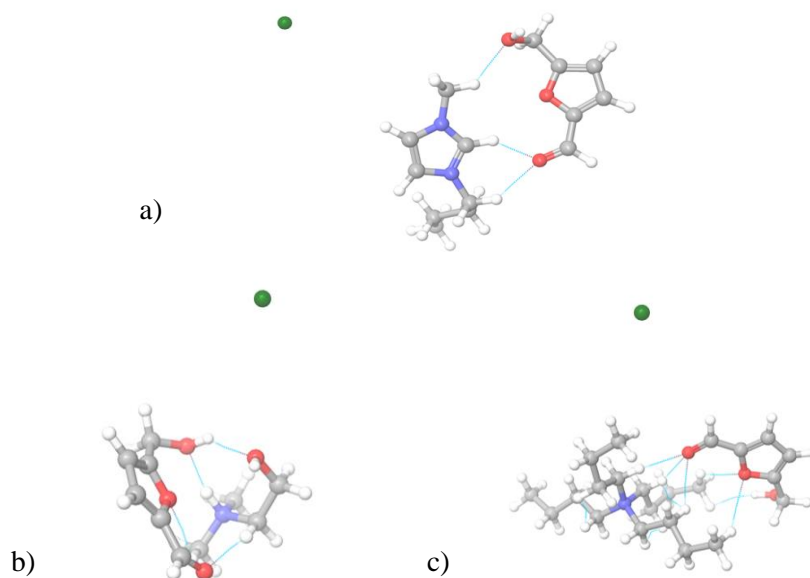
■ 5 mg/kg, ■ 10 mg/kg, ■ 20 mg/kg, ■ 40 mg/kg i ■ 60 mg/kg HMF

#### 4.2.3. Računarske simulacije interakcija jonskih tečnosti sa HMF

Optimizovane strukture sistema jonskih tečnosti sa HMF, zajedno sa vizuelizacijom nekovalentnih interakcija (non-covalent interactions – NCI), predstavljene su na slikama 29 i 30. Na slici 29 prikazane su jonske tečnosti sa halogenidnim anjonima da bi se razlikovao uticaj i potencijal različitih katjona za interakcije sa HMF. U svakom sistemu, optimizovane strukture ukazuju da halogenidni anjoni ne utiču na interakcije HMF-jonska tečnost, pošto su svi anjoni „odgurnuti“ od HMF-JT para. Stoga je struktura katjona odlučujuća za tipove interakcija sa HMF. Kao početni korak, sprovedeno je NCI istraživanje i zaključeno je da katjoni na bazi imidazolijuma imaju 3 NCI sa HMF, jednu preko H-veze između H2 imidazolijumovog prstena i kiseonika keto grupe iz HMF, i dve slabije interakcije između alkil grupa imidazolijumovog prstena i kiseonika iz HMF. Ako se imidazolijumski prsten zameni holin katjonom, broj NCI se povećava na 4, sa 2 tipa interakcije vodonične veze (-OH grupa i atom azota holinijuma). Najveći broj interakcija sa HMF (6 NCI) dobijen je korišćenjem katjona tipa tetrabutilamonijum, zbog izražene mogućnosti formiranja disperzivnog tipa interakcija sa alkil bočnim lancima.



Nakon NCI analize izračunat je  $\Delta G_{\text{bin}}$  (u jednačini 5 je naveden I za katjon, dok je II HMF) i rezultati su prikazani u tabeli 19. Dobijeni podaci pokazuju da je afinitet imidazolijum katjona prema HMF najslabiji, dok su vrednosti energije vezivanja za sisteme sa holinom i tetrabutilamonijum katjonima slične, što sugerise da je doprinos H-vezivanja ukupnom vezivanju značajno veći u odnosu na disperzivne interakcije.



**Slika 29.** Geometrijski optimizovan sistem jonskih tečnosti sa HMF

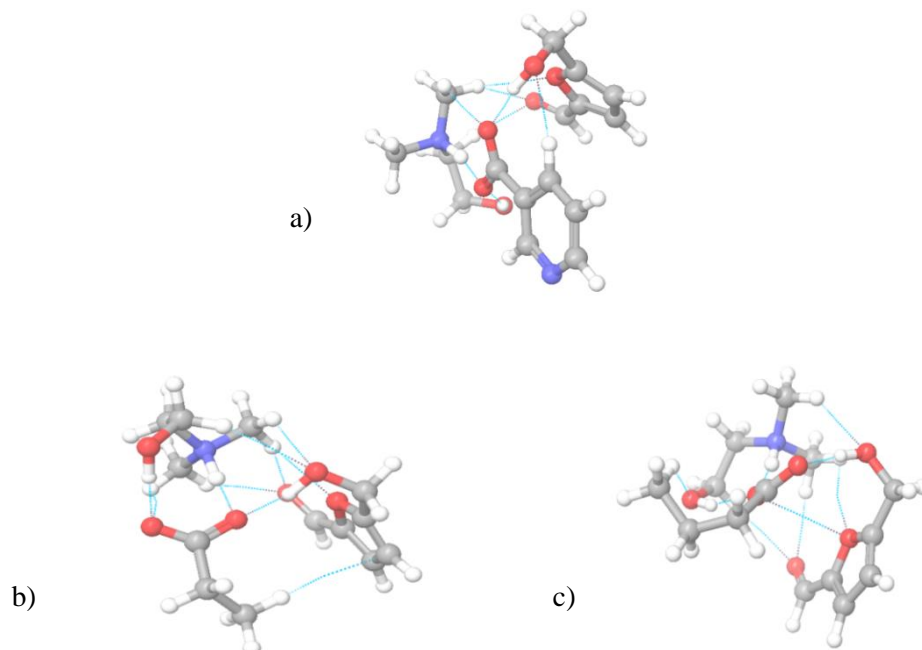
a) [Bmim][Cl] b) [Ch][Cl] c) [N<sub>4444</sub>][Cl]

Bmim – 1-butil-3-metilimidazolijum; N<sub>4444</sub> – tetrabutilamonijum

**Tabela 19.** Izračunate energije vezivanja između jonskih tečnosti i HMF

Jonska tečnost	$\Delta G_{\text{bin}}$ (kJ/mol)
[Bmim][Cl]	-77,93
[Ch][Cl]	-89,27
[N <sub>4444</sub> ][Cl]	-90,61
[Ch][Nic]	-108,24
[Ch][Pro]	-116,73
[Ch][But]	-117,05

Zbog visoke energije vezivanja i najboljih eksperimentalnih rezultata, dalja istraživanja su bila usmerena samo ka holin katjonu. U narednoj fazi, ispitan je uticaj različitih anjona na energiju vezivanja holinskih jonskih tečnosti, odnosno hloridni anjon se menja nikotinatom, propanoatom ili butiratom, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 30. Iz prikazanih rezultata uočava se da zamena hloridnog anjona organskim anjonima dovodi do značajnih interakcija katjon-HMF. Iz dobijenih rezultata, primećeno je da su karboksilne grupe u strukturi anjona najodgovornije za interakcije sa katjonom, prvenstveno N-atomom i hidroksilnom grupom. Usled ovih uticaja anjona, interakcije između katjona i HMF značajno slabe, ali se kompenzacija postiže anjon-HMF interakcijama. Posmatrajući NCI, očigledna je razlika između alifatičnog i aromatičnog anjona, zbog različitog položaja karboksilne grupe u odnosu na holin. Kod alifatičnog katjona, karboksilna grupa je pozicionirana između -OH grupe i N-atoma holina, omogućavajući snažne interakcije katjona i anjona, što posledično dovodi do pretežno disperznih interakcija između katjona i HMF. Ovo se manifestuje sa 4 NCI između alkil grupa holin katjona i kiseonika HMF. Interakcija HMF-JT je dodatno ojačana dvema interakcijama između anjona i HMF, rezultujući sa ukupno 6 NCI (isto kao u sistemu sa  $[N_{444}][Cl]$ ). Sa druge strane, prisustvo nikotinamida kao anjona dovodi do različite orijentacije anjona zbog sternih smetnji. Karboksilna grupa je i dalje orijentisana ka -OH grupi holina, što dovodi do potpunog isključivanja -OH grupe i N-atoma u interakcijama katjon-HMF. Nikotinamidni prsten takođe štiti HMF od većine alkil grupa holin katjona, smanjujući uticaj disperzionih interakcija između katjona i HMF (dostupna je samo jedna metil grupa holina). Shodno tome, odlučujuću ulogu u interakciji  $[Ch][Nic]$ -HMF u ovim sistemima ima nikotinamid, što dovodi do manje izražene ukupne interakcije između HMF i jonske tečnosti (5 NCI). Interakcije potpomognute anjonom između jonske tečnosti i HMF dodatno su potvrđene izračunatom energijom vezivanja,  $\Delta G_{bin}$  (Tabela 19). Energije vezivanja imaju skoro iste vrednosti za jonske tečnosti sa  $[Pro]^-$  i  $[But]^-$ , dok je afinitet HMF prema jonskim tečnostima sa nikotinamid anjonom značajno manji, što potvrđuje prethodne zaključke.

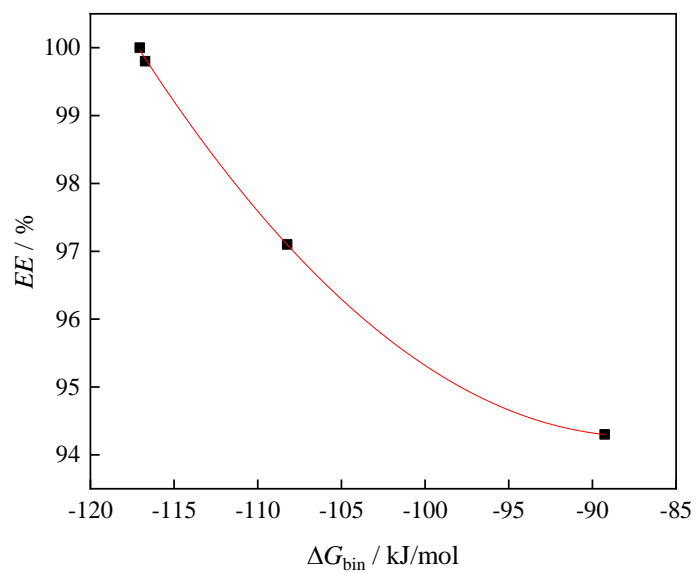


**Slika 30.** Geometrijski optimizovan sistem jonskih tečnosti sa HMF

a) [Ch][Nic] b) [Ch][Pro] c) [Ch][But]

Dobijeni teorijski rezultati ( $\Delta G_{\text{bin}}$ ) korelirani su sa eksperimentalno određenom efikasnošću ekstrakcije (Slika 31). Iz prikazane korelacije uočava se porast efikasnosti ekstrakcija sa porašću apsolutne vrednosti energije vezivanja između jonske tečnosti i HMF. Ova zavisnost prati kvadratnu funkciju, pri čemu se dobija koeficijent korelacije  $R^2$  od 0,9959, ukazujući da procena  $\Delta G_{\text{bin}}$  može da posluži kao dobar prediktor ekstrakcionog potencijala novosintetisanih jonskih tečnosti.

Na osnovu računarskih simulacija interakcija HMF sa jonskim tečnostima i određenih energija vezivanja može se zaključiti da je uticaj anjona jonske tečnosti ključan za ekstrakciju HMF, što je potvrđeno rezultatima prikazanim u poglavlju 4.2.2. *Primena ispitanih dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti za ekstrakciju HMF iz meda.* Istraživanja Berton i saradnika (2021), koji su primenom dvofaznih vodenih sistema na bazi holinskih jonskih tečnosti ([Ch][OAc], [Ch][Pro], [Ch][But] i [Ch][Hex]) i neorganske soli ekstrahovali herbicide uz postignute efikasnosti ekstrakcije veće od 90% potvrđuju, takođe, ovaj navod. Sahriari i saradnici (2012) su, takođe, primenom sistema zasnovanih na bazi holinskih jonskih tečnosti ekstrahovali antibiotike sa velikim prinosima.



**Slika 31.** Zavisnost energije vezivanja od efikasnosti ekstrakcije za ispitivane jonske tečnosti

## 5. ZAKLJUČAK

Uzorci meda (2016–2018. godina) karakteristični za Autonomnu Pokrajinu Vojvodinu, Republiku Srbiju i okolne zemlje, te Zapadni Balkan ispitivani su u pogledu fizičko-hemijskih parametara, mineralnog sastava, parametara boje, aminokiselinskog profila, kao i antioksidativnog, antibakterijskog i antiproliferativnog profila. Većina ispitivanih uzoraka meda ispunjavala je zakonom definisane kriterijume kvaliteta. Sporni parametri zbog kojih uzorci meda nisu bili u skladu sa nacionalnom i EU regulativom su sadržaji vlage i HMF.

Na osnovu koeficijenata korelacije između niza parametara kvaliteta meda (fizičko-hemijske karakteristike, antioksidativni i antibakterijski profil) izabrani su lako određivi parametri – slobodna kiselost i parametri boje meda  $L^*$  i  $a^*$  za razvijanje statističkog modela (ANN modela) za lako predviđanje antioksidativnih i antibakterijskih svojstava meda, odnosno svojstva nazvanog *Moć meda*, koja se određuje u cilju brze i lake predikcije zdravstvenih dobrobiti meda. Dobijeni rezultati ANN modela su pokazali da su uzorci šumskog meda ispoljili najveće vrednosti *Moći meda*.

Ispitujući antioksidativnu, antibakterijsku i antiproliferativnu aktivnost različitih vrsta meda ustanovljeno je da je med od bosiljka najbogatiji polifenolima, a med od uljane repice najsiromašniji. Fruškogorski lipov med i med od facelije odlikovala je najjača antibakterijska aktivnost, pre svega prema gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Najveću antiproliferativnu aktivnost ispoljili su lipov med sa Fruške gore i livadski med sa Kosova i Metohije prema ćelijama raka dojke (MCF7), grlića materice (HeLa) i debelog creva (HT-29). Utvrđeno je da su bioaktivne komponente iz meda odgovorne za njegovu antiproliferativnu aktivnost, ali da ne postoji korelacija između antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti meda.

Ispitivanjem uticaja holinskih jonskih tečnosti (holin hlorid ([Ch][Cl]), holin nikotinat ([Ch][Nic]), holin propionat ([Ch][Prop]) i holin butirat ([Ch][But]) na formiranje dvofaznih

vodenih sistema poređenjem faznih dijagrama zaključeno je da sposobnost jonskih tečnosti da formiraju dvofazni vodeni sistem sa  $K_3PO_4$  opada sledećim redosledom:  $[Ch][But] \approx [Ch][Prop] > [Ch][Nic] > [Ch][Cl]$ .

Primenom svih ispitivanih dvofaznih vodenih sistema za ekstrakciju HMF iz meda postignuta je efikasnost ekstrakcije veća od 85%. Potpuna ekstrakcija ( $EE = 100\%$ ) postignuta je primenom ekstrakcionog sistema sa  $[Ch][But]$ , dok je najslabiju sposobnost da ekstrahuje HMF ispoljio sistem sa  $[Ch][Cl]$ .

Mehanizmi ekstrakcije HMF primenom jonskih tečnosti objašnjeni su na osnovu optimizovanih struktura sistema jonskih tečnosti sa HMF, zajedno sa vizuelizacijom nekovalentnih interakcija i na osnovu izračunatih energija vezivanja  $\Delta G_{bin}$ , koja može da posluži kao dobar prediktor ekstrakcionog potencijala novosintetisanih jonskih tečnosti.

## 6. LITERATURA

Abu-Jdayil B., Ghzawi A., Al-Malah K., Zaitoun S., Heat effect on rheology of light and dark-colored honey, *Journal of Food Engineering*, 51 (2002), 33–38.

Ahmed M., Djebli N., Aissat S., Khiati B., Meslem A., Bacha S., *In vitro* activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3 (2013), 816–821.

Albertsson P.A., Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems, *Nature*, 182 (1958), 709–711.

Albu A., Radu-Rusu C.G., Pop I.M., Frunza G., Nacu G., Quality assessment of raw honey issued from Eastern Romania, *Agriculture*, 11 (2021), 247.

Albu A., Radu-Rusu R.M., Simeanu D., Radu-Rusu C.G., Pop I.M., Phenolic and total flavonoid contents and physicochemical traits of Romanian monofloral honeys, *Agriculture*, 12 (2022), 1378.

Al-Farsi M., Al-Belushi S., Al-Amri A., Al-Hadhrami A., Al-Rusheidi M., Al-Alawi A., Quality evaluation of Omani honey, *Food Chemistry*, 262 (2018), 162–167.

Alfonsi K., Colberg J., Dunn P.J., Fevig T., Jennings S., Johnson T.A., Kleine H.P., Knight C., Nagy M.A., Perry D.A., Stefaniak M., Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organization, *Green Chemistry*, 10 (2008), 31–36.

Almasaudi S., The antibacterial activities of honey, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (2021), 2188–2196.

Almasaudi S.B., Al-Nahari A.A.M., Abd El-Ghany E.S.M., Barbour E., Al Muhayawi S.M., Al-Jaouni S., Azhar E., Qari M., Qari Y.A., Harakeh S., Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24 (2017), 1255–1261.

Alqarni A.S., Owayss A.A., Mahmoud A.A., Hannan M.A., Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia, *Journal of Saudi Chemical Society*, 18 (2014), 618–625.

Alqarni A.S., Owayss A.A., Mahmoud A.A., Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia, *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (2016), 114–120.

Alvarez-Suarez J.M., Giampieri F., Battino M., Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases, *Current Medicinal Chemistry*, 20 (2013) 621–638.

Alvarez-Suarez J.M., Giampieri F., González-Paramás A.M., Damiani E., Astolfi P., Martínez-Sánchez G., Bompadre S., Quiles J.L., Santos-Buelga C., Battino M., Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2012), 1508–1516.

Alves A., Ramos A., Gonçalves M.M., Bernardo M., Mendes B., Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys, *Journal of Food Composition and Analysis*, 30 (2013), 130–138.

Amiry S., Esmaili M., Alizadeh M., Classification of adulterated honeys by multivariate analysis, *Food Chemistry*, 224 (2017), 390–397.

Anand S., Pang E., Livanos G., Mantri N., Characterization of physico-chemical properties and antioxidant capacities of bioactive honey produced from Australian grown *Agastache rugosa* and its correlation with colour and poly-phenol content, *Molecules*, 23 (2018), 108.

Anastas P.T., Eghbali N., Green chemistry: Principles and practice, *Chemical Society Reviews*, 39 (2010), 301–312.

Anastas P.T., Kirchoff M.M., Origins, current status, and future challenges of green chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 35 (2002), 686–694.

Anklam E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chemistry*, 63 (1998), 549–562.

Ariffin A.A., Ghazali H.M., Kavousi P., Validation of a HPLC method for determination of hydroxymethylfurfural in crude palm oil, *Food Chemistry*, 154 (2014) 102–107.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), *Official Methods of Analysis*, 17<sup>th</sup> ed., Maryland, USA, (2000).

Awad W.H., Gilman J.W., Nyden M., Harris R.H., Sutto T.E., Callahan J., Trulove P.C., DeLong H.C., Fox D.M., Thermal degradation studies of alkyl-imidazolium salts and their application in nanocomposites, *Thermochimica Acta*, 409 (2004), 3–11.

Badolato M., Carullo G., Cione E., Aiello F., Caroleo M.C., From the hive: honey, a novel weapon against cancer, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142 (2017), 290–299.



- Bahrani S., Raeissi S., Sarshar M., Experimental investigation of ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse with 1,3-dimethylimidazolium dimethyl phosphate, *Bioresource Technology*, 185 (2015), 411–415.
- Banerjee A., Ibsen K., Brown T., Chen R., Agatemor C., Mitragotri S., Ionic liquids for oral insulin delivery, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (2018), 7296–7301.
- Barra M.P.G., Ponce-Díaz M.C., Venegas-Gallegos C., Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70 (2010), 75–84.
- Basheer I., Hajmeer M., Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application, *Journal of Microbiological Methods*, 43 (2000), 3–31.
- Bath P.K., Singh N., A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey, *Food Chemistry*, 67 (1999), 389–397.
- Belchior D.C.V., Quental M.V., Pereira M.M., Mendonça C.M.N., Duarte I.F., Freire M.G., Performance of tetraalkylammonium-based ionic liquids as constituents of aqueous biphasic systems in the extraction of ovalbumin and lysozyme, *Separation and Purification Technology*, 233 (2020), 116019.
- Bentabol Manzanares A., Hernández García Z., Rodríguez Galdón B., Rodríguez Rodríguez E., Díaz Romero C., Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition, *Food Chemistry*, 126 (2011), 664–672.
- Berriel V., Barreto P., Perdomo C., Characterisation of Uruguayan honeys by multi-elemental analyses as a basis to assess their geographical origin, *Foods*, 8 (2019), 24.
- Berton, P., Tian, H., Rogers, R.D., Phase behavior of aqueous biphasic systems with choline alkanoate ionic liquids and phosphate solutions: The influence of pH, *Molecules*, 26 (2021), 1702.
- Bilandžić N., Đokić M., Sedak M., Kolanović B.S., Varenina I., Končurat A., Rudan N., Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions, *Food Chemistry*, 128 (2011), 1160–1164.
- Bogdanov S., Nature and origin of the antibacterial substances in honey, *LWT-Food Science and Technology*, 30 (1997), 748–753.
- Bogdanov S., Haldimann M., Luginbühl W., Gllmann P., Minerals in honey: Environmental, geographical and botanical aspects, *Journal of Apicultural Research*, 46 (2007), 269–275.
- Bogdanov S., Martin P., Honey authenticity: a review, *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93 (2002), 232–254.

Bogdanov S., Martin P., Lullmann, C., Harmonised methods of the international honey commission, Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld, 5 (2002), 1–62.

Bonté F., Desmoulière A., Le miel: Origine et composition, *Actualités Pharmaceutiques*, 531 (2013), 18–21.

Bose B., Honey or sugar in treatment of infected wounds? *The Lancet*, 319 (1982), 963.

Bouhlali E.D.T., Bammou M., Sellam K., Ramchoun M., Benlyas M., Alem C., Filali-Zegzouti Y., Evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities of eleven monofloral honey samples collected from Morocco, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8 (2016), 299–306.

Boumendjel A., Boccard J., Carrupt P.A., Nicolle E., Blanc M., Geze A., Choisnard L., Wouessidjewe D., Matera E.L., Dumontet C., Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: Forward structure-activity relationship, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2008), 2307–2310.

Boussaid A., Chouaibi M., Rezig L., Hellal R., Donsi F., Ferrari G., Hamdi S., Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia, *Arabian Journal of Chemistry*, 11 (2018), 265–274.

Boys S.F., Bernardi F., The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors, *Molecular Physics*, 19 (1970), 553–566.

Bridges N.J., Gutowski K.E., Rogers R.D., Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS), *Green Chemistry*, 9 (2007), 177–183.

Brudzynski K., A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review, *Food Chemistry*, 332 (2020), 127229.

Brudzynski K., Sjaarda C., Maldonado-Alvarez L., A new look on protein-polyphenol complexation during honey storage: Is this a random or organized event with the help of dirigent-like proteins? *PLoS One*, 8 (2013), 1–9.

Bucekova M., Jardekova L., Juricova V., Bugarova V., Di Marco G., Gismondi A., Leonardi D., Farkasovska J., Godocikova J., Laho M., Klaudiny J., Majtan V., Canini A., Majtan J., Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings, *Molecules*, 24 (2019), 1573.

Bulut L., Kilic M., Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content, *Journal of Food Processing and Preservation*, 33 (2009), 22–32.

Buszewska-Forajta M., Markuszewski M.J., Kaliszan R., Free silanols and ionic liquids as their suppressors in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1559 (2018), 17–43.

Camiña J.M., Pellerano R.G., Marchevsky E.J., Geographical and botanical classification of honeys and apicultural products by chemometric methods. A review, *Current Analytical Chemistry*, 8 (2012), 408–425.

Can Z., Yildiz O., Sahin H., Akyuz Turumtay E., Silici S., Kolayli S., An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles, *Food Chemistry*, 180 (2015), 133–141.

Capuano E., Fogliano V., Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies, *LWT-Food Science and Technology*, 44 (2011), 793–810.

Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S., Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys, *Food Chemistry*, 103 (2007), 601–606.

Cavia M.M., Fernández-Muino M.A., Alonso-Torre S.R., Huidobro J.F., Sancho M.T., Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation, *Food Chemistry*, 100 (2007), 1728–1733.

Četojević-Simin D., Tumor cell growth activity of fruit and pomace extracts. In *Fruit and Pomace Extracts: Biological Activity, Potential Applications and Beneficial Health Effects*, Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, (2015), 241–253.

Četojević-Simin D., Bogdanović G.M., Cvetković D.D., Veličanski A.S., Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana L.* Kombucha, *Journal of B.U.ON.*, 13 (2008), 395–401.

Chakir A., Romane A., Barbagianni N., Bartoli D., Ferrazzi P., Major and trace elements in different types of Moroccan honeys, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (2011), 223–231.

Chakir A., Romane A., Marcazzan G.L., Ferrazzi P., Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco, *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (2016), 946–954.

Chattopadhyay P.B., Rangarajan R., Application of ANN in sketching spatial nonlinearity of unconfined aquifer in agricultural basin, *Agricultural Water Management*, 133 (2014), 81–91.

Chemat F., Vian M.A., Cravotto G., Green extraction of natural products: Concept and principles, *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2012), 8615–8627.

ChemSpider-Search and share chemistry, dostupno na: <http://www.chemspider.com/>, pristupljeno: 10.09.2022.

- Chen Q., Qi S., Li H., Han X., Ouyang Q., Zhao J., Determination of rice syrup adulterant concentration in honey using three-dimensional fluorescence spectra and multivariate calibrations, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 131 (2014), 177–182.
- Chen W., Wu S., Zhang J., Yu F., Miao X., Tu X., Salting-out assisted liquid-liquid extraction of 5-hydroxymethylfurfural in honey with determination by high performance liquid chromatography, *Analytical Methods*, 11 (2019), 4835–4841.
- Chernetsova E.S., Morlock G.E., Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey, *International Journal of Mass Spectrometry*, 314 (2012), 22–32.
- Chessum J.K., Chen T., Hamid N., Kam R., A comprehensive chemical analysis of New Zealand honeydew honey, *Food Research International*, 157 (2022), 111436.
- Chinnappan A., Baskar C., Kim A., Biomass into chemicals: green chemical conversion of carbohydrates into 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquids, *RSC Advances*, 6 (2016), 63991–64002.
- Chirifie J., Zamora M.C., Motto A., The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys, *Journal of Food Engineering*, 72 (2006), 287–292.
- Ciulu M., Solinas S., Floris I., Panzanellia A., Pilo M.I., Piu P.C., Spano N., Sanna G., RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey, *Talanta*, 83 (2011), 924–929.
- Claus J., Sommer F.O., Kragl U., Ionic liquids in biotechnology and beyond, *Solid State Ionics*, 314 (2018), 119–128.
- Codex Alimentarius Commission (2001). Revised Codex Standards for Honey, Codex Standard 12–1981, Rev. 2.
- Colomines G., Decaen P., Lourdin D., Leroy E., Biofriendly ionic liquids for starch plasticization: a screening approach, *RSC Advances*, 6 (2016), 90331–90337.
- Cometto P.M., Faye P.F., Naranjo R.D., Rubio M.A., Aldao M.A.J., Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003), 5079–5087.
- Cornara L., Biagi M., Xiao J., Burlando B., Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products, *Frontiers in Pharmacology*, 8 (2017) 412.

Cotte J.F., Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F., Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004), 1342–1350.

Cravotto G., Boffa L., Mantegna S., Perego P., Avogadro M., Cintas P., Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (2008), 898–902.

Crowhurst L., Lancaster N.L., Pérez Arlandis J.M., Welton T., Manipulating solute nucleophilicity with room temperature ionic liquids, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004), 11549–11555.

Czipa N., Borbély M., Győri Z., Proline content of different honey types, *Acta Alimentaria*, 41 (2012), 26–32.

Da Costa C.C., Pereira R.G., The influence of propolis on the rheological behaviour on pure honey, *Food Chemistry*, 76 (2002), 417–421.

da Silva P.M., Gauche C., Gonzaga L.V., Costa A.C.O., Fett R., Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry*, 196 (2016), 309–323.

De La Fuente E., Ruiz-Matute A.I., Valencia-Barrera R.M., Sanz J., Castro I.M., Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys, *Food Chemistry*, 129 (2011), 1483–1489.

Deng J., Liu R., Lu Q., Hao P., Xu A., Zhang J., Tan J., Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey, *Food Chemistry*, 252 (2018), 243–249.

Derewiaka D., Majewska E., Kuzak K., Szadkowska D., Comparison of volatiles and chemical composition of traditional and non-traditional honey available on the Polish market, *Applied Sciences*, 11 (2021), 6371.

Dias A.R., Costa-Rodrigues J., Fernandes M.H., Ferraz R., Prudêncio C., The anticancer potential of ionic liquids, *ChemMedChem*, 12 (2017), 11–18.

Dimitrijević A., Ignjatović Lj., Tot A., Vraneš M., Zec N., Gadžurić S., Trtić-Petrović T., Simultaneous extraction of pesticides of different polarity applying aqueous biphasic systems based on ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids*, 243 (2017), 646–653.

Dinkov D., A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgaria, *Apidologie*, 34 (2003), 319–320.

do Nascimento K.S., Gasparotto Sattler J.A., Lauer Macedo L.F., Serna González C.V., Pereira de Melo I.L., da Silva Araújo E., Granato D., Sattler A., de Almeida-Muradian L.B., Phenolic

compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys, *LWT-Food Science and Technology*, 91 (2018), 85–94.

Dobre I.O, Fernández-González M., Seijo M.C., Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon, *Food Chemistry*, 149 (2014), 84–90.

Dogo Mračević S., Krstić M., Lolić A., Ražić S., Comparative study of the chemical composition and biological potential of honey from different regions of Serbia, *Microchemical Journal*, 152 (2020), 104420.

Domínguez de María P., Maugeri Z., Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents, *Current Opinion in Chemical Biology*, 15 (2011), 220–225.

Dong K., Zhang S., Hydrogen bonds: A structural insight into ionic liquids, *Chemistry – A European Journal*, 18 (2012), 2748–2761.

Driffield M., Chan D., Macarthur R., MacDonald S., Breerton P., Wood R., Single laboratory validation of a method for the determination of hydroxymethylfurfural in honey by using solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography, *Journal of AOAC International*, 88 (2005), 121–127.

Earle M.J., Esperança J.M.S.S., Gilea M.A., Canongia Lopes J.N., Rebelo L.P.N., Magee J.W., Seddon K.R., Widegren J.A., The distillation and volatility of ionic liquids, *Nature*, 439 (2006), 831–834.

Egorova K.S., Gordeev E.G., Ananikov V.P., Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine, *Chemical Reviews*, 117 (2017), 7132–7189.

Escriche I., Kadar M., Juan-Borrás M., Domenech E., Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment, *Food Chemistry*, 142 (2014), 135–143.

Escuredo O., Míguez M., Fernández-González M., Seijo M.C., Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area, *Food Chemistry*, 138 (2013), 851–856.

Esperança J.M.S.S., Canongia Lopes J.N., Tariq M., Santos L.M.N.B.F., Magee J.W., Rebelo L.P.N., Volatility of aprotic ionic liquids – A review, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55 (2010), 3–12.

Espino M., de los Ángeles Fernández M., Gomez F.J.V., Silva M.F., Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76 (2016), 126–136.

Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G., Pereira E., Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2008) 3774–3779.

Fallico B., Zappala M., Arena E., Verzera A., Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys, *Food Chemistry*, 85 (2004), 305–313.

Farkasovska J., Bugarova V., Godocikova J., Majtan V., Majtan J., The role of hydrogen peroxide in the antibacterial activity of different floral honeys, *European Food Research and Technology*, 245 (2019), 2739–2744.

Feás X., Pires J., Estevinho M.L., Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal, *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (2010), 1255–1262.

Fernández-Torres R., Pérez-Bernal J.L., Bello-López M.Á., Callejón-Mochón M., Jiménez-Sánchez J.C., Guiraúm-Pérez A., Mineral content and botanical origin of Spanish honeys, *Talanta*, 65 (2005), 686–691.

Ferraz R., Branco L.C., Prudêncio C., Noronha J.P., Petrovski Ž., Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients, *ChemMedChem*, 6 (2011), 975–985.

Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M., Estevinho L.M., Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chemistry*, 114 (2009), 1438–1443.

Freire M.G., Carvalho P.J., Fernandes A.M., Marrucho I.M., Queimada A.J., Coutinho J.A.P., Surface tensions of imidazolium based ionic liquids: Anion, cation, temperature and water effect, *Journal of Colloid and Interface Science*, 314 (2007), 621–630.

Freire M.G., Carvalho P.J., Silva A.M.S., Santos L.M.N.B.F., Rebelo L.P.N., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *The Journal of Physical Chemistry B*, 113 (2009), 202–211.

Freire M.G., Cláudio A.F.M., Araújo J.M.M., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M., Lopes J.N.C., Rebelo L.P.N., Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012a), 4966–4995.

Freire M.G., Louros C.L.S., Rebelo L.P.N., Coutinho J.A.P., Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications, *Green Chemistry*, 13 (2011), 1536–1545.

Freire M.G., Neves C.M.S.S., Canongia Lopes J.N., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Rebelo L.P.N., Impact of self-aggregation on the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012b), 7660–7668.

Gallina A., Stocco N., Mutinelli K., Karl Fischer titration to determine moisture in honey: A new simplified approach, *Food Control*, 21 (2010), 942–944.

Gámbaro A., Ares G., Giménez A., Pahor S., Preference mapping of color of Uruguayan honeys, *Journal of Sensory Studies*, 22 (2007), 507–519.

Garcia H., Ferreira R., Petkovic M., Ferguson J.L., Leitão M.C., Gunaratne H.Q.N., Seddon K.R., Rebelo L.P.N., Silva Pereira C., Leit M.C., Gunaratne H.Q.N., Seddon K.R., Rebelo P.N., Silva C., Dissolution of cork biopolymers in biocompatible ionic liquids, *Green Chemistry*, 9262 (2010), 3–6.

Gardas R.L., Coutinho J.A.P., A group contribution method for viscosity estimation of ionic liquids, *Fluid Phase Equilibria*, 266 (2008), 195–201.

Ghidotti M., Fiamegos Y., Dumitrascu C., de la Calle M.B., Use of elemental profiles to verify geographical origin and botanical variety of Spanish honeys with a protected denomination of origin, *Food Chemistry*, 324 (2021) 128350.

Ghorbanizamani F., Timur S., Ionic liquids from biocompatibility and electrochemical aspects toward applying in biosensing devices, *Analytical Chemistry*, 90 (2018), 640–648.

Giernoth R., Task-specific ionic liquids, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010), 2834–2839.

Gil-Chávez G.J., Villa J.A., Ayala-Zavala J.F., Heredia J.B., Sepulveda D., Yahia E.M., González-Aguilar G.A., Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12 (2013), 5–23.

Girolamo F.D., D'amato A., Righetti P.G., Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools, *Journal of Proteomics*, 75 (2012), 3688–3693.

Gok S., Severcan M., Goormaghtigh E., Kandemir I., Severcan F., Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis, *Food Chemistry*, 170 (2015), 234–240.

Gomes J.M., Silva S.S., Reis R.L., Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications, *Chemical Society Reviews*, 48 (2019), 4317–4335.

Gomes S., Dias L.G., Moreira L.L., Rodrigues P., Estevinho L., Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 544–548.

Gonzales A.P., Burin L., del Pilar Buera M.A., Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color, *Food Research International*, 32 (1999), 185–191.



González-Miret M.L., Terrab A., Hernanz D., Fernández-Recamales M.Á., Heredia F.J., Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005), 2574–2580.

Gorinstein S., Park Y.S., Heo B.G., Namiesnik J., Leontowicz H., Leontowicz M., Ham K.S., Cho J.Y., Kang S.G., A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables, *European Food Research and Technology*, 228 (2009), 903–911.

Grieu S., Faugeroux O., Traoré A., Claudet B., Bodnar J.L., Artificial intelligence tools and inverse methods for estimating the thermal diffusivity of building materials, *Energy and Buildings*, 43 (2011), 543–554.

Gül A., Pehlivan T., Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25 (2018), 1056–1065.

Guler A., Kocaokutgen H., Garipoglu A.V., Onder H., Ekinci D., Biyik S., Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C3 and C4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis, *Food Chemistry*, 155 (2014), 155–160.

Güneş M.E., Şahin S., Demir C., Borum E., Tosunoğlu A., Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities, *Journal of Food Biochemistry*, 41 (2017), e12345.

Gürkan R., Altunay N., Quantification of 5-hydroxymethylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction, *Journal of Food Composition and Analysis*, 42 (2015), 141–151.

Gutowski K.E., Broker G.A., Willauer H.D., Huddleston J.G., Swatloski R.P., Holbrey J.D., Rogers R.D., Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations, *Journal of the American Chemical Society*, 125 (2003), 6632–6633.

Hajipour A.R., Rafiee F., Recent progress in ionic liquids and their applications in organic synthesis, *Organic Preparations and Procedures International*, 47 (2015), 249–308.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2<sup>nd</sup> ed., Clarendon Press, Oxford, (1989).

Hatano T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T., Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36 (1988), 2090–2097.

Hatti-Kaul R., Aqueous two-phase systems, *Molecular Biotechnology*, 19 (2001), 269–277.

Hegazi A., Al Tahtawi R.H.M., Abd-Allah F., Abdou A.M., Antitumor and antioxidant activity of honey in mice bearing Ehrlich Ascite carcinoma, *Academic Journal of Cancer Research*, 7 (2014), 208–214.

Hejazifar M., Lanaridi O., Bica-Schröder K., Ionic liquid based microemulsions: A review, *Journal of Molecular Liquids*, 303 (2020), 112264.

Hermosín I., Chicón R.M., Cabezudo M.D., Free amino acid composition and botanical origin of honey, *Food Chemistry*, 83 (2003), 263–268.

Holbrey J.D., Seddon K.R., The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 13 (1999), 2133–2140.

Hossen M.S., Ali M.Y., Jahurul M.H.A., Abdel-Daim M.M., Hua Gan S., Khalil M.I., Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review, *Pharmacological Reports*, 69 (2017) 1194–1205.

Hu X., Weng Q., Estimating impervious surfaces from medium spatial resolution imagery using the self-organizing map and multi-layer perceptron neural networks, *Remote Sensing of Environment*, 113 (2009), 2089–2102.

Hulsbosch J., De Vos D.E., Binnemans K., Ameloot R., Biobased ionic liquids: Solvents for a green processing industry?, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4 (2016), 2917–2931.

Idris A., Vijayaraghavan R., Rana U.A., Fredericks D., Patti A.F., MacFarlan, D.R., Dissolution of feather keratin in ionic liquids, *Green Chemistry*, 15 (2013), 525–534.

Iglesias M.T., Martián-Alvarez P.J., Polo M.C., Lorenzo C., Gonzalez M., Pueyo E.N., Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006), 9099–9104.

Jadhav A.H., Kim H., Hwang I.T., Efficient selective dehydration of fructose and sucrose into 5-hydroxymethylfurfural (HMF) using dicationic room temperature ionic liquids as a catalyst, *Catalysis Communications*, 21 (2012), 96–103.

Jaganathan S.K., Mandal M., Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: A review, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009 (2009), 830616.

Jelen H., *Food Flavours: Chemical, Sensory and Technological Properties*, CRC Press, Taylor & Francis Group, (2016).

Johnson E.R., Keinan S., Mori Sánchez P., Contreras García J., Cohen A.J., Yang W., Revealing non-covalent interactions, *Journal of the American Chemical Society*, 132 (2010), 6498–6506.

- Junie L.M., Vică M.L., Glevitzky M., Matei H.V., Physico-chemical characterization and antibacterial activity of different types of honey tested on strains isolated from hospitalized patients, *Journal of Apicultural Science*, 60 (2016), 5–18.
- Jurado-Sánchez B., Ballesteros E., Gallego M., Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction, *Talanta*, 84 (2011), 924–930.
- Kabbani D., Sepulcre F., Wedekind J., Ultrasound-assisted liquefaction of rosemary honey: Influence on rheology and crystal content, *Journal of Food Engineering*, 107 (2011), 173–178.
- Kamal M.A., Klein P., Determination of sugars in honey by liquid chromatography, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18 (2011), 17–21.
- Karabagias I.K., Badeka A., Kontakos S., Karabournioti S., Kontominas M.G., Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics, *Food Chemistry*, 146 (2014), 548–557.
- Kaškonienė V., Venskutonis P.R., Čeksterytė V., Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania, *LWT-Food Science and Technology*, 43, (2010), 801–807.
- Kaškonienė V., Venskutonis P.R., Čeksterytė V., Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania, *Food Chemistry*, 111 (2008), 988–997.
- Kaur G., Kumar H., Singla M., Diverse applications of ionic liquids: A comprehensive review, *Journal of Molecular Liquids*, 351 (2022), 118556.
- Kaygusuz H., Tezcan F., Bedia Erim F., Yildiz O., Sahin H., Can Z., Kolayli S., Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis, *LWT-Food Science and Technology*, 68 (2016), 273–279.
- Kečkeš J., Trifković J., Andrić F., Jovetić M., Tešić Z., Milojković-Opsenica D., Amino acids profile of Serbian unifloral honeys, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (2013), 3368–3376.
- Kek S.P., Chin N.L., Yusof Y.A., Tan S.W., Chua L.S., Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis spp.* and *Trigona spp.* bees, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2 (2014), 150–155.
- Kim J., Lee Y., Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction, *Food Chemistry*, 108 (2008), 582–592.

- Kocúrová L., Balogh I.S., Šandrejová J., Andruch V., Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water, a review, *Microchemical Journal*, 102 (2012), 11–17.
- Kollo T., von Rosen, D., *Advanced Multivariate Statistics with Matrices*, Springer, The Netherlands, (2006).
- Kowalski S., Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing, *Food Chemistry*, 141 (2013), 1378–1382.
- Krishnakumar G.S., Mahendiran B., Gopalakrishnan S., Muthusamy S., Malarkodi Elangovan S., Honey based treatment strategies for infected wounds and burns: A systematic review of recent pre-clinical research, *Wound Medicine*, 30 (2020), 100188.
- Kuś P.M., Congiu F., Teper D., Sroka Z., Jerković I., Tuberoso C.I.G., Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types, *LWT-Food Science and Technology*, 55 (2014), 124–130.
- Kuś P.M., Jerković I., Marijanović Z., Tuberoso C.I.G., Screening of Polish fir honeydew honey using GC/MS, HPLC-DAD, and physical-chemical parameters: Benzene derivatives and terpenes as chemical markers, *Chemistry & Biodiversity*, 14 (2017), e1700179.
- La Serna Ramos I.E., Gómez Ferreras C., An example of the role of exotic flora in the geographical characterisation of honey: *Schinus molle* L. in the Canary Islands (Spain), *Grana*, 50 (2011), 136–149.
- Laube I., Hird H., Brodmann P., Ullmann S., Schöne-Michling M., Chisholm J., Broll H., Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey, *Food Chemistry*, 118 (2010), 979–986.
- Lazarević K.B., Andrić F., Trifković J., Tešić Ž., Milojković-Opsenica D., Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters, *Food Chemistry*, 132 (2012) 2060–2064.
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., Bacandritsos N., Sabatini A.G., Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys, *Journal of Food Engineering*, 64 (2004), 9–21.
- Lee C.Y., Smith N.L., Kime R.W., Morse R.A., Source of the honey protein responsible for apple juice clarification, *Journal of Apiculture Research*, 24 (1985), 190–194.
- León-Ruiz V., Vera S., González-Porto A.V., Andrés M.P.S., Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC, *Food Analytical Methods*, 6 (2013), 488–496.

Leyva-Daniel D.E., Escobedo-Avellaneda Z., Villalobos-Castillejos F., Alamilla-Beltrán L., Welti-Chanes J., Effect of high hydrostatic pressure applied to a Mexican honey to increase its microbiological and functional quality, *Food and Bioproducts Processing*, 102 (2017), 299–306.

Leyva-Jimenez F.J., Lozano-Sanchez J., Borrás-Linares I., de la Cadiz-Gurrea M.L., Mahmoodi-Khaledi E., Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria, *LWT-Food Science and Technology*, 101 (2019), 236–245.

Lima W.G., Moreira Brito J.C., Stephanie da Cruz Nizer W., Sampaio de Assis D.C., Antifungal, antibiofilm and anti-resistance activities of Brazilian monofloral honeys against *Candida* spp., *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42 (2022), 102335.

Liu J.R., Ye Y.L., Lin T.Y., Wang Y.W., Peng C.C., Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan, *Food Chemistry*, 139 (2013), 938–943.

Luís A., Dinis T.B.V., Passos H., Taha M., Freire M.G., Good's buffers as novel phaseforming components of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *Biochemical Engineering Journal*, 101 (2015), 142–149.

Mackay D., Shiu W.Y., Shiu W.Y., Lee S.C., *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, Boca Raton, (2006).

Madani-Tonekaboni M., Kamankesh M., Mohammadi A., Determination of furfural and hydroxymethyl furfural from baby formula using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography and method optimization by response surface methodology, *Journal of Food Composition and Analysis*, 40 (2015), 1–7.

Madejczyk M., Baralkiewicz D., Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES, *Analytica Chimica Acta*, 617 (2008), 11–17.

Manzanares A.B., García H., Galdón B.R., Rodríguez E.R., Romero C.D., Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain, *Food Science and Technology*, 55 (2014), 572–578.

Marić A., Jovanov P., Sakač M., Novaković A., Hadnađev M., Pezo L., Mandić A., Milićević N., Đurović A., Gadžurić S., A comprehensive study of parameters correlated with honey health benefits, *RSC Advances*, 11 (2021), 12434–12441.

Martins S.I.F.S., Jongen W.M.F., van Boekel M.A.J.S., A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling, *Trends in Food Science and Technology*, 11 (2001), 364–373.

- Mato I.S., Huidobro J.F., Simal-Lozano J.S., Sancho M.T., Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006), 1541–1550.
- Maton C., De Vos N., Stevens C.V., Ionic liquid thermal stabilities: decomposition mechanisms and analysis tools, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013), 5963.
- Matović K., Ćirić J., Kaljević V., Nedić N., Jevtić G., Vasković N., Baltić M.Ž., Physicochemical parameters and microbiological status of honey produced in an urban environment in Serbia, *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (2018), 14148–14157.
- Matzen R.D., Zinck Leth-Espensen J., Jansson T., Nielsen D.S., Lund M.N., Matzen S., The antibacterial effect *in vitro* of honey derived from various Danish flora, *Dermatology Research and Practice*, 2018 (2018), 7021713.
- Mbous Y.P., Hayyan M., Hayyan A., Wong W.F., Hashim M.A., Looi C.Y., Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering – Promises and challenges, *Biotechnology Advances*, 35 (2017), 105–134.
- Merchuk J.C., Andrews B.A., Asenjo J.A., Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998 (711), 285–293.
- Montaño J., Palmer A., Numeric sensitivity analysis applied to feedforward neural networks, *Neural Computing and Applications*, 12 (2003), 119–125.
- Moreira R.F.A., Maria C.A.B., Pietroluongo M., Trugo L.C., Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions, *Food Chemistry*, 104 (2007), 1236–1241.
- Moreira R.F.A., Maria C.A.B., Pietroluongo M., Trugo L.C., Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions, *Food Chemistry*, 121 (2010), 697–704.
- Nalda M.J.N., Yagu J.L.B., Calva J.C.D., Gómez M.T.M., Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005), 311–319.
- Nedić N., Nešović M., Radišić P., Gašić U., Baošić R., Joksimović K., Pezo L., Tešić Ž., Vovk I., Polyphenolic and chemical profiles of honey from the Tara mountain in Serbia, *Frontiers in Nutrition*, 9 (2022), 941463.
- Nemo R., Bacha K., Microbial quality, physicochemical characteristics, proximate analysis, and antimicrobial activities of honey from Anfilo district, *Food Bioscience*, 42 (2021), 101132.

- Neves C.M.S.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Improved recovery of ionic liquids from contaminated aqueous streams using aluminium-based salts, *RSC Advances*, 2 (2012), 10882–10890.
- Nie L., Zheng Z., Lu M., Yao S., Guo D., Phase behavior of ionic liquid-based aqueous two-phase systems, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022), 12706.
- Nikolova K., Panchev I., Sainov S., Gentscheva G., Ivanova E., Selected physical properties of lime bee honey in order to discriminate between pure honey and honey adulterated with glucose, *International Journal of Food Properties*, 15 (2012), 1358–1368.
- Nuthakki B., Greaves T.L., Krodkiewska I., Weerawardena A., Burgar M.I., Mulder R.J., Drummond C.J., Protic ionic liquids and ionicity, *Australian Journal of Chemistry*, 60 (2007), 21–28.
- Oddo L.P., Piazza M.G., Pulcini P., Invertase activity in honey, *Apidologie*, 30 (1999), 57–65.
- Önür İ., Misra N.N., Barba F.J., Putnik P., Lorenzo J.M., Gökmen V., Alpas H., Effects of ultrasound and high pressure on physicochemical properties and HMF formation in Turkish honey types, *Journal of Food Engineering*, 219 (2018), 129–136.
- Oroian M., Ropciuc S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds, *Computers and Electronics in Agriculture*, 138 (2017), 148–156.
- Oroian M., Ropciuc S., Paduret S., Honey authentication using rheological and physicochemical properties, *Journal of Food Science and Technology*, 55 (2018), 4711–4718.
- Passos H., Ferreira, A.R., Cláudio A.F.M., Coutinho J.A.P., Freire M.G., Characterization of aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and a citrate-based biodegradable salt, *Biochemical Engineering Journal*, 67 (2012a), 68–76.
- Passos H., Sousa A.C.A., Pastorinho M.R., Nogueira A.J.A., Rebelo L.P.N., Coutinho J.A. P., Freire M.G., Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems for improved detection of bisphenol A in human fluids, *Analytical Methods*, 4 (2012b), 2664.
- Pătruică S., Alexa E., Obiștioiu D., Cocan I., Radulov I., Berbecea A., Lazăr R.N., Simiz E., Vicar N.M., Hulea A., Moraru D., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of some types of honey from Banat region, Romania, *Molecules*, 27 (2022), 4179.
- Pauliuc D., Dranca F., Oroian M., Antioxidant activity, total phenolic content, individual phenolics and physicochemical parameters suitability for Romanian honey authentication, *Foods*, 9 (2020), 306.
- Pawlowska M., Armstrong D.W., Evaluation of enantiometric purity of selected amino acids in honey, *Chirality*, 6 (1994), 270–276.

- Petisca C., Henriques A.R., Pérez-Palacios T., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Assessment of hydroxymethylfurfural and furfural in commercial bakery products, *Journal of Food Composition and Analysis*, 33 (2014), 20–25.
- Petkovic M., Ferguson J.L., Gunaratne H.Q.N., Ferreira R., Leitão M.C., Seddon K.R., Rebelo L.P.N., Pereira C.S., Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids-toxicity and biodegradability, *Green Chemistry*, 12 (2010), 643.
- Piljac-Žegarac J., Stipčević T., Belščak A., Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1 (2009), 43–50.
- Plechkova N.V., Seddon K.R., Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008), 123–150.
- Pleeging C.C.F., Wagener F.A.D.T.G., de Rooster H., Cremers N.A.J., Revolutionizing non-conventional wound healing using honey by simultaneously targeting multiple molecular mechanisms, *Drug Resistance Updates*, 62 (2022), 100834.
- Pohl P., Stecka H., Greda K., Jamroz P., Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys, *Food Chemistry*, 134 (2012), 392–396.
- Pontes M., Marques J.C., Câmara J.S., Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry, *Talanta*, 74 (2007), 91–103.
- Popek S., Halagarda M., Kurska K., A new model to identify botanical origin of Polish honeys based on the physicochemical parameters and chemometric analysis, *LWT-Food Science and Technology*, 77 (2017), 482–487.
- Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, *Sl. glasnik RS*, 101 (2015).
- Puscas A., Hosu A., Cimpoi C., Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration, *Journal of Chromatography A*, 1272 (2013), 132–135.
- Qiao J., Chen L., Kong L., Dong J., Zhou Z., Zhang H., Characteristic components and authenticity evaluation of rape, acacia, and linden honey, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (2020), 9776–9788.
- Quintero-Lira A., Ángeles Santos A., Aguirre-Álvarez G., Reyes-Munguía A., Almaraz-Buendía I., Campos-Montiel R.G., Effects of liquefying crystallized honey by ultrasound on crystal size, 5-hydroxymethylfurfural, colour, phenolic compounds and antioxidant activity, *European Food Research and Technology*, 243 (2017), 619–626.



- Rababah T.M., Al-Omouh M., Brewer S., Alhamad M., Yang W., Alrababah M., Al-Ghzawi A.A.M., Al- u'datt M., Ereifej K., Alsheyab F., Esoh R., Almajwal A., Total phenol, antioxidant activity, flavonoids, anthocyanins and color of honey as affected by floral origin found in the Arid and Semiarid mediterranean areas, *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (2014), 1119–1128.
- Ramirez Cervantes M.A., Gonzales Novelo S.A., Sauri Duch E., Effect of temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage, *Apiacta*, 35 (2000), 162–170.
- Ramli N.A.S., Amin N.A.S, Catalytic conversion of carbohydrate biomass in ionic liquids to 5-hydroxymethyl furfural and levulinic acid: A review, *BioEnergy Research*, 13 (2020), 693–736.
- Rao P.V., Krishnan K.T., Salleh N., Gan S.H., Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 (2016), 657–664.
- Rebane R., Herodes K., A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis, *Analytica Chimica Acta*, 672 (2010), 79–84.
- Rebane R., Herodes K., Evaluation of the botanical origin of Estonian uni- and polyfloral honeys by amino acid content, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008), 10716–10720.
- Reichardt, C. Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium *N*-phenolate betaine dyes, *Green Chemistry*, 7 (2005), 339–351.
- Reilly J.T., Coats M.A., Reardon M.M., Mirjafari A., Study of biocatalytic activity of histidine ammonia lyase in protic ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids*, 248 (2017), 830–832.
- Ribeiro R.O.R., Mársico E.T., Carneiro C.S., Monteiro M.L.G., Conte Júnior C., Oliveira de Jesus E.F., Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LH <sup>1</sup>H NMR), *Journal of Food Engineering*, 135 (2014), 39–43.
- Rilo E., Pico J., García-Garabal S., Varela L.M., Cabeza O., Density and surface tension in binary mixtures of C<sub>n</sub>MIM-BF<sub>4</sub> ionic liquids with water and ethanol, *Fluid Phase Equilibria*, 285 (2009), 83–89.
- Rizelio V.M., Gonzaga L.V., Borges G.D.S.C., Amadeu G., Micke G.A., Fett R., Costa A.C.O., Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples, *Food Chemistry*, 133 (2012), 1640–1645.

Rodríguez-Flores M.S., Escuredo O., Seijo-Rodríguez A., Seijo M.C., Characterization of the honey produced in heather communities (NW Spain), *Journal of Apicultural Research*, 58 (2019), 84–91.

Rufián-Henares J.A., de la Cueva S.P., Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet, *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25 (2008), 1306–1312.

Rybak-Chmielewska H., Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage, *Journal of Apicultural Science*, 51 (2007), 39–48.

Sadeghi R., Golabiazar R., Shekaari H., The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of tri-sodium citrate and 1-butyl-3-methylimidazolium bromide, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 42 (2010), 441–453.

Sakač M., Jovanov P., Marić A., Četojević-Simin D., Novaković A., Plavšić D., Škrobot D., Kovač R., Antioxidative, antibacterial and antiproliferative properties of honey types from the Western Balkans, *Antioxidants*, 11 (2022), 1120.

Sakač M., Jovanov P., Marić A., Tomičić Z., Pezo L., Dapčević Hadnađev T., Novaković A., Free amino acid profiles of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia), *Food and Feed Research*, 46, (2019a), 179–187.

Sakač M., Jovanov P., Pezo L., Kevrešan Ž., Novaković A., Nedeljković N., Physicochemical properties and mineral content of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia), *Food Chemistry*, 276 (2019b), 15–21.

Sak-Bosnar M., Sakač N., Direct potentiometric determination of diastase activity in honey, *Food Chemistry*, 135 (2012), 827–831.

Santos de Almeida T., Júlio A., Saraiva N., Fernandes A.S., Araújo M.E.M., Baby A.R., Rosado C., Mota J.P., Choline-versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43 (2017), 1858–1865.

Šarić G., Matković D., Hruškar M., Vahčić N., Characterisation and classification of Croatian honey by physicochemical parameters, *Food Technology and Biotechnology*, 46 (2008), 355–367.

Selvaraju K., Vikram P., Soon J.M., Krishnan K.T., Mohammed A., Melissopalynological, physicochemical and antioxidant properties of honey from West Coast of Malaysia, *Journal of Food Science and Technology*, 56 (2019), 2508–2521.

Seyhan M.F., Yılmaz E., Timirci-Kahraman Ö., Saygılı N., Kısakesen H.İ., Eronat A.P., Ceviz A.B., Bilgiç Gazioğlu S., Yılmaz-Aydoğan H., Öztürk O., Anatolian honey is not only sweet but

can also protect from breast cancer: Elixir for women from artemis to present, *IUBMB Life*, 69 (2017), 677–688.

Shahriari S., Neves C.M.S.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Role of the Hofmeister series in the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012), 7252–7258.

Shahriari S., Tomé L.C., Araújo J.M.M., Rebelo L.P.N., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M., Freire M.G., Aqueous biphasic systems: a benign route using cholinium-based ionic liquids, *RSC Advances*, 3 (2013), 1835–1843.

Sharma M., Mondal D., Mukesh C., Prasad K., Preparation of tamarind gum based soft ion gels having thixotropic properties, *Carbohydrate Polymers*, 102 (2014), 467–471.

Sheldon R.A., The *E* factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability, *Green Chemistry*, 19 (2017), 18–43.

Silici S., Sagdic O., Ekici L., Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys, *Food Chemistry*, 121 (2010), 238–243.

Siqueira L.J.A., Constantino V.R.L., Camilo F.F., Torresi R.M., Temperini M.L.A., Ribeiro M.C.C., Izumi C.M.S., Probing the local environment of hybrid materials designed from ionic liquids and synthetic clay by Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122 (2014), 469–475.

Sivapragasam M., Moniruzzaman M., Goto M., Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications, *Biotechnology Journal*, 11 (2016), 1000–1013.

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*, 82 (1990), 1107–1112.

Škenderov S., Ivanov C., Pčelinji proizvodi i njihovo korištenje, Nolit, Beograd, (1986).

Spackman D.H., Stein W.H., Moose S., Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, *Analytical Chemistry*, 30 (1958) 1190–1206.

Spiegelun A., Marcinkowski Ł., de la Guardia M., Namieśnik J., Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta*, 119 (2014), 34–45.

Spiegelun A., Marcinkowski Ł., de la Guardia M., Namieśnik J., Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, *Journal of Chromatography A*, 1321 (2013), 1–13.

- Suárez-Luque S., Mato I., Huidobro J.F., Simal-Lozano J., Sancho M.T., Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 955 (2002), 207–214.
- Subbiah B., Blank U.K.M., Morison K.R., A review, analysis and extension of water activity data of sugars and model honey solutions, *Food Chemistry*, 326 (2020), 126981.
- Sun T., Ho C.T., Antiradical efficiency of tea components, *Journal of Food Lipids*, 8 (2001), 231–238.
- Sun Z., Zhao L., Cheng N., Xue X., Wu L., Zheng J., Cao W., Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7 (2017), 317–323.
- Szweda P., Antimicrobial activity of honey, *Honey Analysis 1* (2017), 215–232.
- Taha M., Almeida M.R., Silva F.A.E., Domingues P., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Freire M.G., Novel biocompatible and self-buffering ionic liquids for biopharmaceutical applications, *Chemistry – A European Journal*, 21 (2015a), 4781–4788.
- Taha M., Quental M.V., Correia I., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids, *Process Biochemistry*, 50 (2015b), 1158–1166.
- Talebia M., Talebib M., Farkhondehd T., Samarghandian S., Molecular mechanism-based therapeutic properties of honey, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 130 (2020), 110590.
- Tanner E.E.L., Ibsen K.N., Mitragotri S., Transdermal insulin delivery using choline-based ionic liquids (CAGE), *Journal of Controlled Release*, 286 (2018), 137–144.
- Taylor B.J., *Methods and Procedures for the Verification and Validation of Artificial Neural Networks*, Springer, New York, (2005).
- Terrab A., Díez M.J., Heredia F.J., Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics, *Food Chemistry*, 79 (2002) 373–379.
- Terrab A., Gonzales A.G., Díez M.J., Heredia F.J., Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (2003), 637–643.
- Toh S.L.I., McFarlane J., Tsouris C., DePaoli D.W., Luo H., Dai S., Room temperature ionic liquids in liquid-liquid extraction: Effects of solubility in aqueous solutions on surface properties, *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 24 (2006), 33–56.

- Tomasini D., Sampaio M.R.F., Caldas S.S., Buffon J.G., Duarte F.A., Primel E.G., Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta*, 99 (2012) 380–386.
- Tornuk F., Karaman S., Ozturk I., Toker O.S., Tastemur B., Sagdic O., Dogan M., Kayacier A., Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile, *Industrial Crops and Products*, 46 (2013), 124–131.
- Trautvetter S., Koeling-Speer I., Speer K., Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS, *Apidologie* 40 (2009), 140–150.
- Trelea I.C., Raoult-Wack A.L., Trystram G., Note: Application of neural network modelling for the control of dewatering and impregnation soaking process (osmotic dehydration), *Food Science and Technology International*, 3 (1997), 459–465.
- Trifković J., Andrić F., Ristivojević P., Guzelmeric E., Yesilada E., Analytical methods in tracing honey authenticity, *Journal of AOAC International*, 100 (2017), 827–839.
- Truchado P., Ferreres F., Bortolotti L., Sabatini A.G., Tomás-Barberán F.A., Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudoacacia*) honey, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008), 8815–8824.
- Tuberoso C.I.G., Jerković I., Sarais G., Congiu F., Marijanović Z., Kuš P.M., Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE  $L^*C^*_{ab}H^{\circ}_{ab}$  chromaticity coordinates, *Food Chemistry*, 145 (2014), 284–291.
- Turányi T., Tomlin A.S., *Analysis of Kinetic Reaction Mechanisms*, Springer, Berlin Heidelberg, (2014).
- Ulberth F., Advances in Testing for Adulteration in Honey, In: *Advances in Food Authenticity Testing*, Downey G. (ed.), Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, (2016), 729–753.
- Uršulin-Trstenjak N., Puntarić D., Levanić D., Gvozdić V., Pavlek Ž., Puntarić A., Puntarić E., Puntarić I., Vidosavljević D., Lasić D., Vidosavljević M., Pollen, physicochemical, and mineral analysis of Croatian acacia honey samples: Applicability for identification of botanical and geographical origin, *Journal of Food Quality*, 2017, 1–11.
- Vaikousi H., Koutsoumanis K., Biliaderis C.G., Kinetic modelling of non-enzymatic browning in honey and diluted honey systems subjected to isothermal and dynamic heating protocols, *Journal of Food Engineering*, 95 (2009), 541–550.

Vanhanen L.P., Emmertz A., Savage G.P., Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey, *Food Chemistry*, 128 (2011), 236–240.

Vasić V., Gašić U., Stanković D., Lušić D., Vukić-Lušić D., Milojković-Opsenica D., Tešić Ž., Trifković J., Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity, *Food Chemistry*, 274 (2019), 629–641.

Ventura S.P.M., de Silva F.A., Gonçalves A.M., Pereira J.L., Gonçalves F., Coutinho J.A.P., Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102 (2014), 48–54.

Ventura S.P.M., Sousa S.G., Serafim L.S., Lima A.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Ionic liquid based aqueous biphasic systems with controlled pH: the ionic liquid cation effect, *Journal of Chemical Engineering Data*, 56 (2011), 4253–4260.

Von der Ohe W., Persano Oddo L., Piana M.L., Morlot M., Martin P., Harmonized methods of melissopalynology, *Apidologie*, 35 (2004), 18–25.

Vorlova L., Pridal A., Invertase and diastase activity in honeys of Czech provenience, *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 5 (2002), 57–66.

Vraneš M., Tot A., Papović S., Panić J., Gadžurić S., Is choline kosmotrope or chaotrope?, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 124 (2018), 65–73.

Waheed M., Hussain M.B., Javed A., Mushtaq Z., Hassan S., Shariati M.A., Khan M.U., Majeed M., Nigam M., Mishra A.P., Heydari M., Honey and cancer: A mechanistic review, *Clinical Nutrition*, 38 (2019), 2499–2503.

Wang H., Qian H., Yao W., Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity, *Food Chemistry*, 128 (2001), 573–584.

Wang L., Wang Y., Qin Y., Lui B., Zhou Y., Extraction and determination of protein from edible oil using aqueous biphasic systems of ionic liquids and salts, *Food and Bioprocess Technology*, 15 (2022), 190–202.

Wang S., Guo Q., Wang L., Lin L., Shi H., Cao H., Cao B., Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 172 (2015), 669–674.

Wang Y., Juliani R., Simon J.E., Ho C., Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction, *Food Chemistry*, 115 (2009), 233–237.

Weaver K.D., Kim H.J., Sun J., MacFarlane D.R., Elliott G.D., Cyto-toxicity and biocompatibility of a family of choline phosphate ionic liquids designed for pharmaceutical applications, *Green Chemistry*, 12 (2010), 507–513.

- Welton T., Ionic liquids in catalysis, *Coordination Chemistry Reviews*, 248 (2004), 2459–2477.
- Wilczyńska A., Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey, *LWT-Food Science and Technology*, 57 (2014), 767–774.
- Windsor S., Kavazos K., Brooks P., The quantitation of hydroxymethylfurfural in Australian *Leptospermum* honeys, *Food Chemistry*, 5 (2013), 21–25.
- Winther-Jensen O., Vijayaraghavan R., Sun J., Winther-Jensen B., MacFarlane D.R., Self polymerising ionic liquid gel, *Chemical Communications*, 21 (2009), 3041–3043.
- Won S.A., Li C., Kim J., Rhee H., Immunological characterization of honey major protein and its application, *Food Chemistry*, 113 (2009), 1334–1338.
- Wu X., Zhang H., He S., Yu Q., Lu Y., Wu W., Ding N., Zhu Q., Chen Z., Ma Y., Qi J., Improving dermal delivery of hyaluronic acid by ionic liquids for attenuating skin dehydration, *International Journal of Biological Macromolecules*, 150 (2020), 528–535.
- Yayinie M., Atlabachew M., Tesfaye A., Hilluf W., Reta C., Alemneh T., Polyphenols, flavonoids, and antioxidant content of honey coupled with chemometric method: geographical origin classification from Amhara region, Ethiopia, *International Journal of Food Properties*, 25 (2022), 76–92.
- Yilmaz E., Soylak M., Latest trends, green aspects, and innovations in liquid-phase-based microextraction techniques: a review, *Turkish Journal of Chemistry*, 40 (2016), 868–893.
- Yu G., Zhao D., Wen L., Yang S., Chen X., Viscosity of ionic liquids: Database, observation, and quantitative structure-property relationship analysis, *AIChE Journal*, 58 (2012), 2885–2899.
- Yuan J., Antonietti M., Poly(ionic liquid)s: Polymers expanding classical property profiles, *Polymer*, 52 (2011), 1469–1482.
- Yücel Y., Sultanoglu P., Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics, *Food Bioscience*, 1 (2013), 16–25.
- Zafarani-Moattar M.T., Hamzehzadeh S., Effect of pH on the phase separation in the ternary aqueous system containing the hydrophilic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the kosmotropic salt potassium citrate at  $T = 298.15$  K, *Fluid Phase Equilibria*, 304 (2011), 110–120.
- Zafarani-Moattar M.T., Hamzehzadeh S., Phase diagrams for the aqueous two-phase ternary system containing the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and tri-potassium citrate at  $T = (278.15, 298.15, \text{ and } 318.15)$  K, *Journal of Chemical Engineering Data*, 54 (2009), 833–841.

Zamora M.C., Chirife J., Determination of water activity change due to crystallization in honey from Argentina, *Food Control*, 17 (2006), 59–64.

Zeisel S., Choline, other methyl-donors and epigenetics, *Nutrients*, 9 (2017), 445.

Zeisel S.H., da Costa K.-A., Choline: an essential nutrient for public health, *Nutrition Reviews*, 67 (2009), 615–623.

Zhang Q., Benoit M., De Oliveira Vigier K., Barrault J., Jérôme F., Green and inexpensive choline-derived solvents for cellulose decrystallization, *Chemistry – A European Journal*, 18 (2012), 1043–1046.

Zhang S., Sun J., Zhang X., Xin J., Miao Q., Wang J., Ionic liquid-based green processes for energy production, *Chemical Society Reviews*, 43 (2014), 7838–7869.

Zhao H., Cheng N., Zhang Y., Sun Z., Zhou W., Wang Y., Cao W., The effects of different thermal treatments on amino acid contents and chemometric-based identification of overheated honey, *LWT-Food Science and Technology*, 96 (2018), 133–139.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64 (1999), 555–559.



# **7. PRILOG**

**Tabela P1.** Korelaciona matrica posmatranih promenljivih

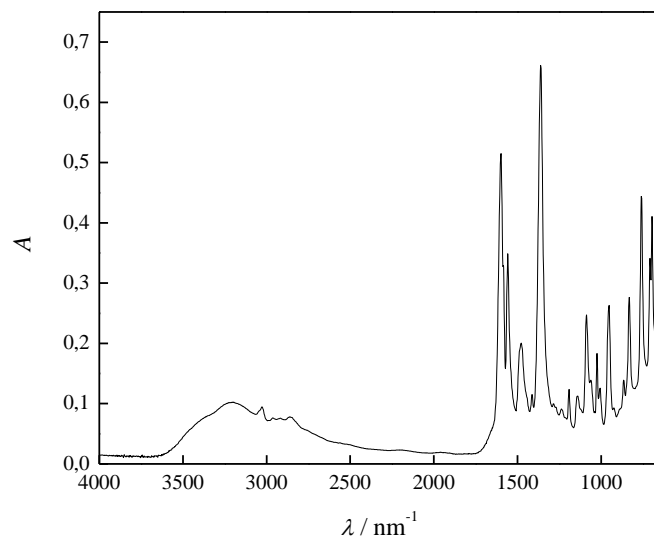
	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	
V1	-0,025	-0,183	-0,199**	-0,462 <sup>+</sup>	-0,289*	0,187	0,373 <sup>+</sup>	0,181	-0,029	-0,152	-0,014	0,087	-0,179	-0,011	-0,279*	-0,452 <sup>+</sup>	-0,386 <sup>+</sup>	0,451 <sup>+</sup>	0,310*	0,477 <sup>+</sup>	
V2	0,669 <sup>+</sup>	0,707 <sup>+</sup>	0,786 <sup>+</sup>	0,177	-0,475 <sup>+</sup>	0,657 <sup>+</sup>	-0,606 <sup>+</sup>	0,636 <sup>+</sup>	0,697 <sup>+</sup>	-0,489 <sup>+</sup>	-0,094	-0,175	-0,498 <sup>+</sup>	-0,471 <sup>+</sup>	-0,412 <sup>+</sup>	0,058	-0,229**	-0,496 <sup>+</sup>	0,443 <sup>+</sup>	0,085	
V3		0,711 <sup>+</sup>	0,752 <sup>+</sup>	0,265*	-0,460 <sup>+</sup>	0,629 <sup>+</sup>	-0,518 <sup>+</sup>	0,413 <sup>+</sup>	0,592 <sup>+</sup>	-0,416 <sup>+</sup>	-0,149	-0,090	-0,422 <sup>+</sup>	-0,446 <sup>+</sup>	-0,406 <sup>+</sup>	0,090	-0,154	-0,536 <sup>+</sup>	0,380 <sup>+</sup>	0,015	
V4			0,714 <sup>+</sup>	0,352 <sup>+</sup>	-0,319*	0,518 <sup>+</sup>	-0,453 <sup>+</sup>	0,292*	0,495 <sup>+</sup>	-0,437 <sup>+</sup>	-0,211**	-0,200**	-0,341**	-0,528 <sup>+</sup>	-0,382 <sup>+</sup>	0,068	-0,043	-0,699 <sup>+</sup>	0,359 <sup>+</sup>	-0,086	
V5				0,508 <sup>+</sup>	-0,386 <sup>+</sup>	0,551 <sup>+</sup>	-0,831 <sup>+</sup>	0,496 <sup>+</sup>	0,740 <sup>+</sup>	-0,316*	-0,002	-0,224**	-0,364 <sup>+</sup>	-0,322*	-0,194	0,393 <sup>+</sup>	-0,032	-0,778 <sup>+</sup>	0,193	-0,256**	
V6					0,100	0,015	-0,634 <sup>+</sup>	-0,112	0,235**	0,193	0,095	-0,132	0,188	-0,122	0,146	0,618 <sup>+</sup>	0,549 <sup>+</sup>	-0,803 <sup>+</sup>	-0,346 <sup>+</sup>	-0,689 <sup>+</sup>	
V7						-0,691 <sup>+</sup>	0,221**	-0,715 <sup>+</sup>	-0,571 <sup>+</sup>	0,457 <sup>+</sup>	0,095	0,007	0,616 <sup>+</sup>	0,347 <sup>+</sup>	0,602 <sup>+</sup>	0,282*	0,425 <sup>+</sup>	-0,106	-0,590 <sup>+</sup>	-0,514 <sup>+</sup>	
V8							-0,369 <sup>+</sup>	0,824 <sup>+</sup>	0,743 <sup>+</sup>	-0,604 <sup>+</sup>	-0,073	-0,088	-0,632 <sup>+</sup>	-0,541 <sup>+</sup>	-0,690 <sup>+</sup>	-0,219**	-0,442 <sup>+</sup>	-0,188	0,666 <sup>+</sup>	0,419 <sup>+</sup>	
V9								-0,430 <sup>+</sup>	-0,675 <sup>+</sup>	0,053	-0,143	0,199**	0,213**	0,142	-0,026	-0,635 <sup>+</sup>	-0,107	0,742 <sup>+</sup>	0,064	0,437 <sup>+</sup>	
V10									0,744 <sup>+</sup>	-0,529 <sup>+</sup>	0,063	-0,037	-0,650 <sup>+</sup>	-0,386 <sup>+</sup>	-0,588 <sup>+</sup>	-0,176	-0,555 <sup>+</sup>	-0,028	0,616 <sup>+</sup>	0,464 <sup>+</sup>	
V11										-0,409 <sup>+</sup>	0,018	-0,087	-0,471 <sup>+</sup>	-0,338*	-0,374 <sup>+</sup>	0,111	-0,319*	-0,397 <sup>+</sup>	0,391 <sup>+</sup>	0,096	
V12											0,078	0,305*	0,687 <sup>+</sup>	0,629 <sup>+</sup>	0,642 <sup>+</sup>	0,517 <sup>+</sup>	0,587 <sup>+</sup>	0,032	-0,869 <sup>+</sup>	-0,658 <sup>+</sup>	
V13												-0,538 <sup>+</sup>	0,056	0,157	0,228**	0,180	-0,057	0,005	-0,171	-0,130	
V14													0,145	0,250**	0,006	-0,032	0,097	0,216**	-0,169	-0,018	
V15														0,456 <sup>+</sup>	0,698 <sup>+</sup>	0,380 <sup>+</sup>	0,641 <sup>+</sup>	-0,011	-0,843 <sup>+</sup>	-0,660 <sup>+</sup>	
V16															0,699 <sup>+</sup>	0,398 <sup>+</sup>	0,221**	0,244**	-0,682 <sup>+</sup>	-0,402 <sup>+</sup>	
V17																0,535 <sup>+</sup>	0,392 <sup>+</sup>	-0,062	-0,835 <sup>+</sup>	-0,681 <sup>+</sup>	
V18																	0,626 <sup>+</sup>	-0,578 <sup>+</sup>	-0,716 <sup>+</sup>	-0,859 <sup>+</sup>	
V19																		-0,352 <sup>+</sup>	-0,749 <sup>+</sup>	-0,765 <sup>+</sup>	
V20																				0,152	0,641 <sup>+</sup>
V21																					0,856 <sup>+</sup>

+Korelacija je statistički značajna na nivou  $p < 0,001$ ; \*korelacija je statistički značajna na nivou  $p < 0,01$ ; \*\*korelacija je statistički značajna na nivou  $p < 0,05$

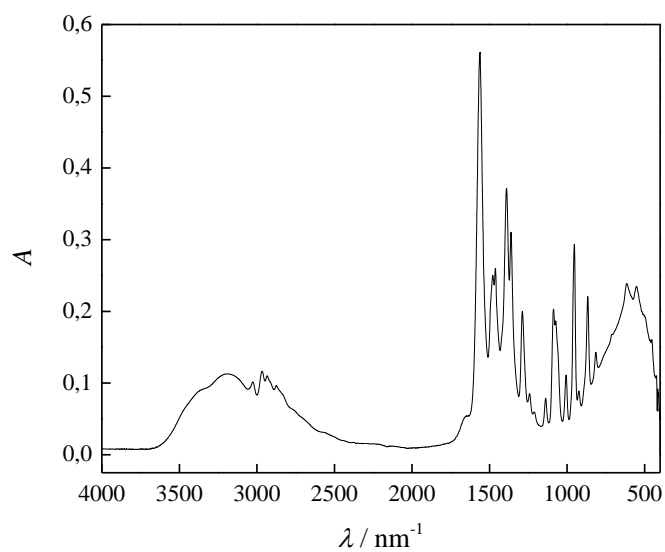
Skraćenice: **V1** – pH; **V2** – Kiselost; **V3** – Provodljivost; **V4** – Polifenoli; **V5** – Flavonoidi; **V6** – Karotenoidi; **V7** – DPPH; **V8** – Ukupni minerali; **V9** – *L\**; **V10** – *a\**; **V11** – *b\**; **V12** – MIC% protiv *Bacillus subtilis* ATCC 6633; **V13** – MIC% protiv *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; **V14** – MIC% protiv *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; **V15** – MIC% protiv *Staphylococcus aureus*; **V16** – MIC% protiv *Escherichia coli* ATCC 11229; **V17** – MIC% protiv *Escherichia coli* I; **V18** – MIC% protiv *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35554; **V19** – MIC% protiv *Proteus mirabilis* I; **V20** – RACI; **V21** – RAI; **V22** – Moć meda

**Tabela P2.** Eksperimentalne vrednosti masenih udela za sistem {JT (Y) + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (X) + 20 % v/v rastvora meda} na temperaturi 23 ± 1 °C i pritisku 0,1 MPa

[Ch][Cl]		[Ch][Prop]		[Ch][Nic]		[Ch][But]	
100Y	100X	100Y	100X	100Y	100X	100Y	100X
64,41	4,07	59,90	5,86	47,10	12,09	61,90	5,04
41,86	9,31	43,13	7,60	42,71	13,78	39,25	9,90
36,12	13,52	34,65	10,49	38,00	16,28	36,54	11,47
29,49	18,54	26,05	18,19	33,34	19,38	33,35	13,63
22,79	24,73	20,77	23,14	30,86	20,94	31,34	15,04
20,58	26,87	15,68	28,51	27,65	23,19	29,88	16,07
18,47	28,90	12,33	32,25	24,79	25,17	28,03	17,79
15,08	32,69	10,21	34,66	23,21	26,40	26,36	19,11
12,83	35,12	8,50	36,84	21,90	27,14	24,95	20,30
10,73	37,50	7,13	38,71	19,93	28,70	23,65	21,40
7,98	41,42	6,16	40,23	19,13	29,25	21,32	23,42
		5,12	42,08	17,41	30,52	19,27	25,41
		4,28	43,64	15,63	32,00	18,07	26,82
				14,43	32,88	16,96	27,88
				13,16	34,01	16,09	28,56
				12,17	34,88	15,19	29,43
				11,14	35,81	14,44	30,32
				10,35	36,56	13,75	30,99
				9,42	37,47	13,23	31,54
				8,73	38,21	12,62	32,17
						12,03	32,75
						11,64	33,19
						11,26	33,58
						10,91	33,88
						10,44	34,42
						10,07	34,82
						9,75	35,19
						9,41	35,57
						8,97	36,12
						8,38	36,84
						7,79	37,70

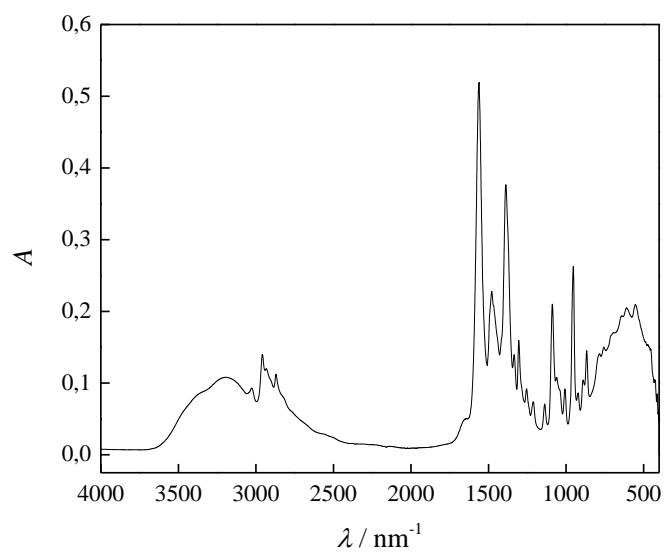
**Slika P1a–c.** Infracrveni spektri sintetisanih jonskih tečnosti**Slika P1a.** Infracrveni spektar [Ch][Nic]

3201 (istezanje OH grupe); 1598 (istezanje C=C); 1558 (asimetrično istezanje NH); 1478 (CH<sub>3</sub> "cik-cak" vibracija); 1361 (simetrično istezanje C=O iz COO<sup>-</sup>); 1192 (istezanje C-OH); 1088 (istezanje C-C-N); 953 (asimetrično istezanje C-C-O); 832 (C-C istezanje); 759, 708 i 696 (C-H savijanje van ravni)



**Slika P1b.** Infracrveni spektar [Ch][Prop]

3190 (istezanje OH grupe); 2966 (simetrično istezanje N-CH<sub>3</sub>); 1560 (asimetrično istezanje NH); 1462 (CH<sub>3</sub> "cik-cak" vibracija); 1390 (simetrično istezanje COO<sup>-</sup>); 1361 (simetrično istezanje C=O iz COO<sup>-</sup>); 1288 (istezanje C-O); 1087 (istezanje C-C-N); 953 (asimetrično istezanje C-C-O); 866 (C-C istezanje); 614 (N-CH<sub>3</sub> istezanje)



**Slika P1c.** Infracrveni spektar [Ch][But]

3192 (istezanje OH grupe); 2958 (simetrično istezanje N-CH<sub>3</sub>); 1560 (asimetrično istezanje NH); 1479 (CH<sub>3</sub> "cik-cak" vibracija); 1388 (simetrično istezanje COO<sup>-</sup>); 1334 (simetrično istezanje C=O iz COO<sup>-</sup>); 1305 (istezanje C-O); 1088 (istezanje C-C-N); 953 (asimetrično istezanje C-C-O); 867 (C-C istezanje); 553 (N-CH<sub>3</sub> istezanje)

## BIOGRAFIJA



Aleksandar Marić rođen je 09.04.1992. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu „Svetozar Marković-Toza“, kao i prirodno-matematički smer gimnazije „Jovan Jovanović Zmaj“ završio je u Novom Sadu. Osnovne akademske studije biohemije završio je 2015. godine sa prosečnom ocenom 8,84, a zatim 2016, sa prosečnom ocenom 9,76, stekao zvanje master hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu.

Nakon završenih master studija, 2016. godine, upisao je doktorske akademske studije hemije. U zvanje istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Analitička hemija izabran je 2017. godine. Od 2017. godine, angažovan je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zaposlen je na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu, u zvanju istraživač-saradnik. U periodu februar 2019–maj 2019. boravio je u Portugalu u sklopu programa ERASMUS + na Univerzitetu u Aveiru, Aveiro, Portugal. Pored naučnoistraživačkih aktivnosti, angažovan je u aktivnostima Laboratorije za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane (FINSLab). Bio je učesnik međunarodnog projekta Interreg IPA CBC Mađarska-Srbija pod akronimom POPEYE od 2020–2022. godine. Učesnik je dugoročnog APV projekta u periodu od 2022–2026. godine. Oblast naučnog istraživanja kojim se bavi je hemija hrane, sa akcentom na hromatografske, spektrofotometrijske i zelene ekstrakcione metode, kao i metode za procenu kvaliteta i bezbednosti meda.

Autor je i koautor 7 naučnih radova objavljenih u istaknutim međunarodnim časopisima sa SCI liste (3 x M21a; 2 x M21; 1 x M22; 1 x M23), od kojih su 2 rada kategorije M21a i 1 rad kategorije M22 proizašli iz istraživanja vezanih za temu ove doktorske disertacije. Koautor je i 32 naučna saopštenja od kojih su 19 referisana na međunarodnim naučnim skupovima M33 (1) i M34 (18), a 13 na nacionalnim naučnim skupovima M64.

## BIBLIOGRAFIJA NAUČNIH RADOVA

### Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti M21a:

1. Jovanov, P., Vraneš, M., Sakač, M., Gadžurić, S., Panić, J., **Marić, A.**, Ostojić, S. (2018). Hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry as a method for simultaneous determination of guanidinoacetate and creatine. *Analytica Chimica Acta*, 1028, 96–103. doi: 10.1016/j.aca2018.03.038
2. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Pezo, L., Kevrešan, Ž., Novaković, A., Nedeljković, N. (2019). Physicochemical properties and mineral content of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia). *Food Chemistry*, 276, 15–21. doi: 10.1016/j.food.chem.2018.09.149
3. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Četojević-Simin, D., Novaković, A., Plavšić, D., Škrobot, D., Kovač, R. (2022). Antioxidative, antibacterial and antiproliferative properties of honey types from the Western Balkans. *Antioxidants*, 11, 1120. doi: 10.3390/antiox11061120

### Radovi objavljeni u vrhunskom međunarodnom časopisu M21:

1. Jovanov, P., Đorđić, V., Obradović, B., Barak, O., Pezo, L., **Marić, A.**, Sakač, M. (2019). Prevalence, knowledge and attitudes towards using sports supplements among young athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 16, 27. doi: 10.1186/s12970-019-0294-7
2. Jovanov, P., Sakač, M., Jurdana, M., Pražnikar, Z.J., Kenig, S., Hadnađev, M., Jakus, T., Petelin, A., Škrobot, D., **Marić, A.** (2021). High-protein bar as a meal replacement in elite sports nutrition: A pilot study. *Foods*, 10, 2628. doi:10.3390/foods10112628

### Radovi objavljeni u istaknutom međunarodnom časopisu M22:

1. **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Novaković, A., Hadnađev, M., Pezo, L., Mandić, A., Milićević, N., Đurović, A., Gadžurić, S. (2021). A comprehensive study of parameters correlated with honey health benefits. *RSC Advances*, 11, 12434–12441. doi: 10.1039/D0RA10887A

### Radovi objavljeni u međunarodnom časopisu M23:

1. Milićević, N., Sakač, M., Šarić, B., Škrobot, D., Filipčev, B., Šimurina, O., Jovanov, P., Pestorić, M., **Marić, A.** (2022). Soybean bran as the fat replacer in gluten-free cookie formulation: Physicochemical properties and sensory profiles. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. doi:10.2298/CICEQ211222025M



**Radovi objavljeni u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja M24:**

1. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Tomičić, Z., Pezo, L., Dapčević Hadnađev, T., Novaković, A. (2019). Free amino acid profiles of honey samples from Vojvodina (Republic of Serbia). *Food and Feed Research*, 46, 179–188.  
doi: 10.5937/FFR1902179S

**Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini M33:**

1. **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A., Milićević, N., Kos, J., Novaković, A. (2018). Mineral content and colour of honey from Autonomous Province of Vojvodina. IV International Congress *Food Technology, Quality and Safety*, Novi Sad, 23–25 October, 2018, 328–332.

**Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu M34:**

1. Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A., Gadžurić, S., Pestorić, M., Škrobot, D., **Marić, A.**, Nedeljković, N. (2016). High-performance liquid chromatographic determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. 3<sup>rd</sup> International Congress *Food Technology, Quality and Safety* and 17<sup>th</sup> International Symposium Feed Technology – FoodTech2016, Novi Sad, Serbia, 25–27 October, 2016, 223.
2. Sakač, M., Jovanov, P., Petrović, J., Pajin, B., Lončarević, I., Pezo, L., **Marić, A.** (2018). Defatted wheat germ as a substitute in cookie formulation. 4<sup>th</sup> International Congress *Food Technology, Quality and Safety* and 18<sup>th</sup> International Symposium Feed Technology – FoodTech2018, Novi Sad, Serbia, 23–25 October, 2018, 96.
3. Jovanov, P., Sakač, M., Barak, O., Novaković, A., Milićević, N., Kos, J., **Marić, A.** (2018). Dietary and supplement intake of elite canoe sprinters during European championship. 4<sup>th</sup> International Congress *Food Technology, Quality and Safety* and 18<sup>th</sup> International Symposium Feed Technology – FoodTech2018, Novi Sad, Serbia, 23–25 October, 2018, 109–110.
4. **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Gadžurić, S., Mandić, A., Jevtić Mučibabić, R., Lazarević, J. (2018). HMF screening of honey from Autonomous Province of Vojvodina. 4<sup>th</sup> International Congress *Food Technology, Quality and Safety* and 18<sup>th</sup> International Symposium Feed Technology – FoodTech2018, Novi Sad, Serbia, 23–25 October, 2018, 120.
5. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Pezo, L., Kevrešan, Ž., Ilić, N., Novaković, A. (2018). Honey from Autonomous Province of Vojvodina. 4<sup>th</sup> International Congress *Food Technology, Quality and Safety* and 18<sup>th</sup> International Symposium Feed Technology – FoodTech2018, Novi Sad, Serbia, 23–25 October, 2018, 156.

6. Milićević, N., Sakač, M., Hadnađev, M., Dapčević Hadnađev, T., Šarić, B., Jovanov, P., **Marić, A.** (2018). Oat bran gels as fat replacer: optimization using response surface methodology. 4<sup>th</sup> International Congress *Food Technology, Quality and Safety* and 18<sup>th</sup> International Symposium Feed Technology – FoodTech2018, Novi Sad, Serbia, 23–25 October, 2018, 191.
7. Sakač, M., Jovanov, P., Gadžurić, S., **Marić, A.**, Hadnađev, M., Dapčević Hadnađev, T., Novaković, A. (2019). HMF screening in honey. 22<sup>nd</sup> Euro-Global Summit on Food and Beverages, London, United Kingdom, 28 February–01 March, 2019, published in: *Journal of Food Processing and Technology*, 10, 42, 2019. doi: 10.4172/2157-7110-C1-111
8. Jovanov, P., Obradović, B., Barak, O., Mandić, A., Milićević, N., **Marić, A.**, Sakač, M. (2019). Sport nutrition uptake of elite canoe sprinters during international competitions. 22<sup>nd</sup> Euro-Global Summit on Food and Beverages, London, United Kingdom, 28 February–01 March, 2019, published in: *Journal of Food Processing and Technology*, 10, 43, 2019. doi: 10.4172/2157-7110-C1-111
9. Novaković, A., Karaman, M., Beribaka, M., **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Ilić, N. (2019). Hydroxyl radical scavenging activity versus total phenol content of autochthonous fungal species *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer and *Lactarius contraversus* (Pers. ex Fr.). 6<sup>th</sup> International Congress *Engineering, Environment and Materials in Processing Industry*, Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, 11–13 March, 2019, 739.
10. Kopilović, B., Capela, E.V, **Marić, A.**, Coutinho, J.A.P., Gadžurić, S., Freire, M.G. (2019). Thermoreversible aqueous biphasic systems composed of protic ionic liquids for biotechnological applications. 4<sup>th</sup> Meeting of Medicinal Biotechnology, Porto, Portugal, 17 May, 2019, 9.
11. Škrobot, D., Tomić, J., Pestorić, M., Delić, J., **Marić, A.**, Rašić, S., Mandra, M. (2020). Sensory profiles and consumer preferences of Serbian honeys of different botanical origin. 9<sup>th</sup> European Conference on Sensory and Consumer Research (online) – EUROSENSE 2020, Rotterdam, The Netherlands, 13–16 December, 2020, P1.049.
12. **Marić, A.**, Jovanov, P., Gadžurić, S., Sakač, M., Trtić-Petrović, T., Radović, R., Maravić, N. (2021). Extractions with green solvents based on ionic liquids. 7<sup>th</sup> International Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies* – INOPTP 2021 and 33<sup>rd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2021, Vršac, Serbia, 18–23 April, 2021, 70–71.
13. Jovanov, P., Sakač, M., Jurdana, M., Jenko Pražnikar, Z., Jakus, T., Petelin, A., **Marić, A.** (2021). Effects of high-protein bar consumption on elite athletes. 7<sup>th</sup> International

Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies* – INOPTeP 2021 and 33<sup>rd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2021, Vršac, Serbia, 18–23 April, 2021, 42–43.

14. Sakač, M., Jovanov, P., Hadnađev, M., **Marić, A.**, Škrobot, D., Dapčević-Hadnađev, T., Milićević, N. (2021). High-protein bars production. 7<sup>th</sup> International Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies* – INOPTeP 2021 and 33<sup>rd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2021, Vršac, Serbia, 18–23 April, 2021, 113–114.
15. Milićević, N., Hadnađev, M., Šarić, B., Dapčević-Hadnađev, T., Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.** (2021). The influence of bran gels as fat replacers on instrumental properties of cookies. 7<sup>th</sup> International Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies* – INOPTeP 2021 and 33<sup>rd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2021, Vršac, Serbia, 18–23 April, 2021, 78–79.
16. Škrobot, D., Tomić, J., Maravić, N., Rašić, S., Novaković, A., **Marić, A.**, Sakač, M. (2021). Studing uniqueness of acacia honey from Serbia – Evaluation of sensory properties, colour and texture. XII International Scientific Agriculture Symposium – AGROSYM 2021, Jahorina, Bosnia and Hercegovina, 07–10 October, 2021, 721.
17. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Četojević-Simin, D., Novaković, A., Plavšić, D., Škrobot, D. (2022). Antiproliferative properties of honey from Serbia, Kosovo and Bosnia and Herzegovina. XI International Conference on Social and Technological Development – STED 2022, Trebinje, Bosnia and Herzegovina, 02–05 June, 2022, 120.
18. Ikonić, P., Peulić, T., Novaković, A., Lazarević, J., Delić, J., Maravić, N., **Marić, A.** (2022). Certification mark TAS(Q) as a distinctive sign of high quality traditional food products. 2<sup>nd</sup> International Conference on Advanced Production and Processing – ICAPP 2022, Novi Sad, Serbia, 20–22 October, 2022, 78.

#### Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu M64

1. **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A., Ilić, N., Hadnađev, M., Dapčević Hadnađev, T. (2018). Kvalitet meda sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine. 30. Nacionalna konferencija sa međunarodnim učešćem *Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi* – PTEP 2018, Brzeće, Srbija, 15–20 april, 2018, 66–67.
2. Sakač, M., Jovanov, P., Petrović, J., Pezo, L., Fišteš, A., **Marić, A.**, Lončarević, I., Pajin, B. (2018). Keks obogaćen obezmašćenom pšeničnom klicom. 30. Nacionalna konferencija sa međunarodnim učešćem *Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi* – PTEP 2018, Brzeće, Srbija, 15–20 april, 2018, 98–99.

3. Sakač, M., Mandić, A., Jovanov, P., Nedeljković, N., Pezo, L., **Marić, A.**, Kos, J. (2018). Koliki je rok trajanja keksa? 30. Nacionalna konferencija sa međunarodnim učešćem *Procesna tehnika i energetika u poljoprivredi* – PTEP 2018, Brzeće, Srbija, 15–20 april, 2018, 100–101.
4. Jovanov, P., Sakač, M., Barak, O., Mandić, A., Đuragić, O., Nedeljković, N., **Marić, A.** (2018). Ishrana i suplementacija vrhunskih kajakaša. 6. Kongres medicine sporta i 3. Kongres prevencije dopinga u sportu, Beograd, Srbija, 10–11 maj, 2018, 12–14.
5. Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A., Dapčević Hadnađev, T., Škrobot, D., Tomičić, Z., **Marić, A.** (2019). Proline as a marker of honey botanical origin. 6<sup>th</sup> International Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies* – INOPTTEP 2019 and 31<sup>st</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2019, Kladovo, Serbia, 07–12 April, 2019, 82–83.
6. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Pezo, L., Hadnađev, M., Milićević, N., Novaković, A. (2019). HMF as the marker of honey quality. 6<sup>th</sup> International Conference *Sustainable Postharvest and Food Technologies* – INOPTTEP 2019 and 31<sup>st</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2019, Kladovo, Serbia, 07–12 April, 2019, 167–168.
7. Škrobot, D., Jovanov, P., **Marić, A.**, Sakač, M., Novaković, A., Mandić, A., Bajić, A. (2019). Analiza kvaliteta meda sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine/Quality analysis of honey from Autonomous Province of Vojvodina. 4. Kongres o pčelarstvu i pčelinjim proizvodima. Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 16–17 novembar, 2019.
8. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Tomičić, Z., Dapčević-Hadnađev, T., Jevtić-Mučibabić, R., Milićević, N. (2020). Sadržaj slobodnih aminokiselina uzoraka meda sa teritorije Vojvodine. 32<sup>nd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2020, Krupanj, Srbija, 30 avgust–04 septembar, 2020.
9. Jovanov, P., **Marić, A.**, Sakač, M., Novaković, A., Pezo, L., Hadnađev, M., Škrobot, D. (2020). Mogućnost predviđanja terapijskih svojstava meda-moć meda. 32<sup>nd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2020, Krupanj, Srbija, 30 avgust–04 septembar, 2020.
10. **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Hadnađev, M., Šarić, B., Kos, J., Šarić, LJ. (2020). Reološke karakteristike uzoraka meda. 32<sup>nd</sup> National Conference *Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2020, Krupanj, Srbija, 30 avgust–04 septembar, 2020.
11. **Marić, A.**, Jovanov, P., Sakač, M., Novaković, A., Maravić, N., Radović, R., Ikonić, P. (2022). Procena kvaliteta meda sa područja Rtanjskih planina. 34<sup>th</sup> National Conference

*Processing and Energy in Agriculture* – PTEP 2022, Soko Banja, Srbija, 03–08 April, 2022.

12. Maravić, N., Škrobot, D., Sakač, M., Tomić, J., **Marić, A.**, Peulić, T., Novaković, A. (2022). Poređenje senzorne i instrumentalne metode određivanja boje meda. 34th National Conference Processing and Energy in Agriculture – PTEP 2022, Soko Banja, Srbija, 03–08 April, 2022.
13. Sakač, M., Jovanov, P., **Marić, A.**, Novaković, A., Plavšić, D., Škrobot, D. (2022). Antioksidativna i antibakterijska svojstva meda sa teritorije Srbije, Kosova i Bosne i Hercegovine. 34th National Conference Processing and Energy in Agriculture – PTEP 2022, Soko Banja, Srbija, 03–08 April, 2022.

## План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Процена квалитета меда и екстракција хидроксиетилфурфурала из меда јонским течностима
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
<p>а) Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду</p> <p>б) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>в) Институт за нуклеарне науке Винча, Универзитет у Београду</p> <p>г) Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица</p> <p>д) Институт CICECO – Aveiro Institute of Materials, Универзитет у Авеиру, Португал</p>
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
<p>Докторске академске студије хемије на Природно-математичком факултету, Универзитет у Новом Саду.</p> <p>Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом део су пројекта под називом <i>Функционални производи на бази жита намењени особама са метаболичким поремећајима</i> (TR 31029) финансираног од стране Министарства науке, просвете и технолошког развоја Републике Србије у периоду до 2019. године. Од 2020. године истраживање је настављено у оквиру пројекта број 451-03-68/2020-14/200222 истог Министарства.</p>
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p><u>Докторска дисертација; експериментална студија</u></p>
<p>1.2 Врсте података</p> <p><input checked="" type="radio"/> квантитативни</p> <p><input type="radio"/> квалитативни</p>
<p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p>

- в) генотипови: навести врсту \_\_\_\_\_
- г) административни подаци: навести врсту \_\_\_\_\_
- д) узорци ткива: навести врсту: HeLa ћелијска линија хуманог карцинома грлића материце; MCF7 ћелијска линија хуманог аденокарцинома дојке; HT-29 ћелијска линија хуманог колоректалног аденокарцинома; MRC-5 ћелијска линија фибробласта плућа
- ђ) снимци, фотографије: навести врсту \_\_\_\_\_
- е) текст, навести врсту преглед литературе
- ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_
- з) остало: описати лабораторијски експерименти и мерења

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека .xlsx
- б) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_
- в) PDF фајл, датотека .pdf
- г) Текст фајл, датотека .doc
- д) JPG фајл, датотека .jpeg .tiff
- е) Остало, датотека \_\_\_\_\_

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли велики број
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

#### 1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је дефинисан примењеним методама

б) варијабле које се више пута мере односе се на испитиване карактеристике анализираних узорака и једињења

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, анализа физичко-хемијских карактеристика, антиоксидативни капацитет, антибактеријска активност, антипролиферативна активност, екстракција хидроксиметилфурфурала

б) корелационо истраживање: регресиона и мултиваријантна анализа прикупљених експерименталних података

ц) анализа текста: прикупљање података из литературе

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

\_\_\_\_\_

HPLC-DAD, UV-Vis спектрофотометар, атомски апсорпциони спектрофотометар, атомски анализатор аминокиселина

### 2.2 Квалитет података и стандарди



## 2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да  Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да  Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

\_\_\_\_\_

## 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичком обрадом добијених резултата и поређењем експерименталних и теоријских података.

## 2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса податка у матрицу изведена је прегледом протокола експерименталног рада и филтрирањем података у Excel фајовима, као и поређењем са подацима из научне литературе.

### 3. Третман података и пратећа документација

## 3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани: Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја о њиховој оцени на Универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијум докторских дисертација Универзитета у Новом Саду (CRIS).

3.1.2. URL адреса \_\_\_\_\_

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да

Образложити

---

---

#### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

##### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

---

---

#### 5. Доступност података

### 5.1. Подаци ће бити

a) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---

---

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

---

---

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде.

## 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Александар Марић (aleksandar.maric@fins.uns.ac.rs)

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Александар Марић (aleksandar.maric@fins.uns.ac.rs)

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Александар Марић (aleksandar.maric@fins.uns.ac.rs)