



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Đurović Saša, master hemičar

**Savremene metode ekstrakcije koprive (*Urtica dioica* L.),
sastav i primena ekstrakata**

-Doktorska disertacija-

Mentor: prof. dr Zoran Zeković

Novi Sad, 2018.

Ovu doktorsku disertaciju bih želeo da posvetim svojoj porodici, baki Sofiji, dedi Dušanu, majci Dušanki, ujaku Zoranu, očuhu Miletu, sestri Nađi i verenici Violeti bez čije podrške i pomoći njena izrada ne bi bila moguća.

Doktorska disertacija je rađena u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Enološke stanice u Vršcu, Instituta za opštu i fiziku hemiju u Beogradu, Hemijskog fakulteta u Beogradu, SP laboratorije u Bečeju, Agronomskog fakulteta u Čačku, Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Beogradu i Tehnološkog fakulteta u Leskovcu. Želeo bih da se ovom prilikom zahvalim svim saradnicima sa pomenutih institucija na pomoći koju su mi pružili tokom izrade ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem mr Saši Popovu i mast. fizikohemičaru Saši Šorgiću iz Enološke stanice u Vršcu koji su mi pružili izuzetnu pomoć u vidu podrške, izrade i pisanja radova koji su nastali kao rezultat izrade ove disertacije. Veliko hvala naučnom savetniku dr Stanislavi Gorjanović, naučnom saradniku dr Darku Miciću i naučnom saradniku dr Stevanu Blagojeviću sa Instituta za opštu i fizičku hemiju u Beogradu, naučnom saradniku dr Urošu Gašiću i redovnom profesoru dr Živoslavu Tešiću sa Hemijskog fakulteta u Beogradu, vanrednom profesoru dr Pavlu Maškoviću sa Agronomskog fakulteta u Čačku, višem naučnom saradniku dr Vladimiru Filipoviću sa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu i višem naučnom saradniku dr Jeleni Filipović sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, dr Zorici Blagojević, dr Tatjani Nedeljković i Milanu Milenkoviću sa Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ na pomoći u vidu analiza i tumačenja rezultata.

Takođe, želeo bih da se zahvalim svojim kolegama iz Mirisne laboratorije Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu docentu dr Branimiru Pavliću i Slavici Ostojić koji su svojim savetima doprineli izradi disertacije. Zahvaljujem se vanrednom profesoru dr Mariji Radojković i naučnom saradniku dr Aleksandri Cvetanović koje su bile uvek tu da svojim savetima pomognu da prevaziđem sve probleme na koje sam naišao tokom izrade disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem svom mentoru, redovnom profesoru dr Zoranu Zekoviću, koji mi je pružio šansu prihvativši me za svog doktoranda. Takođe, što je svojim savetima, posvećenom

vremenu i interesovanjem izuzetno doprineo izradi i oblikovanju ove disertacije. Zahvaljujem se i vanrednom profesoru dr Mariji Radojković i redovnom profesoru dr Mirjani Popsavin, članovima komisije, koji su svojim savetima dopineli da ova disertacija poprimi svoj konačan oblik.

Na kraju se zahvaljujem svim svojim prijateljima, a među njima najviše Milanu, koji su svojim savetima i pomoći doprineli da se izrada disertacije uspešno privede kraju.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Saša Đurović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Zoran Zeković, redovni profesor
Naslov rada: NR	Savremene metode ekstrakcije koprive (<i>Urtica dioica</i> L.), sastav i primena ekstrakata
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	(6 poglavlja / 143 stranice / 58 slika / 42 tabele / 199 referenci)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Farmaceutsko inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Urtica dioica</i> , savremene ekstrakcione tehnike, hemijski profil, biološka aktivnost, formulacija prehrambenog proizvoda
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Glavni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio ispitivanje hemijskog sastava lista koprive (<i>Urtica dioica</i> L.), primena različitih ekstrakcionih tehnika radi izolovanja aktivnih jedinjenja iz lista, ispitivanje njihovog hemijskog sastava, kao i formulacija prehrambenog proizvoda dodavanjem ekstrakta lista.</p> <p>U cilju ispitivanja sastava lista primenjene su različite analitičke tehnike kao što su GC/MS, GC/FID, UHPLC-DAD/MS/MS, ICP-OES, živin analizator, AAS i spektrofotometrija. Pri tome je dokazano prisustvo različitih klasa hemijskih jedinjenja među kojima su pigmenti (hlorofil i karotenoidi), terpenoidi, fenolni i polifenolna jedinjenja, vitamini (vitamin C i vitamini B grupe) i masne kiseline.</p> <p>Za izdvajanje biološki aktivnih jedinjenja primenjene su različite tehnike ekstrakcije, kao što su: maceracija, Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna (UAE), mikrotalasna (MAE) i superkrična ekstrakcija (SFE). Preliminarne UAE ekstrakcije su pokazale da je voda bila najpogodnija kao rastvarač, odnosno da su vodeni ekstrakti pokazali najveću antioksidativnu aktivnost, kao i najveći sadržaj ukupnih fenola (TPC) i flavonoida (TFC). Pripremljeni vodeni ekstrakti su dalje ispitivani u pogledu sastava, antioksidativne, citotoksične i antimikrobne aktivnosti, gde su rezultati međusobno poređeni kako bi se odabrala najpogodnija ekstrakciona tehnika. Kod SFE je ispitan uticaj</p>

	<p>uslova ekstrakcije, odnosno pritiska i temperature na sastav dobijenih ekstrakata i njihovu biološku aktivnost (antioksidativna i citotoksična). Iscrpljeni list koprive je nakon SFE bio ekstrahovan primenom UAE i MAE tehnika, gde su dobijenim ekstraktima utvrđeni sastav i biološka aktivnost.</p> <p>Nakon svih ispitivanja, MAE ekstrakt i suvi list koprive su dalje primenjeni u formulaciji prehrambenog proizvoda (hleba), gde je variran njihov sadržaj, dok su analizirani sastav, tehnološki kvalitet hleba, kao i biološka aktivnost (antioksidativna i citotoksična).</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	13.04.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>predsednik: dr Marija Radojković, vanredni profesor, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu</p> <p>član: dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakulteta u Novom Sadu</p> <p>član: dr Mirjana Popsavin, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Saša Đurović
Mentor: MN	Dr Zoran Zeković
Title: TI	Contemporary methods of stinging nettle (<i>Urtica dioica</i> L.) extractions, composition and application of extracts
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	(6 chapters / 143 pages / 58 figures / 42 tables / 199 references)
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Pharmaceutical engineering
Subject, Key words SKW	<i>Urtica dioica</i> , contemporary extraction techniques, chemical profile, biological activity, formulation of food product
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The main goals of this PhD thesis were investigation of chemical composition of stinging nettle leaves (<i>Urtica dioica</i> L.), application of different extraction techniques for isolation of biologically active compounds from leaves, investigation of their chemical composition and formulation of food product with addition of dried leaves and/or its extract. For those purposes, different analytical techniques were applied, i.e. GC/MS, GC/FID, UHPLC-DAD/MS/MS, ICP-OES, direct mercury analyzer, AAS and spectrophotometry. Different classes of chemical compounds were detected and identified, such as: pigments (chlorophylls and carotenoids), terpenoids, phenolic and polyphenolic compounds, vitamins (vitamin C and B group) and fatty acids.</p> <p>For the purpose of isolation of biologically active compounds, different extraction techniques were applied: maceration, Soxhlet extraction, ultrasound (UAE), microwave (MAE) and supercritical (SFE) extraction. Preliminary conducted extraction, as well as total phenolics (TPC) and flavonoids (TFC) contents, showed that water was the most suitable solvent for further course of investigation. Water extracts were further analyzed regarding their chemical composition, antioxidant, cytotoxic and</p>

	<p>antimicrobial activities. Obtained results were compared in order to select the most efficient extraction technique. In the case of SFE, influence of pressure and temperature on extraction yield, composition and biological activity of prepared extracts were monitored. Exhausted plant material after SFE was used for further MAE extraction, while obtained extracts were analyzed to investigate chemical composition and biological activity.</p> <p>After conducted experiments and analysis, MAE extract was used for formulation of food product (bread) where it was added in different amounts in combination of with dried leaves. Obtained products were analyzed regarding their chemical composition, technological requirements and biological activity.</p>
Accepted on Senate on: AS	13.04.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Marija Radojković, associate professor, Faculty of Technology, Novi sad</p> <p>member: dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi sad</p> <p>member: dr Mirjana Popsavin, full professor, Faculty of Science, Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. Uvod.....	- 1 -
2. Teorijski deo	- 3 -
2.1 Izolovanje biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala	- 3 -
2.1.1 Hidrodestilacija.....	- 4 -
2.1.2 Klasične ekstrakcione tehnike	- 5 -
2.1.3 Savremene ekstrakcione tehnike	- 7 -
2.1.3.1 Ultrazvučna ekstrakcija	- 7 -
2.1.3.2 Mikrotalasna ekstrakcija.....	- 8 -
2.1.3.3 Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju	- 10 -
2.1.3.4 Ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju.....	- 12 -
2.2 Biljni metabolizam i metaboliti.....	- 15 -
2.2.1 Masne kiseline	- 16 -
2.2.2 Etarska ulja	- 20 -
2.2.3 Karotenoidi i vitamini.....	- 32 -
2.2.4 Fenolna i polifenolna jedinjenja	- 38 -
2.3 Biološka aktivnost biljaka i njihovih ekstrakata	- 42 -
2.3.1 Antioksidativna aktivnost.....	- 42 -
2.3.2 Antimikrobna aktivnost	- 46 -
2.3.3 Citotoksična aktivnost	- 47 -
2.4 Kopriva (<i>Urtica dioica</i> L.).....	- 49 -
2.4.1 Hemijski profil koprive	- 50 -
2.4.2 Biološka aktivnost koprive i njenih ekstrakata.....	- 50 -
3. Eksperimentalni deo	- 52 -

3.1 Biljni materijal.....	- 52 -
3.2 Hemikalije i reagensi.....	- 52 -
3.3 Analiza biljnog materijala	- 53 -
3.3.1 Određivanje vlage.....	- 53 -
3.3.2 Određivanje sadržaja etarskog ulja.....	- 53 -
3.4 Ekstrakcija biljnog materijala.....	- 53 -
3.4.1 Konvencionalne metode ekstrakcije.....	- 53 -
3.4.2 Nekonvencionalne metode ekstrakcije	- 54 -
3.5 Hemijska analiza biljnog materijala i ekstrakata.....	- 54 -
3.5.1 Sadržaj ukupnih fenola	- 54 -
3.5.2 Sadržaj ukupnih flavonoida	- 55 -
3.5.3 Sadržaj hlorofila i karotenoida	- 55 -
3.5.4 Analiza etarskog ulja	- 56 -
3.5.5 Analiza sadržaja minerala.....	- 56 -
3.5.6 UHPLC-DAD MS/MS analiza.....	- 57 -
3.5.7 Sadržaj masnih kiselina	- 58 -
3.5.8 Sadržaj vitamina	- 58 -
3.5.9 Termogravimetrijska analiza ekstrakata koprive.....	- 58 -
3.6 Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata	- 59 -
3.6.1 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti	- 59 -
3.6.1.1 Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala.....	- 59 -
3.6.1.2 Sposobnost neutralizacije hidroksilnih radikala	- 60 -
3.6.1.3 Sposobnost neutralizacije ABTS radikala	- 60 -
3.6.1.4 Redukciona sposobnost ekstrakata	- 61 -
3.6.1.5 Sposobnost heliranja metalnih jona.....	- 61 -

3.6.1.6	Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije	- 62 -
3.6.1.7	Određivanje antioksidativne aktivnosti HMPC metodom.....	- 62 -
3.6.2	Antimikrobna aktivnost ekstrakata.....	- 62 -
3.6.3	Citotoksična aktivnost ekstrakata	- 63 -
3.7	Pripremanje i analiza hleba sa dodatkom lista i ekstrakta koprive	- 64 -
3.7.1	Priprema hleba	- 64 -
3.7.2	Zapremina hleba	- 64 -
3.7.3	Tekstura hleba.....	- 65 -
3.7.4	Boja hleba.....	- 65 -
3.7.5	Osnovni hemijski sastav hleba	- 65 -
3.7.6	Mineralni sastav hleba	- 66 -
3.7.7	Deskriptivna senzorska analiza-potrošački test.....	- 66 -
3.7.8	Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u hlebu	- 66 -
3.7.9	Antioksidativna aktivnost hleba	- 66 -
3.7.10	Citotoksična aktivnost hleba.....	- 66 -
4.	Rezultati i diskusija.....	- 67 -
4.1	Hemijski sastav lista koprive.....	- 67 -
4.1.1	Hemijski sastav etarskog ulja	- 67 -
4.1.2	Hlorofil i karotenoidi	- 68 -
4.1.3	Masne kiseline	- 70 -
4.1.4	Sadržaj minerala	- 73 -
4.2	Ekstrakcije koprive i ispitivanje ekstrakata.....	- 74 -
4.2.1	Preliminarne ekstrakcije lista koprive	- 74 -
4.2.2	Dobijanje i ispitivanje sastava vodenih i Soxhlet ekstrakata koprive	- 75 -
4.2.3	Biološka aktivnost ekstrakata	- 85 -

4.3 Superkritični ekstrakti koprive	- 88 -
4.3.1 Prinos i kinetika ekstrakcije.....	- 88 -
4.3.2 Hemijski sastav superkritičnih ekstrakata	- 91 -
4.3.3 Biološka aktivnost superkritičnih ekstrakata	- 97 -
4.4 Ekstrakcije iscrpljenog lista koprive	- 98 -
4.4.1 Prinos ekstrakcije i hemijski sastav ekstrakata.....	- 99 -
4.4.2 Biološka aktivnost ekstrakata	- 105 -
4.5 Praktična primena ekstrakata koprive: hleb sa dodatkom lista i ekstrakta koprive	- 111 -
4.5.1 Fizička, teksturna i senzorska svojstva hleba sa listom i ekstraktom koprive.....	- 112 -
4.5.2 Ispitivanje hemijskog sastava hleba	- 115 -
4.5.3 Ispitivanje biološke aktivnosti hleba	- 120 -
5. Zaključci	- 123 -
6. Literatura.....	- 126 -

1. Uvod

Sintetička industrija u farmaciji u današnje vreme ima izuzetan uticaj na tržište lekova. Međutim, sve se više istraživanja vrši u cilju pronalaska odgovarajućih aktivnih jedinjenja među prirodnim proizvodima. Ispitivanje hemijskog sastava biljaka pomoću savremenih analitičkih tehnika je sve prisutnije u naučnom svetu. Kako bi se željene komponente izolovale iz biljnog materijala, koriste se različite metode ekstrakcije kao što su maceracija, ekstrakcija sa povremenim ispuštanjem ekstrakta, ultrazvučna, mikrotalasna, superkritična ekstrakcija, itd. Sa ekstrakcionim metodama, razvoj ide u pravcu daljeg izolovanja, odnosno prečišćavanja željenih jedinjenja kako bi se mogla dodatno ispitati i potom upotrebiti.

Pored izolovanja, odnosno prečišćavanja, ispituje se hemijski sastav, kao i biološka aktivnost sirovih ekstrakata koji su dobijeni direktnom primenom neke od navedenih metoda. Ovo je veoma značajan korak jer se sami ekstrakti mogu upotrebljavati u različitim granama industrije. Ako su sami ekstrakti dobijeni upotrebom rastvarača koji se smatraju pogodnim za životnu sredinu (GRAS; Generally recognized as safe) to omogućava njihovu direktnu primenu, jer nema potrebe za dodatnim prečišćavanjem, što bi istovremeno povećalo cenu gotovog proizvoda.

Pored istraživanja na polju izolacije i analize, sve se više ispituje i mogućnost primene ekstrakata. Tako, oni mogu da se primene kao sastojci u farmaceutskoj industriji gde se mogu formulirati proizvodi na bazi prirodnih jedinjenja koja deluju blagotvorno kako na pojedine organe, tako i na ceo organizam. Takođe, moguća primena leži i u prehrambenoj industriji. Shodno tome, objavljuje se sve veći broj naučnih radova koji se bave ispitivanjem uticaja ekstrakata na prehrambene proizvode. Jedna od mogućih primena ekstrakata jeste u vidu konzervanasa, čime bi se zamenila sintetička jedinjenja koja uglavnom imaju neki negativan uticaj na ljudsko zdravlje. Pored samog uticaja na rok trajanja proizvoda, ekstrakti mogu ispoljavati i svoj pozitivan uticaj na zdravlje pošto poseduju širok spektar dejstava među kojima su i antioksidativno, antimikrobno, citotoksično, antivirusno i antiinflamatorno.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita list koprive (*Urtica dioica* L.), njegovi ekstrakti i njihova biološka aktivnost, kao i mogućnost praktične primene ekstrakata u formulaciji prehrambenog proizvoda. Ciljne klase jedinjenja bile su terpeni, masne kiseline, fenolna, odnosno

polifenolna jedinjenja, minerali, karotenoidi i hlorofil. Pored hemijskog sastava ispitana je antioksidativna, antimikrobna i citotoksična aktivnost ekstrakata dobijenih primenom maceracije, Soxhlet ekstrakcije, ultrazvučne, mikrotalasne i superkritične ekstrakcije. Ekstrakt dobijen mikrotalasnom ekstrakcijom je dalje primenjen u formulaciji prehrambenog proizvoda (hleba), nakon čega je ispitan sastav (sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupni sadržaj flavonoida, sadržaj minerala i osnovni hemijski sastav) i biološka aktivnost proizvoda (antioksidativna i citotoksična aktivnost). U tu svrhu primenjene su različite analitičke tehnike kao što su spektrofotometrija, tečna hromatografija visokih performansi (UHPLC-DAD MS/MS), gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom i plameno-jonizujućim detektorom (GC/MS i GC/FID), indukovano spregnuta plazma (ICP-OES) i atomska apsorpciona spektrofotometrija (AAS).

2. Teorijski deo

2.1 Izolovanje biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala

Usled velikog biološkog potencijala, biljke i biljni proizvodi imaju široku primenu u proizvodnji funkcionalne hrane, raznih dijetetskih proizvoda, kao i u oblasti farmacije za formulaciju različitih proizvoda koji za cilj imaju poboljšanje zdravlja ljudi. Ovako široka upotreba biljaka dovela je do ubrzanog razvijanja ekstrakcionih tehnika kako bi se aktivna jedinjenja izdvojila i dalje prečistila u zavisnosti od potrebe pomenutih grana industrije. Značajno mesto koje zauzimaju ekstrakcione metode u savremenoj industriji i nauci potvrđuje i razvijanje većeg broja savremenih pristupa ekstrakcije koje sve češće zamenjuju klasične ekstrakcione metode.

Međutim, i pored viševjekovne upotrebe i razvijanja ekstrakcionih metoda, izolovanje prirodnih proizvoda iz prirodnog okruženja predstavlja i dalje veliki izazov. Razlog tome jeste kompleksnost matriksa iz kojeg se izoluju željena jedinjenja. Pored složenosti, sama priprema biljnog materijala predstavlja veoma značajan faktor koji utiče na proces izolovanja. Prvi korak u pripremi najčešće predstavljaju sušenje i usitnjavanje materijala. Sušenjem se vrši denaturacija biljnih ćelija, odnosno denaturisanje protoplazme biljnih ćelija. Tada zid ćelije postaje porozan i propušta komponente u oba pravca. Rastvarač (ekstragens) prodire u ćeliju i ispunjava je. Ovaj proces može trajati duže usled veće količine vazduha koja se nalazi u ćelijama. Brzina prodiranja se može povećati primenom vakuuma i zamenom vazduha rastvorljivim gasovima. Pored ispunjavanja prostora u ćelijama i porama, rastvarač rastvara i željena jedinjenja prisutna u biljnom materijalu [1]. Sa druge strane, usitnjavanjem se narušava struktura materijala, što omogućava otvaranje ćelija čime sadržaj postaje dostupniji za rastvarač. Pored ovoga, usitnjavanjem se povećava dodirna površina čime se povećava kontaktna površina za prenos mase [2].

Pomenuta složenost biljnog materijala iz kojeg se izoluju željena jedinjenja ispoljava se kroz efekat matriksa na proces ekstrakcije koji spada u najmanje razjašnjene fenomene ovog procesa. Čest je slučaj da je željeno jedinjenje vezano za matriks čvrstim vezama, pa je neophodno poznavati prirodu tih veza kako bi se jedinjenje što efikasnije izolovalo. Nemogućnost ekstrakcione tehnike da savlada ove efekte predstavlja jedan od njenih najvećih nedostataka [3]. Sam proces izolacije jedinjenja iz matriksa se može podeliti na nekoliko faza [4]. Prva faza je desorpcija jedinjenja sa

matriksa. Nakon desorpcije dolazi do difuzije jedinjenja kroz sloj matriksa do granice faza matriks-ekstragens. Po završetku procesa difuzije odvija se proces raspodele željenog jedinjenja u ekstragensu. Daljom difuzijom jedinjenje prelazi iz ekstragensa koji se nalazi oko matriksa u sloj ekstragensa koji je zahvaćen procesom konvekcije, odnosno mešanja. Poslednja faza jeste izolovanje željenog jedinjenja iz dobijenog ekstrakta [4,5]. Proces koji određuje brzinu ekstrakcije uveliko zavisi od prirode matriksa i položaja samog jedinjenja u matriksu. Jedinjenje se u matriksu može nalaziti na pet različitih pozicija [4,6]:

- Adsorbovan na površini čvrste čestice,
- U porama čvrste čestice dispergovane u rastvaraču,
- Rastvoren/adsorbovan u mikro/nano porama matriksa,
- Hemijski vezan za matriks i
- Rastvoren u celokupnoj zapremini rastvora.

Poznavanje navedenih faktora izuzetno je važno za odabir i optimizaciju procesa ekstrakcije. Takođe, važno je i poznavati ograničavajuće faktore samih procesa kako bi se pravilno izvršio odabir ekstrakcione metode.

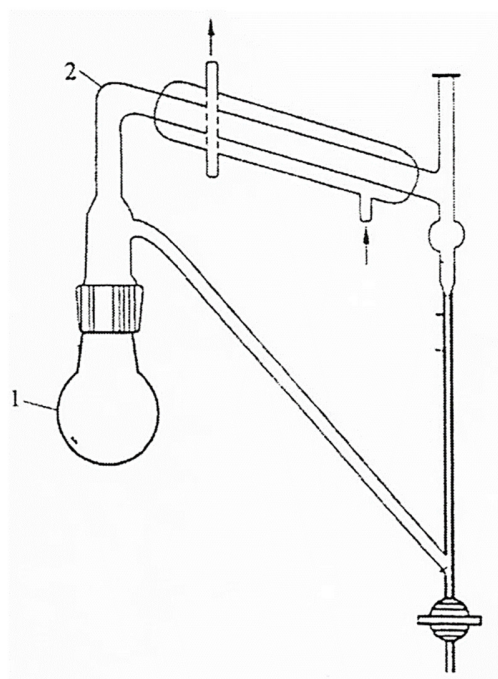
Pored pripreme biljnog materijala i odabira ekstrakcione metode, selekcija rastvarača takođe ima važnu ulogu u povećanju efikasnosti procesa ekstrakcije. Sam izbor zavisi od hemijske prirode željenog jedinjenja ili grupe jedinjenja. Ovde je naravno ključna hemijska struktura jedinjenja koja diktira njegove osobine kao što su hidrofilnost/hidrofobnost, polarnost, rastvorljivost, itd. Ako je željeno jedinjenje polarno, prirodno je da će se za ekstrakciju izabrati polarni rastvarač. U slučaju biljnog materijala najčešće se upotrebljavaju smeše alkohola i vode. Ovo omogućava promenu dielektrične konstante upotrebljenog ekstragensa u širokom opsegu. Pored dielektrične konstante, dolazi do promene viskoziteta i površinskog napona koji takođe imaju značajne uloge. Samim tim se često dodaju i neke površinski aktivne materije (PAM) radi sniženja površinskog napona [7].

2.1.1 Hidrodestilacija

Aromatične droge su one biljke koje sadrže mirisne supstance (komponente etarskih ulja). Etarska ulja se u laboratorijama izoluju destilacijom pomoću vodene pare, ekstrakcijom lako isparljivim

organskim rastvaračima ili ekstrakcijom fluidima u superkritičnom stanju. U tu svrhu koriste se različiti delovi biljaka kao što su seme, list, stabljika, itd.

Za laboratorijsko određivanje sadržaja etarskog ulja u biljnom materijalu koriste se uređaji različitih konstrukcija, među kojima su uređaji po Clevenger-u (slika 1), Unger-u, Moritz-u, kao i aparature sa izvesnim modifikacijama. Aparatura po Clevenger-u se sastoji od balona za destilaciju (1) sa okruglim dnom i nastavka za destilaciju (slika 1). Nastavak za destilaciju (2) se sastoji iz vertikalno postavljene i lučno savijene staklene cevi, silaznog hladnjaka na koji se nastavlja vertikalna merna cev koja prelazi u graduisanu cev. Proširenje oblika olive se nalazi iznad podeoka, dok je u donjem delu otvor sa slavinom.



1. Balon za destilaciju
2. Nastavak za destilaciju

Slika 1. Aparatura za određivanje etarskog ulja po Clevenger-u

2.1.2 Klasične ekstrakcione tehnike

U klasične ekstrakcione tehnike se ubrajaju, između ostalih, maceracija i ekstrakcija sa povremenim ispuštanjem ekstrakta (Soxhlet ekstrakcija). Soxhlet ekstrakcija se često upotrebljava i predstavlja neku vrstu standardne ekstrakcione tehnike, a služi kao etalon za poređenje sa ostalim metodama ekstrakcije [8,9].

Ekstrakcija sa povremenim ispuštanjem ekstrakta ili Soxhlet ekstrakcija predstavlja jedan vid kontinualne ekstrakcije gde dolazi do povremenog ispuštanja ekstrakta. Ona služi za ekstrakciju čvrsto-tečno. Primenjuje se uz malu zapreminu rastvarača pri čemu dolazi do izdvajanja jedinjenja koja su često uljasta na sobnoj temperaturi. Međutim, ovo zavisi od prirode upotrebljenog rastvarača. Izvodi se pomoću aparature po Soxhlet-u, koja je prikazana na slici 2.



Slika 2. Aparatura po Soxhlet-u

Usitnjeni ekstrakcioni materijal se unosi u čauru koja se postavlja u telo ekstraktora (4). Na telo ekstraktora se postavlja hladnjak, odnosno kondenzator (9), dok se ispod ekstrakcionog tela nalazi destilacioni sud (2) u koji se dodaje rastvarač (1). Balon se zatim zagreva preko grejnog tela, a pare rastvarača se kreću naviše kroz bočnu cev (3) u kondenzator gde se kondenzuju. Kondenzovani rastvarač pada u telo ekstraktora i natapa čauru sa materijalom pri čemu dolazi do rastvaranja, odnosno ekstrakcije rastvornih jedinjenja. Kada se telo ekstraktora napuni, sadržaj se prelijeva preko sifonske cevi (6) nazad u balon. Opisani postupak se ponavlja do iscrpljenja materijala i/ili do postizanja željenog broja promena rastvarača (sifoniranja) [10].

2.1.3 Savremene ekstrakcione tehnike

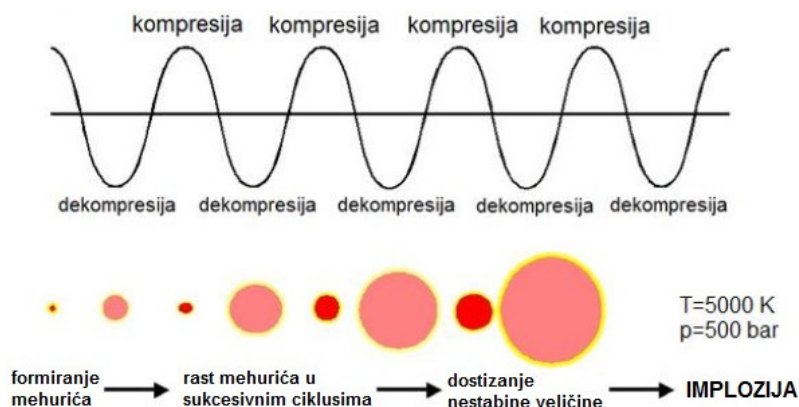
Kako bi se povećala selektivnost ekstrakcije i smanjila upotreba toksičnih organskih rastvarača koji, nakon uparavanja, zaostaju u tragovima u gotovim proizvodima, razvijeno je nekoliko savremenih ekstrakcionih metoda. Među njima su ultrazvučna ekstrakcija (engl. Ultrasound-assisted extraction; UAE), mikrotalasna ekstrakcija (engl. Microwave-assisted extraction; MAE), ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju (engl. Supercritical fluid extraction; SFE) i ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju (engl. Subcritical water extraction; SWE). Svaka od pomenutih ekstrakcionih metoda se zasniva na određenim fenomenima o čemu će biti reči u nastavku.

2.1.3.1 Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvuk se na početku u laboratorijama upotrebljavao za čišćenje posuda, ubrzavanje emulgovanja i procesa rastvaranja. U današnje vreme se primenjuje u različitim tehnološkim operacijama kao što su kristalizacija, sušenje, ekstrakcija, filtracija, zamrzavanje, homogenizacija, sterilizacija, degradacija, itd [7]. U skorije vreme ultrazvuk se upotrebljava za izolovanje prirodnih proizvoda iz prirodnih izvora. Sama metoda se odlikuje niskim cenama opreme i malom potrošnjom električne energije, kao i značajnim skraćanjem vremena potrebnog za ekstrakciju u poređenju sa klasičnim ekstrakcionim metodama.

Prilikom upotrebe ultrazvuka dolazi do ubrzanja procesa prenosa mase iz čvrste u tečnu fazu. Fenomeni koji imaju glavnu ulogu u UAE jesu kavitacija, agitacija, vibracija, pritisak, šok talasi, trenje, nastajanje mikro-mlazova, kompresija i dekompresija. Sami efekti koji se javljaju prilikom odvijanja procesa zavise od primenjene frekvencije. Treba imati u vidu da je ultrazvuk nižih frekvencija (18-40 KHz) daleko korisniji, dok je na frekvencijama od 400 do 800 KHz praktično zanemarljiv [11]. Fizički efekti dominiraju na frekvencijama 20-100 KHz, dok su hemijski izraženi na višim frekvencijama (200-500 KHz) [12]. Glavna pogonska sila jeste akustična kavitacija. Prilikom prolaska kroz medijum ultrazvučni talasi izazivaju seriju kompresija i dekompresija mehurića gasa u tečnoj fazi. To vodi ka daljem nastanku, rastu i imploziji mehurića gasa. Ova pojava rezultira lokalnim povećanjem temperature i pritiska što uzrokuje razaranje ćelija biljnog materijala. Tom prilikom dolazi do olakšane difuzije rastvarača u ćelije, kao i ubrzane difuzije

jedinjenja u tečnu fazu (rastvarač) [10,13]. Na slici 3 šematski je prikazan opisani mehanizam nastanka mehurića i implozije [10].



Slika 3. Mehanizam nastanka mehurića usled dejstva ultrazvuka i njihova implozija

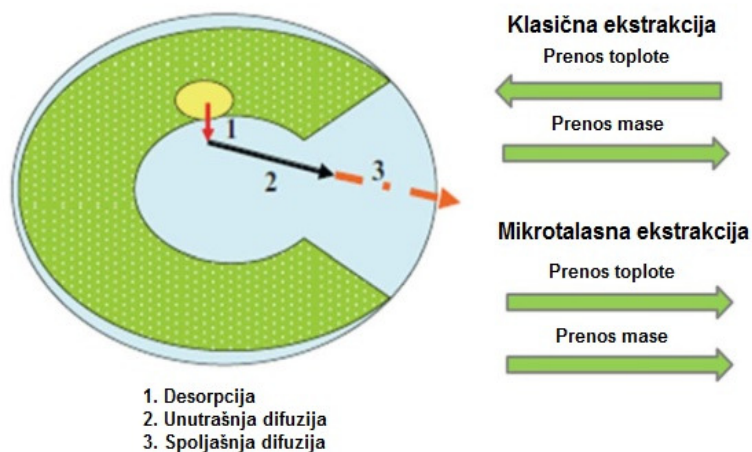
Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju zavisi od nekoliko faktora kao što su snaga i frekvencija ultrazvuka, viskoznost i površinski napon rastvarača, kao i od ambijentalnih faktora, odnosno temperature i pritiska. Sa druge strane, usled visokog intenziteta dolazi do formiranja slobodnih radikala koji oštećuju ćelijski zid i/ili do indukcije niza reakcija koje uzrokuju degradaciju željenih jedinjenja. Iz tog razloga neophodno je da se parametri ekstrakcije pažljivo podese kako bi se sprečile pojave neželjenih procesa tokom ekstrakcije [7,10].

2.1.3.2 Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasi, odnosno mikrotalasna ekstrakcija (MAE) se poslednjih decenija sve više upotrebljava za izolovanje jedinjenja. Sama tehnika se zasniva na upotrebi elektromagnetnog zračenja frekvencije 0,3-300 GHz. Prilikom interakcije ovih talasa sa molekulima dolazi do nastanka toplote [14]. U zavisnosti od dielektrične konstante molekuli apsorbuju zračenje, dok se samo zagrevanje odvija jonskom kondukcijom i rotacijom dipola [15]. Jonska kondukcija nastaje migracijom jona koja dalje indukuje otpor i trenje što dalje uzrokuje zagrevanje. Sa druge strane, u slučaju rotacije dipola, toplota se generiše usled trenja između molekula koji rotiraju.

Fenomen prenosa mase kod MAE odvija se na isti način kao i u slučaju klasičnih ekstrakcionih tehnika, odnosno rastvarač prodire u biljni materijal. Prenos toplote se, za razliku od klasičnih

tehnika, odvija suprotno, odnosno iz čvrste u tečnu fazu putem zagrevanja molekula u biljnom materijalu. Opisani fenomeni prikazani su na slici 4 [10].



Slika 4. Fenomeni prenosa mase i toplote u slučaju klasične i mikrotalasne ekstrakcije

Na efikasnost ove tehnike utiču različiti faktori među kojima su priroda rastvarača i biljnog materijala, odnos droga-rastvarač, snaga mikrotalasnog zračenja, temperatura, vreme izlaganja zračenju, mešanje, međusobna interakcija, itd. Temperatura na kojoj se odvija proces u velikoj meri utiče na dubinu prodiranja mikrotalasa (tabela 1) [7]. Generalno, sa porastom temperature raste i prinos ekstrakcije. Međutim, treba imati u vidu da sa nekontrolisanim rastom temperature dolazi do razlaganja jedinjenja koja su nestabilna na višim temperaturama.

Tabela 1. Zavisnost dubine prodiranja mikrotalasa od temperature i snage zračenja

Temperatura (°C)	Dubina prodiranja (mm)		
	0,4 GHz	0,9 GHz	2,45 GHz
-20	250	130	85
-10	150	76	45
0	90	47	25
10	30	21	18
20	23	20	16
30	20	18	10
40	14	15	11
60	11	12	11

Izbor rastvarača takođe ima značajan uticaj na efikasnost MAE. Kada se bira rastvarač treba imati u vidu rastvorljivost samog jedinjenja koje se izoluje, dielektrična svojstva rastvarača, kao i interakcije između rastvarača i matriksa iz kojeg se jedinjenje izoluje. Često se upotrebljavaju metanol, etanol, voda, aceton i njihove smeše [16]. Kada se koriste smeše, to moraju biti rastvarači koji se mešaju. Ukoliko komponente u uzorku imaju visoke dielektrične konstante tada se može koristiti rastvarač manje polarosti. Uzorak se tada intenzivno zagreva, a toplota se predaje okolnom rastvaraču [7].

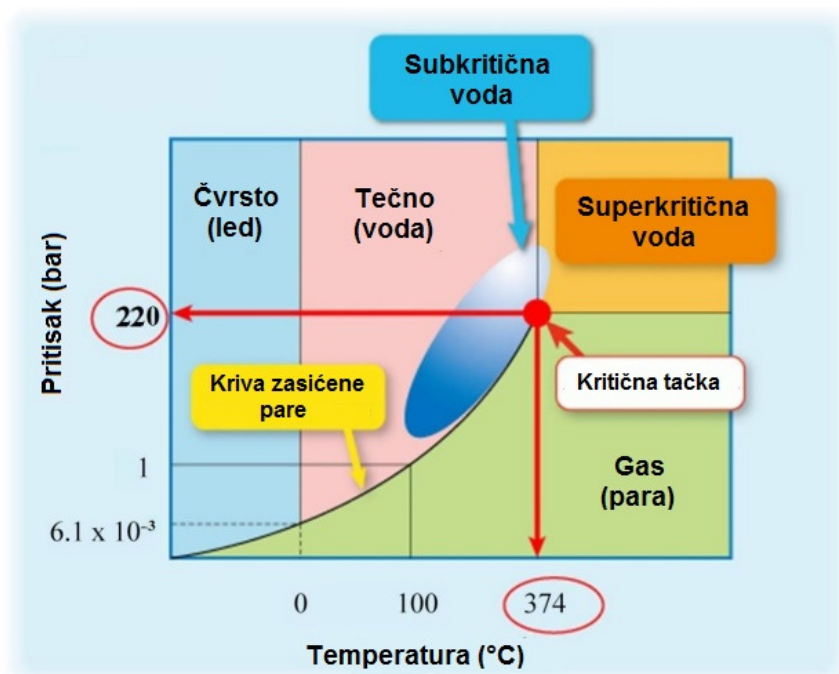
Pored temperature i snage mikrotalasa, vreme ekstrakcije je takođe značajan faktor koji utiče na efikasnost procesa. Duže izlaganje uzorka mikrotalasima može dovesti do razgradnje ciljanih jedinjenja čak i pri nižim temperaturama [17]. Iz tih razloga je vreme ekstrakcije kraće i kreće se u rasponu 1-30 minuta. U slučaju potrebe za dužim izlaganjem, potencijalno razlaganje jedinjenja se može izbeći ciklusnim tretmanima. Time se obezbeđuje efikasnije korišćenje energije za ubrzavanje ekstrakcionog procesa umesto za degradaciju jedinjenja [14].

2.1.3.3 Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Voda je izuzetno čest rastvarač u industriji i laboratoriji. Međutim, i pored toga nije našla odgovarajuću primenu u svom superkritičnom stanju zbog izuzetno visokih kritičnih vrednosti (220,9 bar i 374°C). Takvi uslovi se teško postižu i održavaju tokom odvijanja procesa. Takođe, reaktivnost vode u ovom stanju se znatno menja, odnosno voda postaje sposobna da razgradi toksične supstance, izazove raspad eksploziva, dehalogenizaciju polihlorovanih bifenila, čak i da korodira nerđajući čelik [3]. Sa druge strane, voda u subkritičnom stanju, odnosno subkritična voda, jeste voda zagrejana na temperaturu iznad njene tačke ključanja, dok se pritisak održava tako da je zadrži u tečnom stanju. Ovakvim tretmanom vode njene osobine kao rastvarača se menjaju u širokom opsegu, odnosno od sobnih uslova gde ona rastvara polarne supstance do uslova pri kojim rastvara nepolarne supstance. Posebno je zanimljiv podatak da se rastvorljivost polarnih supstanci u subkritičnoj vodi neznatno menja, dok se rastvorljivost umereno nepolarnih i nepolarnih jedinjenja značajno povećava. Na slici 5 prikazan je fazni dijagram vode [7].

Kao i u slučaju UAE i MAE, parametri procesa ekstrakcije subkritičnom vodom se moraju pažljivo izabrati. Najznačajniji parametri koji utiču na sam proces jesu temperatura i pritisak. Sa povećanjem temperature dielektrična konstanta vode opada. Tada dolazi do narušavanja

vodoničnih veza među molekulima vode, čime se utiče na interakcije između rastvarača i molekula ciljanih jedinjenja.



Slika 5. Fazni dijagram vode

Pored ovoga, sa povećanjem temperature raste i difuzivnost vode, dok se njena viskoznost i površinski napon smanjuju. Treba obratiti pažnju da iako je kritična temperatura vode visoka, ovaj parametar treba pažljivo podesiti jer može doći do degradacije željenih jedinjenja. Osim degradacije, povećanje temperature može dovesti do smanjenja selektivnosti procesa [18,19]. Povećanje temperature ima uticaj i na biljni materijal. Dolazi do sprečavanja kohezivne i adhezivne interakcije između ciljanih jedinjenja i biljnog materijala smanjenjem energije aktivacije koja je potreba za desorpciju tih jedinjenja [20]. Smanjenje površinskog napona i viskoziteta uzrokuje smanjenje ugla kvašenja između vode i biljnog materijala što vodi ka boljem i bržem prodiranju tečnosti u pore čvrstog uzorka.

Značaj povišenog pritiska se uglavnom svodi na omogućavanje upotrebe vode na visokim temperaturama. Povišen pritisak u kombinaciji sa visokom temperaturom omogućava bolju penetraciju rastvarača u biljni materijal. Ovim se takođe povećava i brzina prenosa mase. Osim toga biljni materijal je podložan razaranju na visokim pritiscima čime intraćelijski materijal postaje

lako dostupan rastvaraču. Povišen pritisak takođe omogućava prevazilaženje problema koji nastaju pojavom mehurića vazduha oko materijala koji se ekstrahuje.

Optimalno vreme ekstrakcije se određuje sa posebnom pažnjom imajući u vidu interakciju između procesnih parametara. Kod šaržne SWE nije uvek moguće postići iscrpljenje sirovine produženjem trajanja ekstrakcije. Sa druge strane, kod polukontinualne SWE produženje vremena ekstrakcije može povećati prinos procesa. Vreme ekstrakcije se dovodi u vezu sa temperaturom i prirodom jedinjenja koja se ekstrahuju [10]. Samim tim, vreme ekstrakcije i temperatura treba da se posmatraju kao dve nezavisno promenljive imajući u vidu da povišena temperatura skraćuje vreme potrebno za proces, dok sa druge strane može prouzrokovati degradaciju jedinjenja koja su nestabilna na povišenim temperaturama.

2.1.3.4 Ekstrakcija fluidima u superkritičnom stanju

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) se zasniva na činjenici da neki gasovi postaju izuzetno moćni rastvarači kada se nađu u uslovima blizu kritičnih, odnosno u nadkritičnim uslovima [21]. Ova tehnika je prevashodno razvijena usled sve većih potreba za prevazilaženjem nedostataka klasičnih ekstrakcionih tehnika. Kada se dovedu u ovo stanje, fluidi imaju fizičko-hemijske osobine koje se nalaze između odgovarajućih osobina gasova i tečnosti. Tako, gustina superkritičnih fluida je bliža gustini tečnosti, dok su viskozitet i difuzivnost slični gasovima. U tabeli 2 prikazane su fizičko-hemijske osobine gasova, tečnosti i superkritičnih fluida [22].

Tabela 2. Fizičko-hemijske osobine gasova, tečnosti i superkritičnih fluida

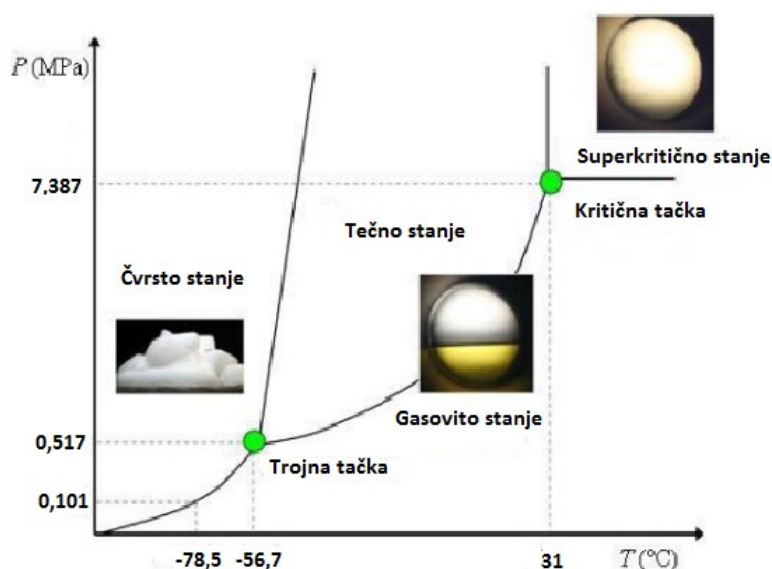
Agregatno stanje	Gustina (g/cm³)	Difuzivnost (cm²/s)	Viskozitet (g s/cm)
Gasovito	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Tečno	1	< 10 ⁻⁵	10 ⁻²
Superkritično	0,3-0,8	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ -10 ⁻³

Kombinacija niskog viskoziteta i visoke difuzivnosti karakterišu superkritične fluide boljim prenosiocem toplote i mase u odnosu na tečnosti. Samim tim, oni su u stanju da efikasnije prodru u biljni materijal i ekstrahuju željena jedinjenja. U tabeli 3 dati su kritični parametri za odabrane fluide [23].

U praksi se u SFE najčešće upotrebljava ugljen-dioksid. Glavni razlog za njegovu upotrebu jesu niske vrednosti kritičnih parametara (tabela 3), nije eksplozivan, niti zapaljiv. Dostupan je u visokom stepenu čistoće, jeftin je, nije toksičan i inertan je [24]. Na slici 6 prikazan je fazni dijagram za ugljenik(IV)-oksid [7]. Treba pomenuti da se tokom ovog procesa ekstragens vrlo lako odvaja od ekstrakta promenom temperature i pritiska sistema. Takođe, ugljen-dioksid je zbog svoje nepolarosti dobar ekstragens za nepolarna jedinjenja, dok se u slučaju izdvajanja polarnih jedinjenja dodaju polarni modifikatori (kosolventi) kako bi se povećao njegov afinitet ka polarnim jedinjenjima.

Tabela 3. Kritični parametri za odabrane fluide

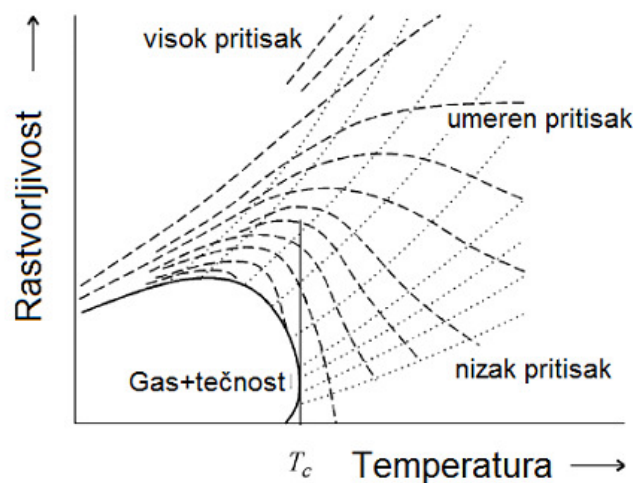
Fluid	Kritični pritisak (bar)	Kritična temperatura (°C)
Amonijak	113,5	132,4
Ugljen-dioksid	73,7	31,1
Dimetil-etar	52,7	127,1
Etan	48,7	32,3
Etilen	50,4	9,3
Metanol	80,9	239,6
<i>n</i> -Heksan	30,2	234,5
Propan	42,5	96,8
Voda	220,6	374,1
Ksenon	58,0	17,1



Slika 6. Fazni dijagram ugljenik(IV)-oksida

Kada su u pitanju parametri i njihov uticaj na proces ekstrakcije, jasno je da najveći uticaj ima pritisak. On direktno utiče na zapreminsku masu fluida od koje zavisi moć rastvaranja ekstragensa. Samim tim će direktno i pozitivno uticati na prinos ekstrakcije. Međutim, veliki prinos nije uvek poželjan pošto se u ekstraktu, pored željenih, nalazi i veći broj pratećih jedinjenja. Temperatura sa druge strane negativno utiče na gustinu superkritičnog ugljen-dioksida, odnosno sa povećanjem temperature gustina se smanjuje. Sa smanjenjem gustine fluida opada i prinos ekstrakcije [25]. Pored svog uticaja na gustinu, temperatura utiče i na napon pare lako isparljivih jedinjenja. Sa porastom temperature napon pare lako isparljivih jedinjenja raste, a samim tim raste i njihova rastvorljivost. Tako da, kada se govori o uticaju temperature, treba imati u vidu njen dualni uticaj na gustinu superkritičnog fluida i na napon pare ciljanih jedinjenja.

Kombinovanom promenom pritiska i temperature dolazi do promene u osobinama superkritičnog fluida čime se menja i selektivnost prema određenim grupama jedinjenja. Na slici 7 prikazan je uticaj oba parametra na rastvorljivost jedinjenja [10,26].



Slika 7. Uticaj pritiska i temperature na rastvorljivost jedinjenja tokom SFE

Krive ukazuju na to da rastvorljivost varira u širokim granicama sa promenom procesnih parametara. To omogućava visok stepen kontrole selektivnosti procesa. Rastvorljivost raste u subkritičnom stanju sa porastom temperature sve do vrednosti bliske kritičnoj kada počinje da opada. Dalji porast temperature u oblasti nižeg pritiska vodi ka opadanju rastvorljivosti usled smanjenja gustine superkritičnog fluida. U oblasti umerenog i višeg pritiska uticaj temperature na

gustinu je manji, pa rastvorljivost raste sa porastom temperature usled njenog uticaja na napon pare jedinjenja.

Za razliku od pritiska i temperature, protok superkritičnog fluida ne utiče na njegove fizičko-hemijske osobine. Sam protok ima direktan uticaj na fenomene prenosa mase među kojima su aksijalna disperzija, koeficijent konvektivnog prenosa mase i akumulacija jedinjenja [27]. Iako ne utiče direktno na gustinu fluida, veoma je važan faktor koji se mora uzeti u obzir prilikom optimizacije procesa. Povećanje protoka uzrokuje povećanje prenosa mase putem pomeranja koncentracionog gradijenta dovodenjem svežeg rastvarača. Sa druge strane, u određenim slučajevima prekomerno povećanje protoka može negativno da utiče na prinos ekstrakcije zbog smanjenog vremena kontakta između superkritičnog fluida i biljnog materijala, odnosno smanjenja vremena za unutrašnju difuziju. Ova pojava se često naziva „ispiranje“ i nepoželjna je u procesu ekstrakcije.

Kako bi se povećala selektivnost ekstragensa ili promenio njegov afinitet, uvedeno je dodavanje modifikatora. Za tu svrhu najčešće služe organski rastvarači poput metanola, etanola, *n*-heksana, metilen-hlorida, a ponekad se dodaju i biljna ulja [27]. Najčešće korišćeni kosolvent jeste etanol zbog svoje umerene polarnosti i manje toksičnosti. Njegova uloga jeste da poveća afinitet superkritičnog fluida prema umereno polarnim jedinjenjima, kao što su npr. polifenolna. Međutim, iako dodatak modifikatora pozitivno utiče na prinos ekstrakcije, postavlja se pitanje njegovog uklanjanja iz ekstrakta nakon završetka procesa.

Srednji prečnik čestica biljnog materijala takođe ima uticaj na prinos procesa. Usitnjavanjem materijala se prevazilazi problem prenosa mase iz čvrste faze, ali prilikom preteranog usitnjavanja može doći do gubitaka lako isparljivih jedinjenja [24].

2.2 Biljni metabolizam i metaboliti

Metabolizam se može uopšteno podeliti na primarni i sekundarni. Modifikacija i sinteza ugljenih hidrata (šećera), proteina (amino kiselina), masnih kiselina (masti) i nukleinskih kiselina čine primarni metabolizam svakog organizma. Jedinjenja koja su deo ovih procesa smatraju se primarnim metabolitima. Sekundarni metabolizam predstavljaju procese koji su specifični za određene organizme ili grupe organizama, dok sekundarni metaboliti samim tim imaju ograničenu distribuciju u prirodi. Najčešće gradivne jedinice sekundarnog metabolizma jesu acetil-koenzim

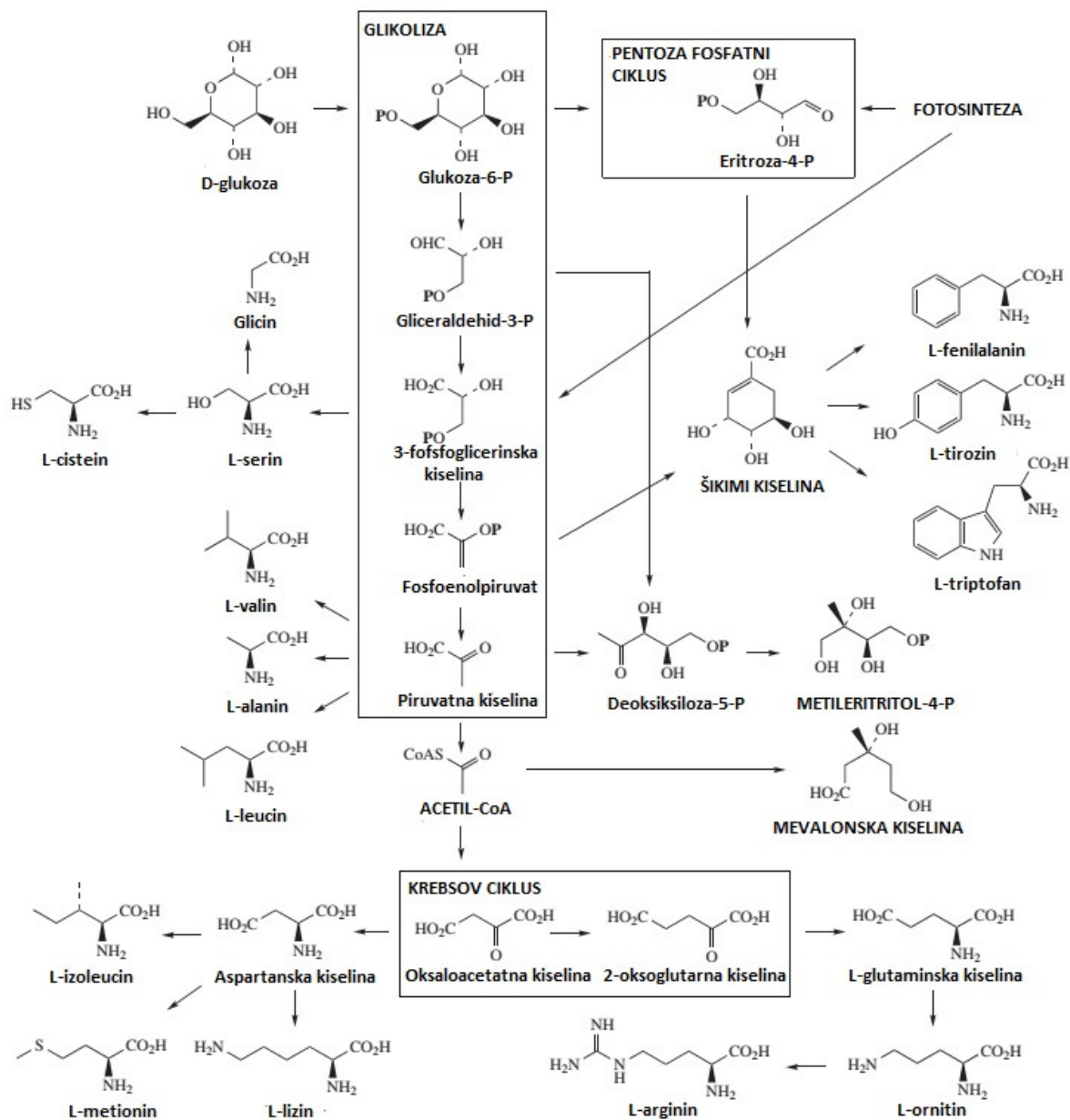
A (acetil-CoA), šikimi kiselina, mevalonska kiselina i metil-eritritol fosfat (MEP). Sva navedena jedinjenja jesu deo acetatnog, šikimatnog, mevalonatnog i MEP metaboličkog puta [28].

Acetil-CoA nastaje oksidativnom dekarboksilacijom piruvatne kiseline, a nastaje i β -oksidacijom masnih kiselina. Značajni sekundarni metaboliti koji nastaju kao posledica odvijanja acetatnog puta jesu fenoli, prostaglandini, makrolidni antibiotici, kao i različite masne kiseline. Šikimi kiselina nastaje iz fosfoenolpiruvata i eritroze-4-fosfata. Tokom šikimatnog puta nastaju različiti fenoli, derivatni cinaminske kiseline, lignani i alkaloidi. Mevalonska kiselina nastaje iz tri molekula acetil-CoA. Mevalonatni put kanališe acetate u drugom smeru u odnosu na acetatni put. MEP nastaje iz piruvatne kiseline i gliceraldehid-3-fosfata. Mevalonatni i MEP sintetički putevi su zajedno odgovorni za sintezu različitih terpenoida i steroida. Treba naglasiti da su pored navedenih jedinjenja kao gradivni blokovi zastupljene i amino kiseline koje su često prisutne u procesima sinteze prirodnih proizvoda, među kojima su proteini, peptidi, alkaloidi i različiti antibiotici. Sumarni šematski prikaz primarnog i sekundarnog metabolizma dat je na slici 8 [28]. U nastavku ovog poglavlja biće reči o pojedinim klasama metabolita koji su bili deo razmatranja ove doktorske disertacije, a to su masne kiseline, etarska ulja i polifenolna jedinjenja.

2.2.1 Masne kiseline

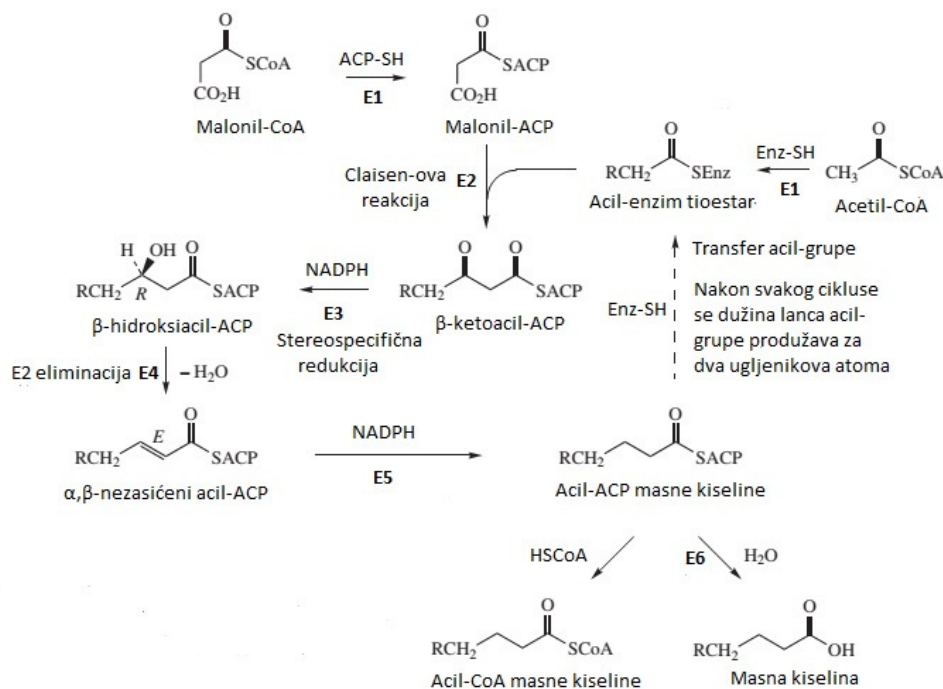
Masne kiseline nastaju u acetatnom putu delovanjem enzima sintaze masnih kiselina (engl. Fatty acid synthase; FAS). Kod gljiva i životinja ovaj enzim se naziva FAS tipa I, dok kod bakterija i biljaka deluje FAS tipa II.

Acetil-CoA i malonil-CoA nisu direktno uključeni u proces kondenzacije, već se oni prethodno prevode u tio-estre koji su vezani za enzim nosač (engl. Acyl carrier protein; ACP). Šematski prikaz sinteze masnih kiselina dat je na slici 9 [28].



Slika 8. Šematski prikaz primarnog i sekundarnog metabolizma

Claisen-ova kondenzacija koja sledi daje acetoacetyl-ACP (β -ketoacil-ACP; R = H), koji se dalje redukuje stereospecifično u odgovarajući β -hidroksi-estar. Ova redukcija se odvija uz prisustvo NADPH (redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata). Nakon redukcije dolazi do eliminacije molekula vode pri čemu se formiraju *trans*- α,β -nezasićeni estri.

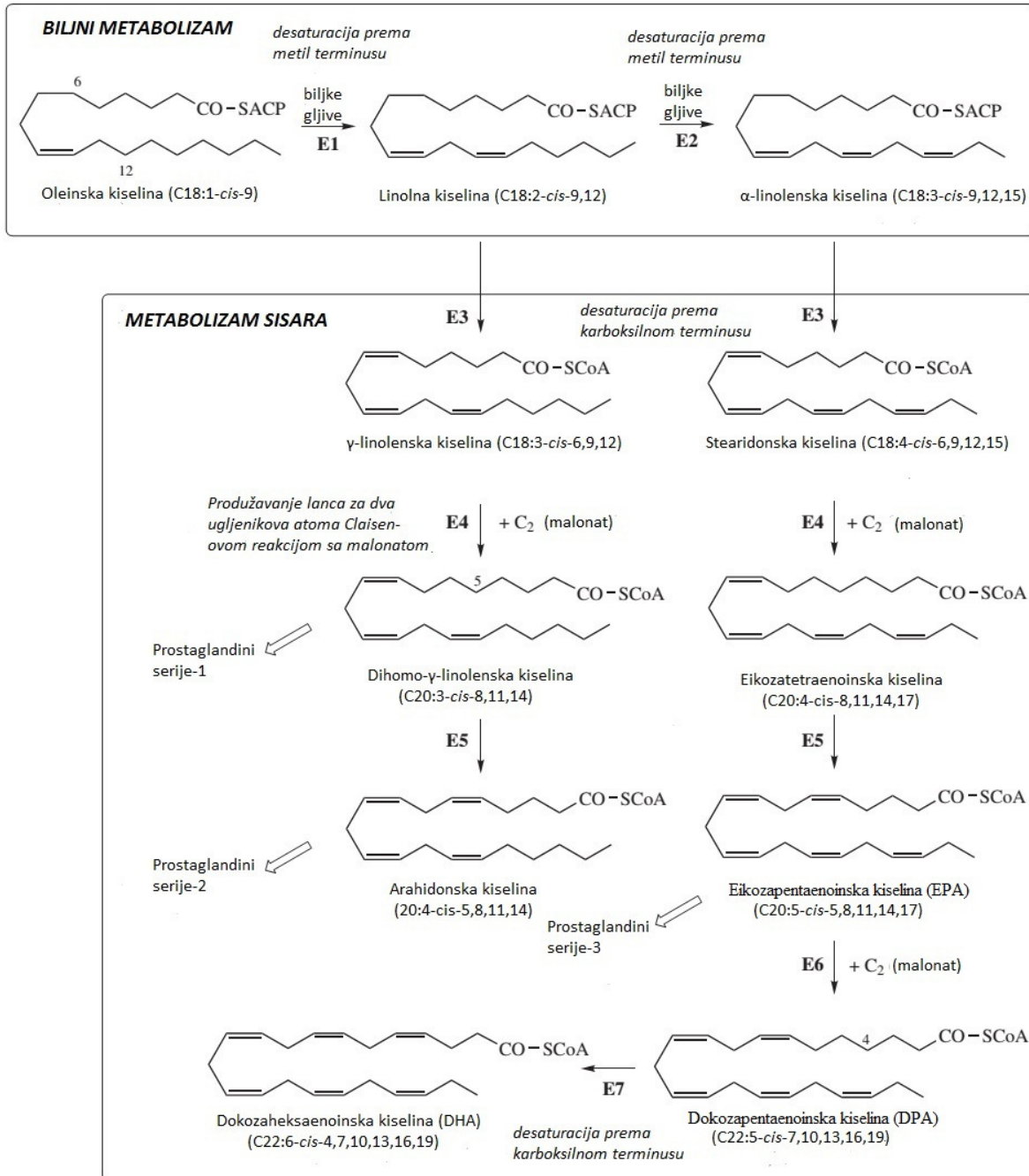


Slika 9. Šematski prikaz procesa sinteze masnih kiselina (E1: malonil/acetil transferaza, E2: ketosintaza, E3: ketoreduktaza, E4: dehidrataza, E5: enoil reduktaza, E6: tioesteraza, ACP: Acil-transferni protein)

Eliminacija se odvija prema E2 mehanizmu uz prisustvo enzima dehidrataze. Nakon dehidratacije sledi redukcija dvostruke veze u prisustvu NADPH, pri čemu nastaje zasićeni acil-ACP. Ovaj molekul se može vratiti nazad procesom transfera acil-grupe čime će se ugljovodonični niz produžiti za dva ugljenikova atoma ili se može prevesti u acil-CoA, odnosno slobodnu masnu kiselinu dejstvom tioestrase.

Nezasićene masne kiseline mogu nastati na više načina. Međutim, kod većine organizama one nastaju desaturacijom odgovarajućih zasićenih masnih kiselina. Ovo je obično praćeno daljom desaturacijom koja se vrši u nekoliko stupnjeva. Većina eukariota poseduje Δ^9 -desaturazu koja uvodi *cis* dvostruku vezu u molekulu masne kiseline, a potreban joj je kiseonik i NADPH ili NADH kofaktor. Najčešći supstrat jeste stearoil-tioestar od kojeg nastaje oleoil-tioestar, odnosno od zasićene stearinske kiseline (C18:0) nastaje oleinska kiselina (C18:1). Sledeća pozicija dvostruke veze zavisi dalje od organizma u kojem se proces sinteze odvija. Enzimi u organizmima koji nisu sisari teže da uvedu dvostruku vezu između već postojeće dvostruke veze i metil

terminalne grupe. Primer je prevođenje oleinske kiseline u linolnu, koja se zatim prevodi u α -linolensku kiselinu (slika 10).



Slika 10. Sinteza nezasićenih masnih kiselina kod biljaka i sisara (E1: Δ^{12} -desaturaza, E2: Δ^{15} -desaturaza, E3: Δ^6 -desaturaza, E4: C₁₈ elongaza, E5: Δ^5 -desaturaza, E6: C₂₀ elongaza, E7: Δ^4 -desaturaza)

Sa druge strane, enzimi prisutni kod sisara uvode dvostruku vezu ka karboksilnoj terminalnoj grupi. Pošto kod sisara nedostaju Δ^{12} - i Δ^{15} -desaturaze, linolna i α -linolenska kiselina su esencijalne kiseline. One su neophodne za sintezu polinezasićenih kiselina od kojih nastaju prostaglandini, a pošto ne mogu da ih sintetišu, sisari ih moraju unositi putem ishrane [28,29]. Na slici 10 prikazani su procesi biosinteze nezasićenih kiselina kod biljaka i sisara [28].

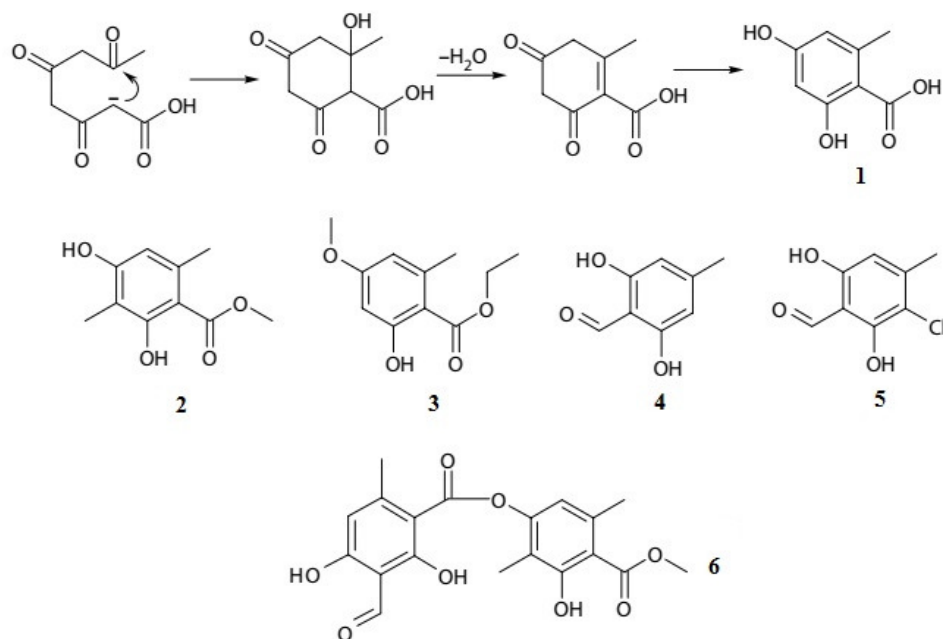
U prirodi se masne kiseline nalaze obično u obliku estara. Mogu se naći zasićene, nezasićene, omega-3, omega-6 ili parcijalno hidrogenovane. Same masti predstavljaju najefikasniji oblik za skladištenje energije. Takođe, masne kiseline ulaze u sastav ćelijske membrane u obliku fosfolipida, imaju značajnu ulogu u održavanju pravilnog funkcionisanja mozga, učestvuju u procesu prenosa signala u obliku diacilglicerola, učestvuju u sintezi eikosanoida, itd. Nezasićene masne kiseline snižavaju nivoe LDL-a (lipoprotein niske gustine) i holesterola, dok zasićene masne kiseline podižu njihove nivoe [29]. Dokazano je da omega-3 i omega-6 masne kiseline pokazuju anti-inflamatorno, anti-trombično, anti-aritmično, hipolipidemijsko i vazodilatatorno dejstvo. Osim toga, pokazalo se da n-3 masne kiseline predstavljaju sekundarne molekule u prevenciji različitih bolesti kao što su koronarna oboljenja, hipertenzija, dijabetes tipa II, bubrežna oboljenja, reumatoidni artritis, Crohn-ova bolest i hronična oboljenja pluća [30], a smanjuju i rizik od pojave srčanih oboljenja i kancera [31,32].

2.2.2 Etarska ulja

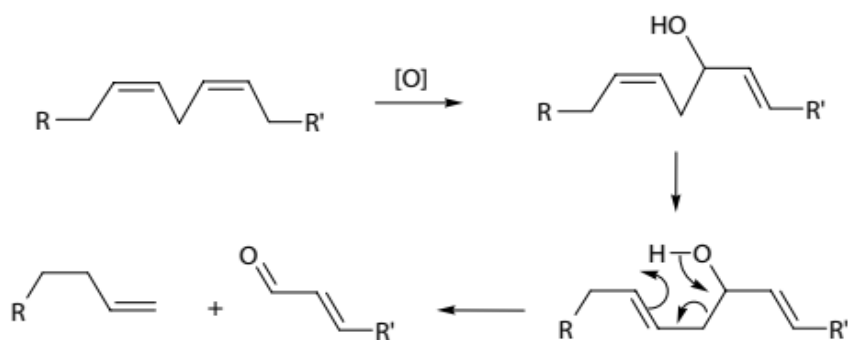
Kada su u pitanju etarska ulja i njihov sastav, najvažniji su terpenoidi, a zatim šikimati. Određeni poliketidi, kao i neki alkaloidi su takođe važni za etarska ulja, međutim, najvažniji su već spomenuti terpenoidi. Iz tog razloga će pažnja biti više usmerena ka biosintezi terpenoida, dok će najvažniji predstavnici šikimata i poliketida biti spomenuti u nastavku poglavlja.

Odredene poliketidne komponente etarskih ulja nastaju reakcijama kondenzacije gde nastaju prstenovi (slika 11) [33]. Intramolekularna aldolna kondenzacija praćena enolizacijom daje orselinsku kiselinu (slika 11, jedinjenje **1**). Druga značajna jedinjenja jesu metil-3-metilorselinat (jedinjenje **2**) i etil-everninat (jedinjenje **3**). Atranol (jedinjenje **4**) i hlór-atranol (jedinjenje **5**) su senzibilizatori, dok je atranorin (jedinjenje **6**) alergen.

Pored ciklizacije, može doći i do oksidacije masnih kiselina koja je praćena laktonizacijom. Ovim putem nastaju aldehidi ili alkoholi (slika 12) [33].

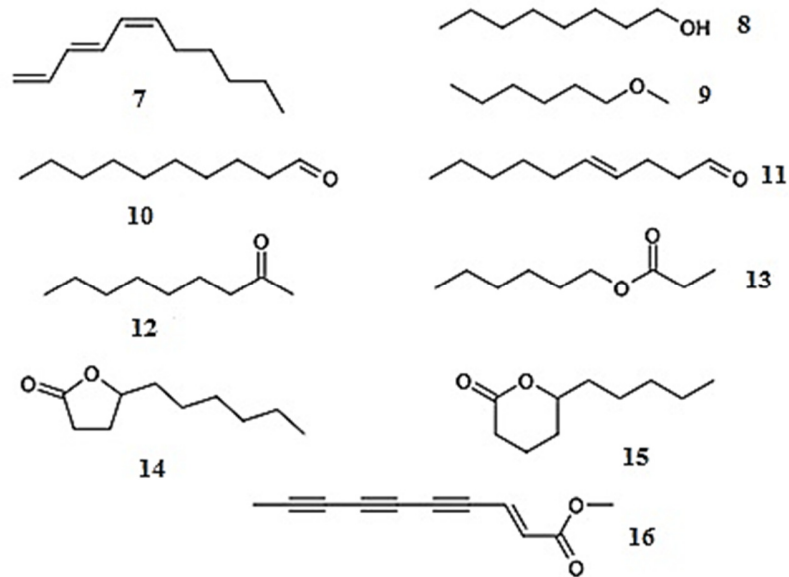


Slika 11. Biosinteza poliketidnih komponenti



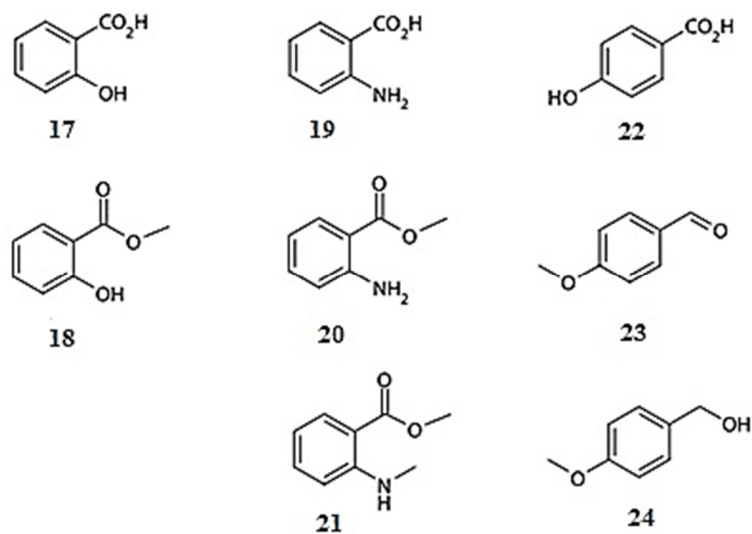
Slika 12. Proces fragmentacije nezasićenih masnih kiselina uz nastanak aldehida

Neki primeri lipidnih derivata prikazani su na slici 13. Tako može nastati 1,3,5-undekatrien (jedinjenje **7**), 1-oktanol (jedinjenje **8**), metil-heksil-etar (jedinjenje **9**). Alhidi takođe predstavljaju značajnu mirisnu komponentu, i među njima su dekanal (jedinjenje **10**) i (*E*)-4-dekanal (jedinjenje **11**). Predstavnik ketona je 2-nonanon (jedinjenje **12**), dok je heksil-propionat (jedinjenje **13**) predstavnik estara. Pored navedenih klasa nađeni su i laktoni, među kojima su γ -dekalakton (jedinjenje **14**) i δ -dekalakton (jedinjenje **15**). Predstavnik acetilena je metil-deka-2-en-4,6,8-triinoat (jedinjenje **16**).



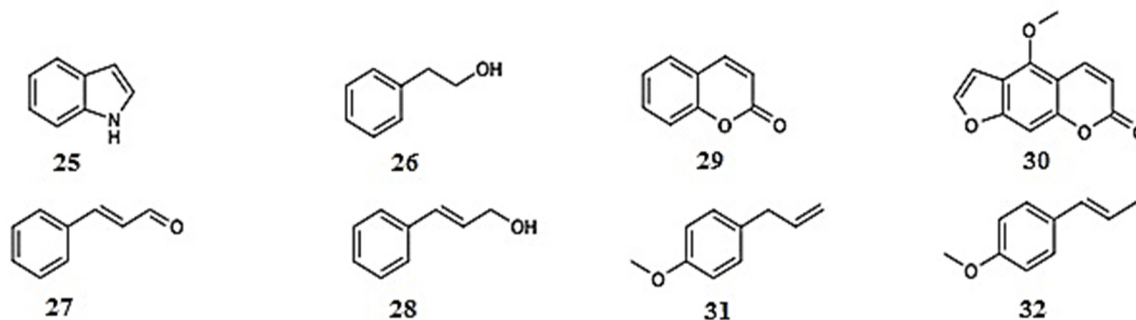
Slika 13. Odabrani lipidni derivati (komponente etarskih ulja)

Derivati šikimi kiseline koji su nađeni u etarskim uljima mogu se podeliti u nekoliko grupa. To su derivati benzojeve kiseline, derivati cinaminske kiseline i derivati ferulne kiseline. U derivate benzojeve kiseline koji su prikazani na slici 14 spadaju salicilna kiselina (jedinjenje **17**) i njegov derivat metil-salicilat (jedinjenje **18**). Tu spadaju i antranilna kiselina, njen metil estar i dimetil-antranilat (jedinjenja **19**, **20** i **21**). Na slici su prikazane i strukture *p*-hidroksibenzojeve kiseline (jedinjenje **22**), anisaldehida (jedinjenje **23**) i anisil-alkohola (jedinjenje **24**).



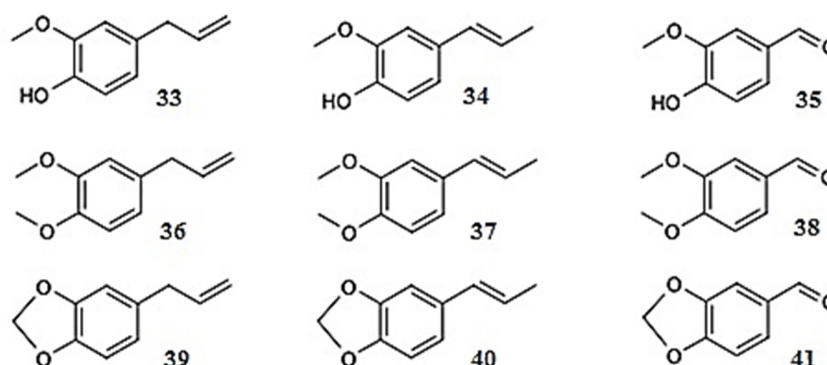
Slika 14. Derivati benzojeve kiseline

Strukture derivata cinaminske kiseline i kumarina, kao i indola (jedinjenje 25) i 2-fenil-etanola (jedinjenje 26) prikazane su na slici 15. Od derivata inaminske kiseline prikazani su cinamaldehyd (jedinjenje 27) i cinamil-alkohol (jedinjenje 28). Tipičan derivat kumarina (jedinjenje 29) je bergapten (jedinjenje 30), a od derivata cinaminske kiseline prikazani su metil-kavikol (jedinjenje 31) i anetol (jedinjenje 32).



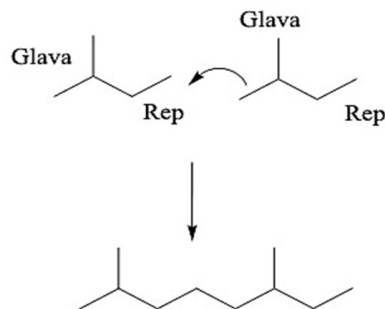
Slika 15. Strukture odabranih derivata šikimi kiseline

Darivati ferulne kiseline nađeni u etarskim uljima prikazani su na slici 16. Među njima su eugenol (jedinjenje 33), izoeugenol (jedinjenje 34), vanilin (jedinjenje 35), metil-eugenol (jedinjenje 36), metil-izoeugenol (jedinjenje 37), veratraldehyd (jedinjenje 38), safrol (jedinjenje 39), izosafrol (jedinjenje 40) i heliotropin (jedinjenje 41).



Slika 16. Derivati ferulne kiseline nađeni u etarskim uljima

Terpeni su po hemijskoj strukturi jedinjenja koja se sastoje od izoprenskih jedinica (2-metilbutadien) koje se kupluju najčešće po sistemu glava-rep (slika 17).



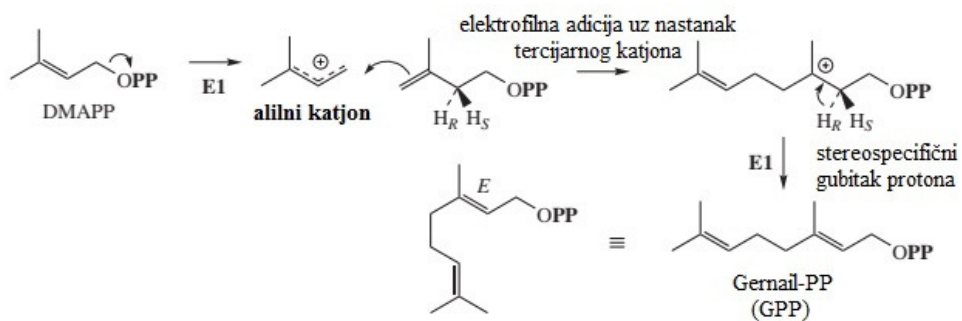
Slika 17. Kuplovanje izoprenskih jedinica

Prema broju ugljenikovih atoma, odnosno izoprenskih jedinica u strukturi, terpeni se mogu podeliti u nekoliko grupa:

- Hemiterpeni koji se sastoje od 5 ugljenikovih atoma, odnosno jedne izoprenske jedinice,
- Monoterpeni koji su svojoj strukturi sadrže 10 ugljenikovih atoma, odnosno dve izoprenske jedinice,
- Seskviterpeni koji sadrže 15 ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem tri izoprenske jedinice,
- Diterpeni koji sadrže 20 ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem četiri izoprenske jedinice,
- Sesterpeni koji sadrže u svojoj strukturi 25 ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem pet izoprenskih jedinica,
- Triterpeni koji sadrže u svojoj strukturi 30 ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem šest izoprenskih jedinica,
- Tetraterpeni koji sadrže u svojoj strukturi 40 ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem osam izoprenskih jedinica,
- Politerpeni koji sadrže u svojoj strukturi više od 40 ugljenikovih atoma, odnosno nastaju kuplovanjem najmanje 9 izoprenskih jedinica.

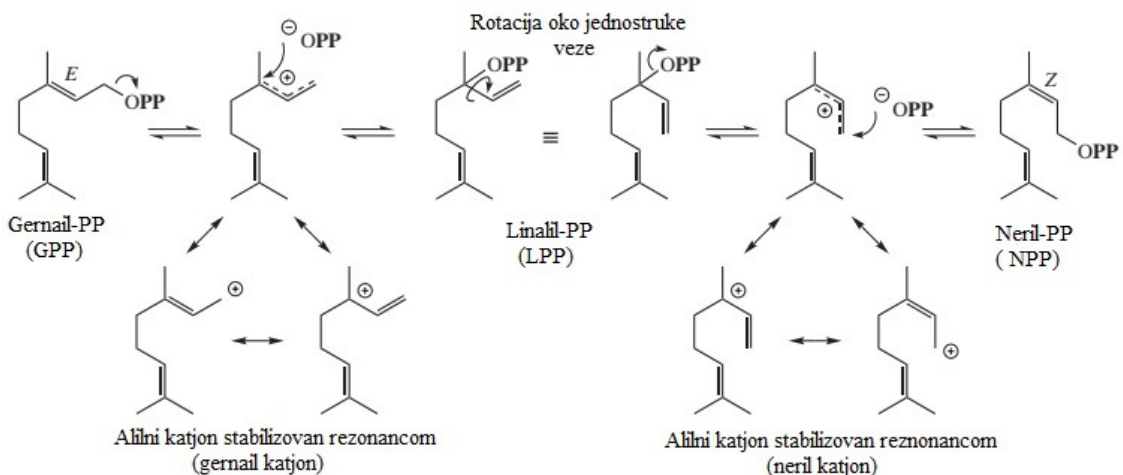
U lako isparljivim frakcijama etarskih ulja nalaze se uglavnom monoterpeni, odnosno terpeni sa deset ugljenikovih atoma, dok se u teže isparljivim frakcijama uglavnom nalaze terpeni koji imaju 15 i više ugljenikovih atoma. U ovom poglavlju će pažnja biti posvećena monoterpenima kao

najvažnijim predstavnicima terpena. Pre svega, treba naglasiti da sam izopren ne učestvuje u procesu biosinteze ovih jedinjenja, već da aktivne izoprenske jedinice predstavljaju dva estra: dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) i izopentenil-pirofosfat (IPP). Ova dva intermedijera mogu nastati kao produkti mevalonatnog ili MEP metaboličkog puta [28,33]. Daljom kombinacijom ova dva jedinjenja koja je katalizovana enzimom, dobija se geranil-pirofosfat (GPP), što je prikazano na slici 18 [28].

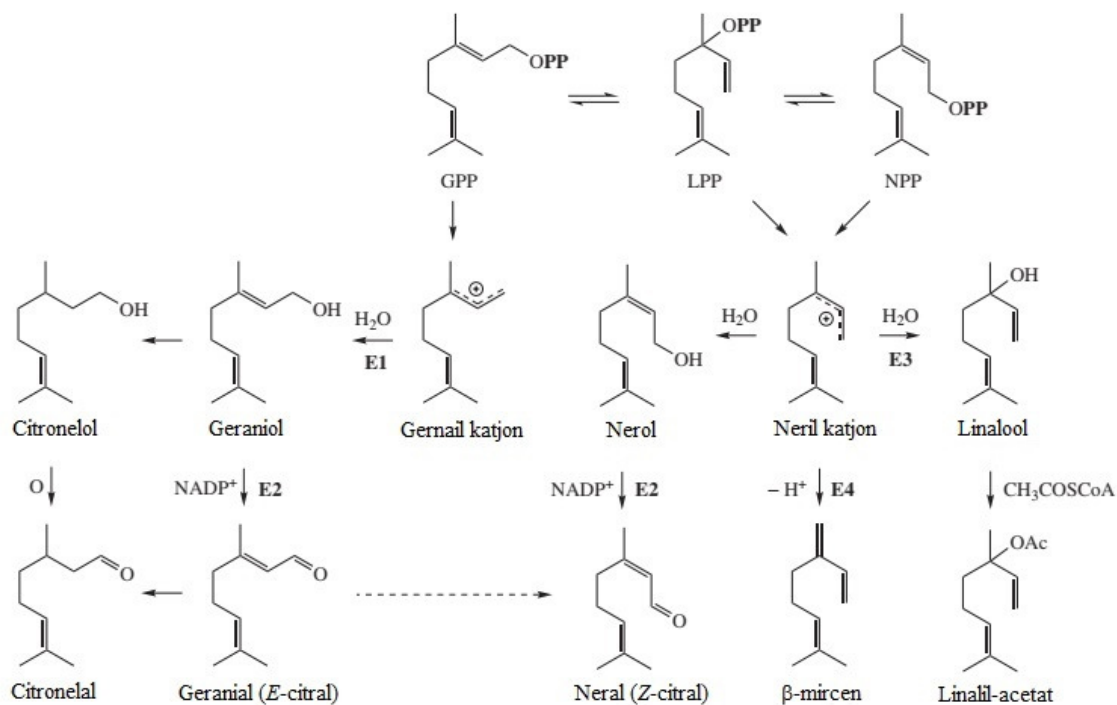


Slika 18. Biosinteza geranil-pirofosfata (E1: geranil-difosfat sintaza)

Sa slike se može primetiti da dolazi do jonizacije DMAPP pri čemu nastaje alilni katjon, koji sa IPP uz gubitak protona daje GPP. Daljim premeštanjima i rotacijama unutar molekula GPP nastaju linalil-PP (LPP) i neril-PP (NPP) (slika 19), koji daljim transformacijama daju niz jedinjenja (slika 20) [28].

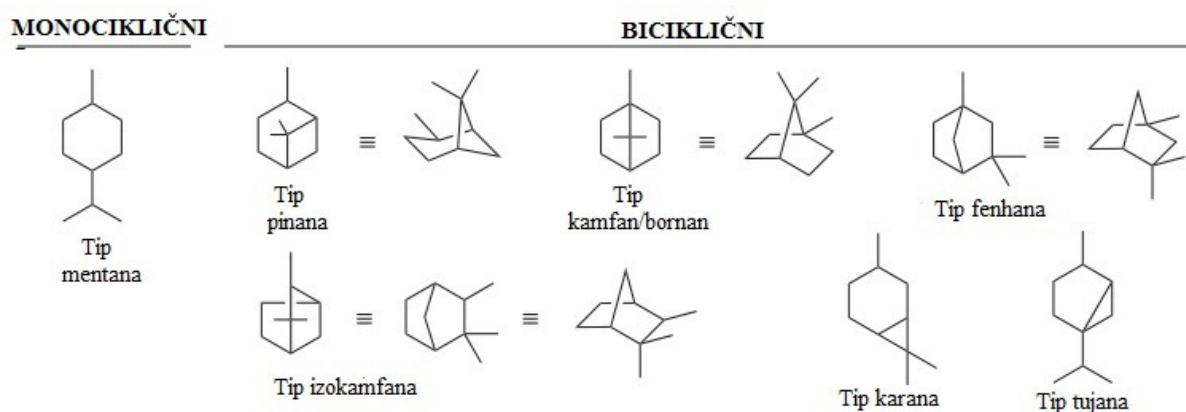


Slika 19. Transformacija geranil-PP u linalil-PP i neril-PP



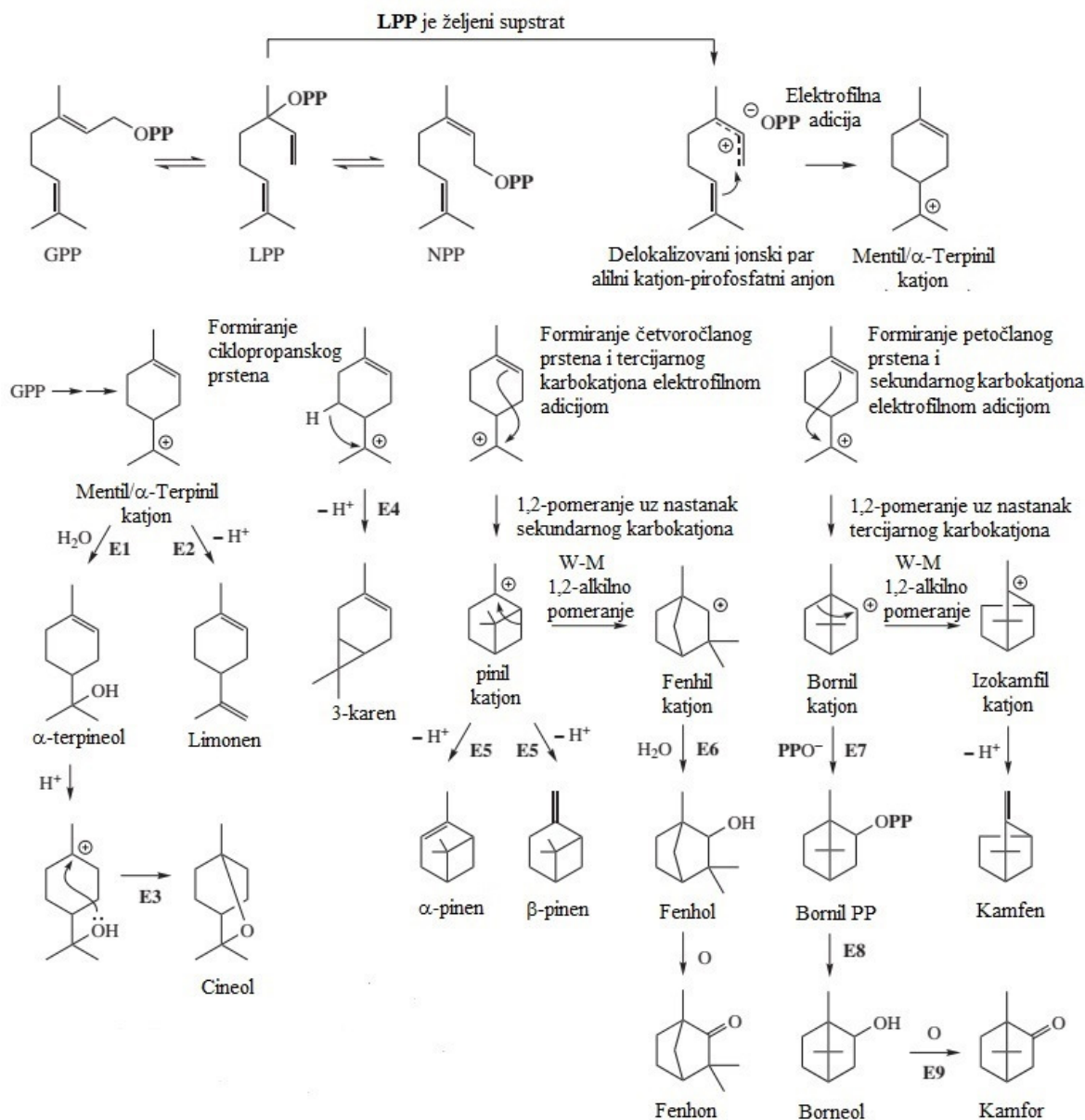
Slika 20. Sinteza monoterpena iz geranil-PP (E1: geraniol sintaza, E2: geraniol dehidrogenaza, E3: linalool sintaza, E4: mircen sintaza)

Sa druge strane, ciklizacijom nastaje ceo spektar jedinjenja u vidu mono- ili bicikličnih sistema. Najvažniji tipovi cikličnih sistema prikazani su na slici 21 [28].



Slika 21. Tipovi cikličnih sistema kod monoterpena

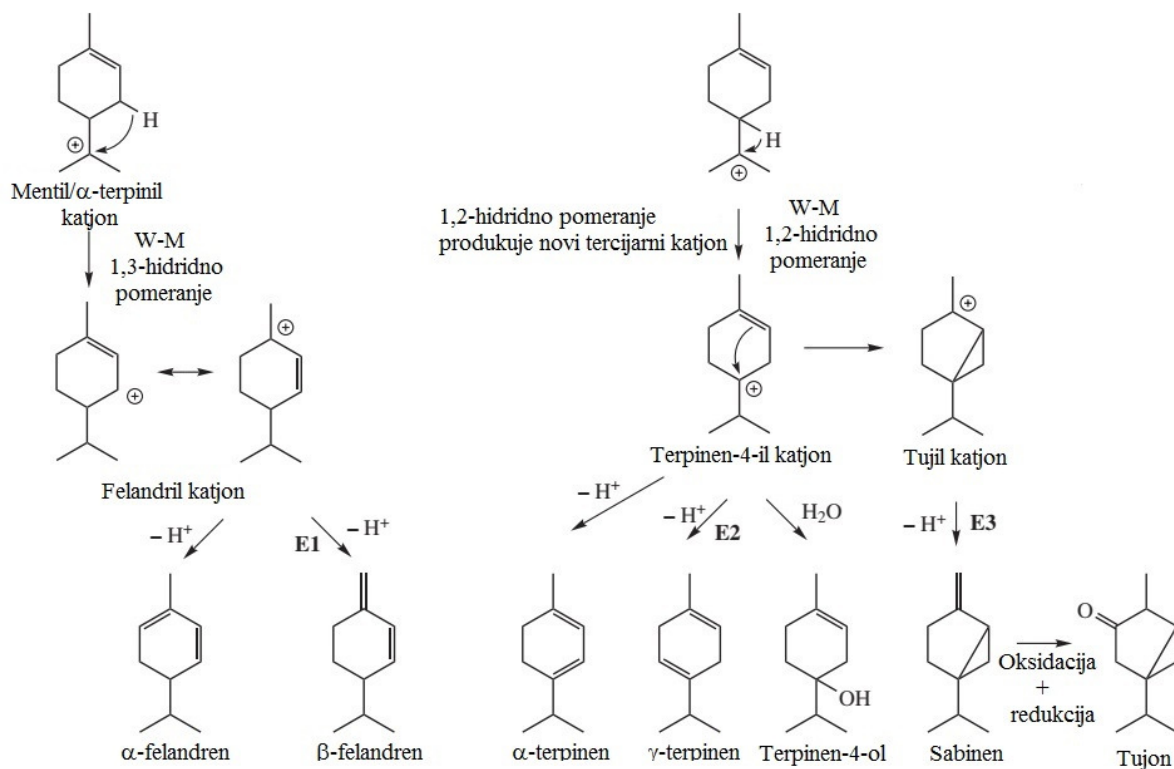
Ciklizacija se odvija uz dejstvo enzima monoterpen ciklaze. Pokazalo se da su sva tri pirofosfata, odnosno GPP, LPP i NPP potencijalni supstrat za ovaj enzim. Međutim, najpogodniji supstrat za reakciju ciklizacije jeste LPP. Ovo ukazuje na mogućnost da sam enzim prvo vrši izomerizaciju supstrata, koja je praćena ciklizacijom. Ovi procesi su šematski prikazani na slici 22 [28].



Slika 22. Šematski prikaz biosinteze cikličnih monoterpena (E1: α -terpineol sintaza, E2: limonen sintaza, E3: 1,8-cineol sinataza, E4: 3-karen sintaza, E5: pinen sintaza, E6: fenhol sintaza, E7: bornil difosfat sintaza, E8: bornil difosfat fosfohidrolaza, E9: borneol dehidrogenaza, W-M: Wagner-Meerwein premeštanje, GPP je supstrat za enzime E1-E7)

Nakon nastanka katjona iz GPP može doći do nukleofilnog napada vode pri čemu nastaje jedinjenje α -terpineol ili može doći do gubitka protona, pri čemu se formira limonen. Daljnim ciklizacijama alternativno može nastati pinil i bornil katjon. Iz pinil katjona će gubitkom protona nastati α - i β -pinen, dok će borneol nastati iz bornil katjona. Oksidacijom borneola nastaje kamfor. Sa druge strane, Wagner-Meerwein (W-M) premeštanjem dolazi do formiranja fenhil, odnosno izokamfil katjona, iz kojih nastaju fenhol, odnosno kamfen. Daljom oksidacijom fenhola nastaje fenhon.

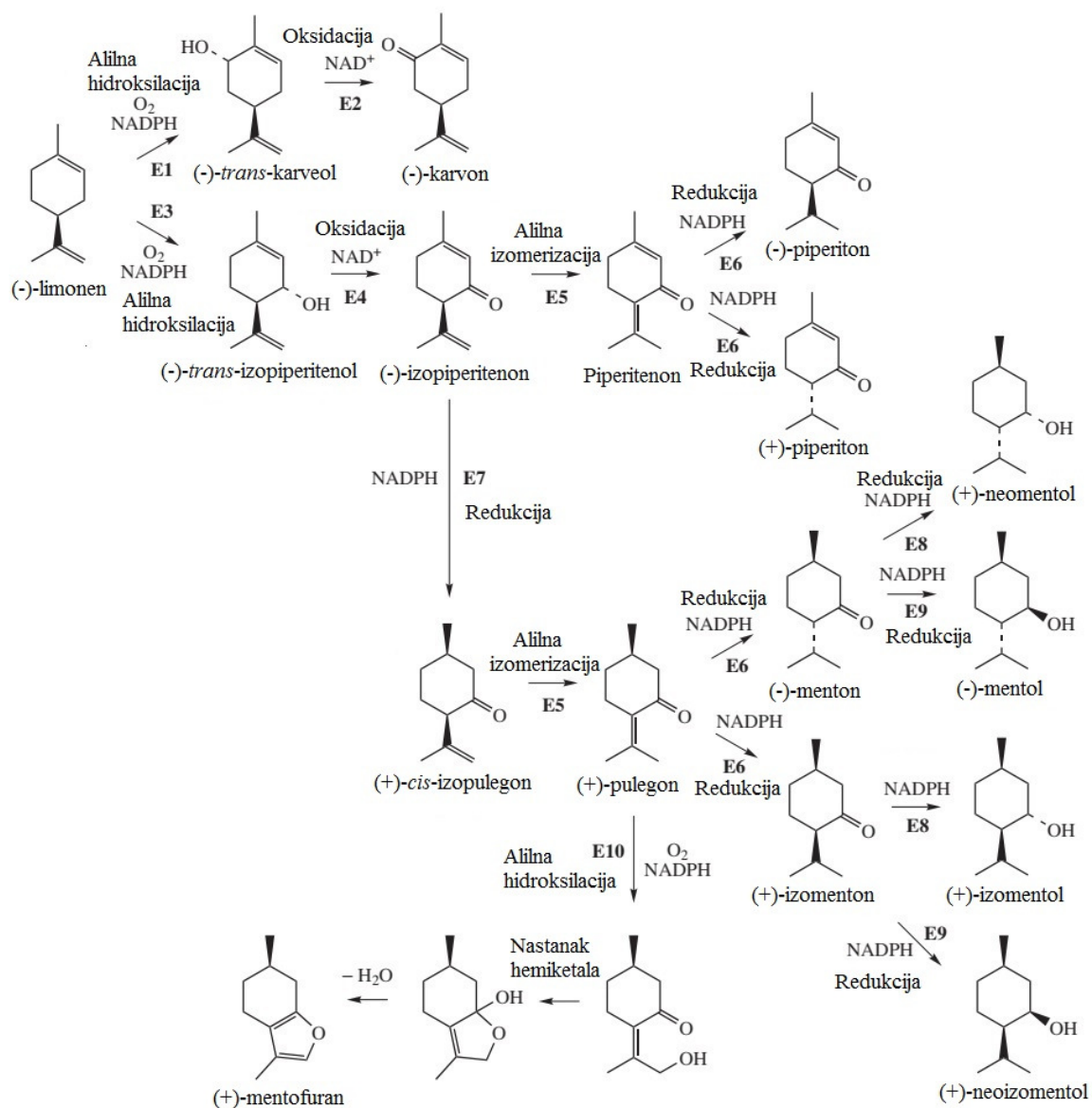
W-M hidridno premeštanje takođe vodi ka nastajanju niza cikličnih monoterpena. Šematski prikaz reakcija W-M hidridnog premeštanja dat je na slici 23 [28].



Slika 23. W-M hidridno premeštanje (E1: β -felandren sintaza, E2: γ -terpinen sintaza, E3: sabinen sintaza, GPP je supstrat za sve enzime)

Sa slike se vidi da se tercijski mentil katjon 1,3-transformacijom prevodi u felandril katjon koji je stabilizovan rezonancom. Iz njega dalje nastaju α - i β -felandren gubitkom protona. Druga mogućnost jeste 1,2-hidridno pomeranje kojim nastaje terpinen-5-il katjon iz kojeg gubitkom protona nastaju α - i γ -terpinen, dok adicijom vode nastaje terpinen-4-ol ili 4-terpineol.

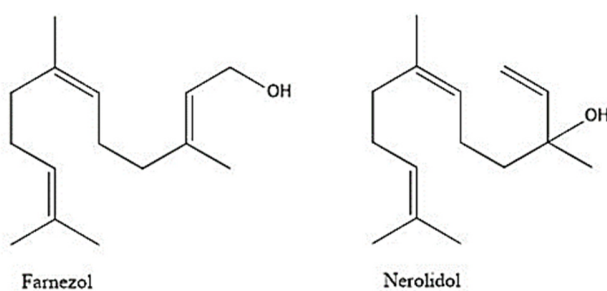
Terpinen-4-il katjon takođe može podležiti i reakciji intramolekulske ciklizacije, gde nastaje tujil katjon iz kojeg daljim gubitkom protona nastaje sabinen, dok daljom oksidacijom sabinena nastaje tujon.



Slika 24. Proces biosinteze monoterpena iz limonena kao prekursora (E1: (-)-limonen-6-hidroksilaza, E2: (-)-*trans*-karveol dehidrogenaza, E3: (-)-limonen 3-hidroksilaza, E4: (-)-*trans*-izopiperitenol dehidrogenaza, E5: (+)-*cis*-izopulegon izomeraza, E6: (+)-pulegon reduktaza, E7: (-)-izopiperitenon reduktaza, E8: (-)-menton:(+)-neomentol reduktaza, E9: (-)-menton:(-)-mentol reduktaza, E10: mentofuran sintaza)

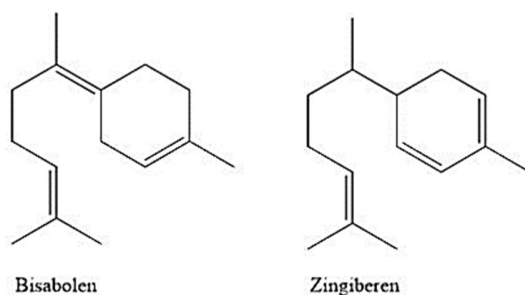
Limonen koji nastaje iz mentil katjona (slika 22) je dalji prekursor za sintezu niza jedinjenja kao što su karvon, izopiperitenon, mentol i njegovi stereoizomeri, itd. Ova jedinjenja nastaju nizom reakcija oksidacije, odnosno redukcije i hidrosilacije. Opisane reakcije su prikazane na slici 24 [28].

Seskviterpeni koji nastaju kuplovanjem tri izoprenske jedinice mogu da se podele na aciklične, biciklične i triciklične. Od velikog broja alicikličnih terpena iz ove grupe značajniji su farnezol i nerolidol koji se upotrebljavaju kao mirisne komponente u farmaceutskoj industriji. Strukture ova dva terpena prikazane su na slici 25.



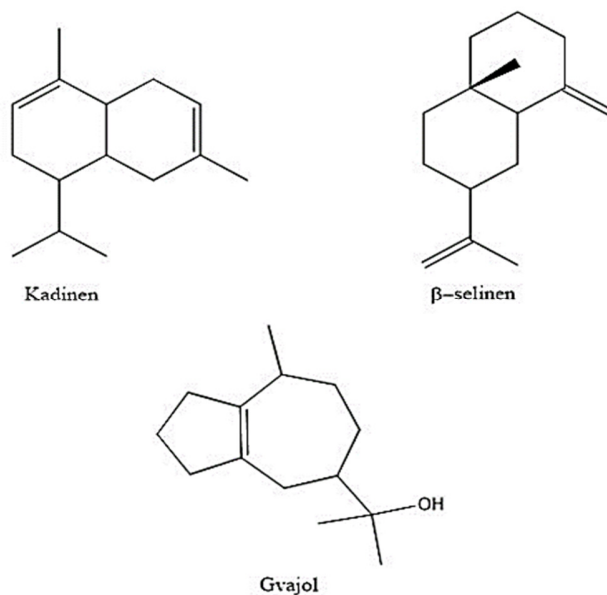
Slika 25. Strukture farnezola i nerolidola

Najvažniji predstavnici monocikličnih seskviterpena su bisabolen i zingiberen. Bisabolen se može naći u etarskim uljima omorike, kamilice i limuna, dok se zingiberen nalazi u etarskom ulju đumbira. Strukture ova dva monociklična seskviterpena prikazane su na slici 26.



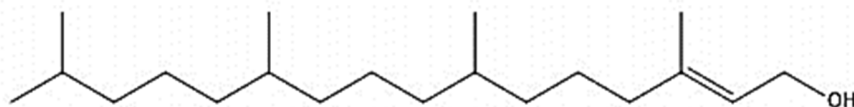
Slika 26. Strukture bisabolena i zingiberena

Najvažniji predstavnici bicikličnih seskviterpena su kadinen, β -selinen i gvajol. Oni se nalaze u mnogim etarskim uljima. Kadinen se može naći u etarskom ulju kleke, dok se β -selinen nalazi u celerovom ulju. Strukture ova tri biciklična seskviterpena prikazane su na slici 27.



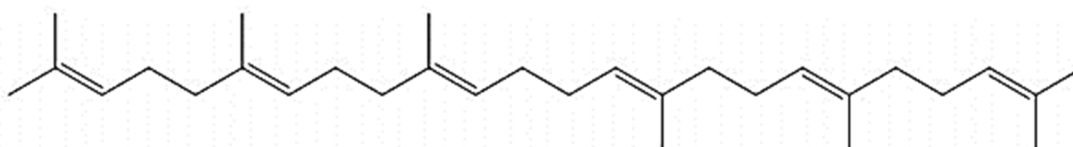
Slika 27. Strukture kadinena, β -selinena i gvajola

Najvažniji predstavnik diterpena je fitol. Ovaj alkohol u svojoj strukturi sadrži jednu dvostruku vezu, a sastoji se iz četiri izoprenske jedinice. Prvi put je dobijen hidrolizom hlorofila, a ulazi u sastav vitamina E i K₁. Struktura ovog diterpena prikazana je na slici 28.



Slika 28. Struktura fitola

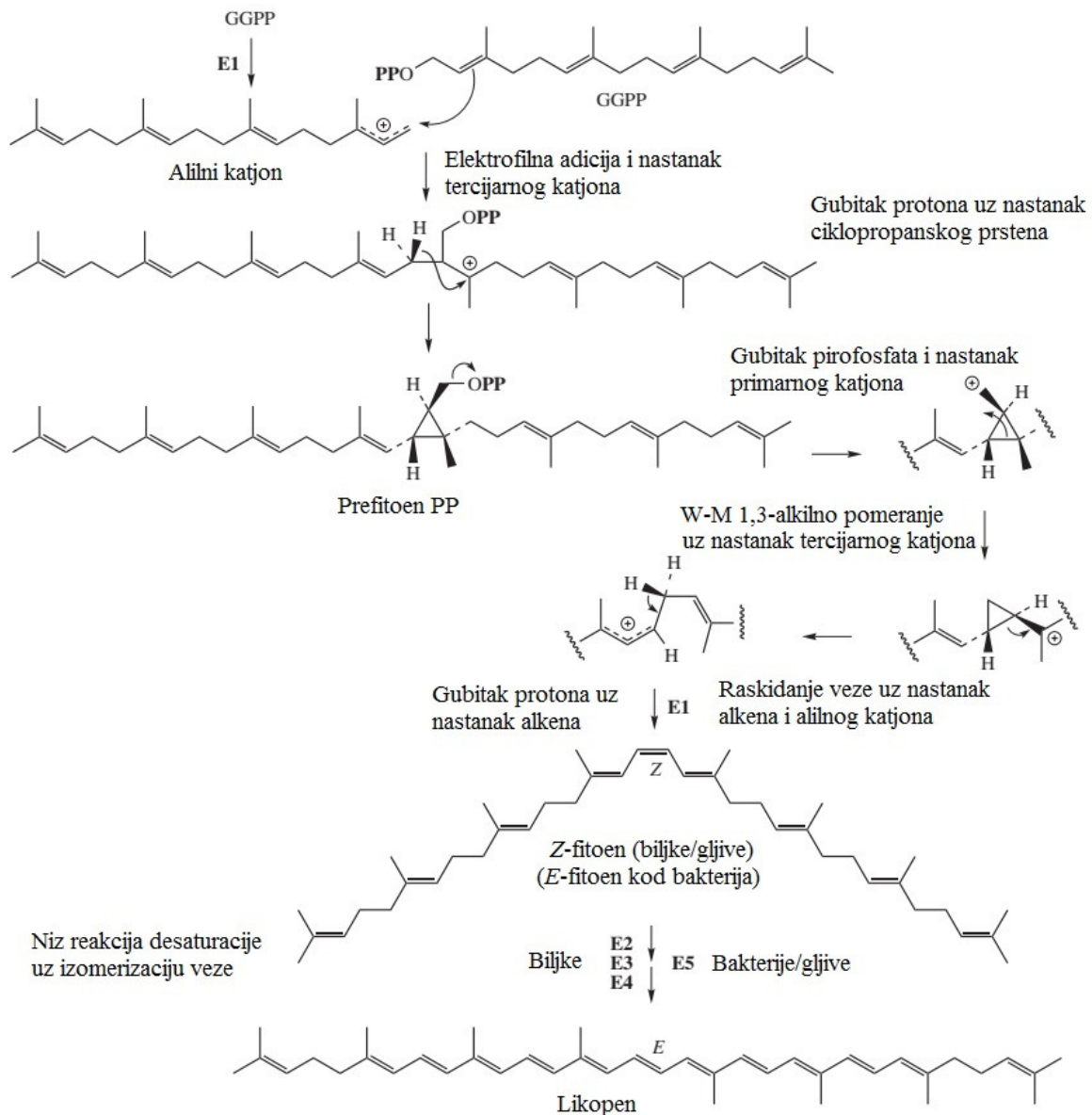
Najvažniji predstavnik triterpena je skvalen. Strukturno posmatrano, on je aciklični ugljovodonik. Prvi put je izolovan iz jetrenog ulja ajkule. Sastoji se iz šest izoprenskih jedinica i međuproizvod je u procesu biosinteze steroida. Struktura ovog terpena prikazana je na slici 29 [33].



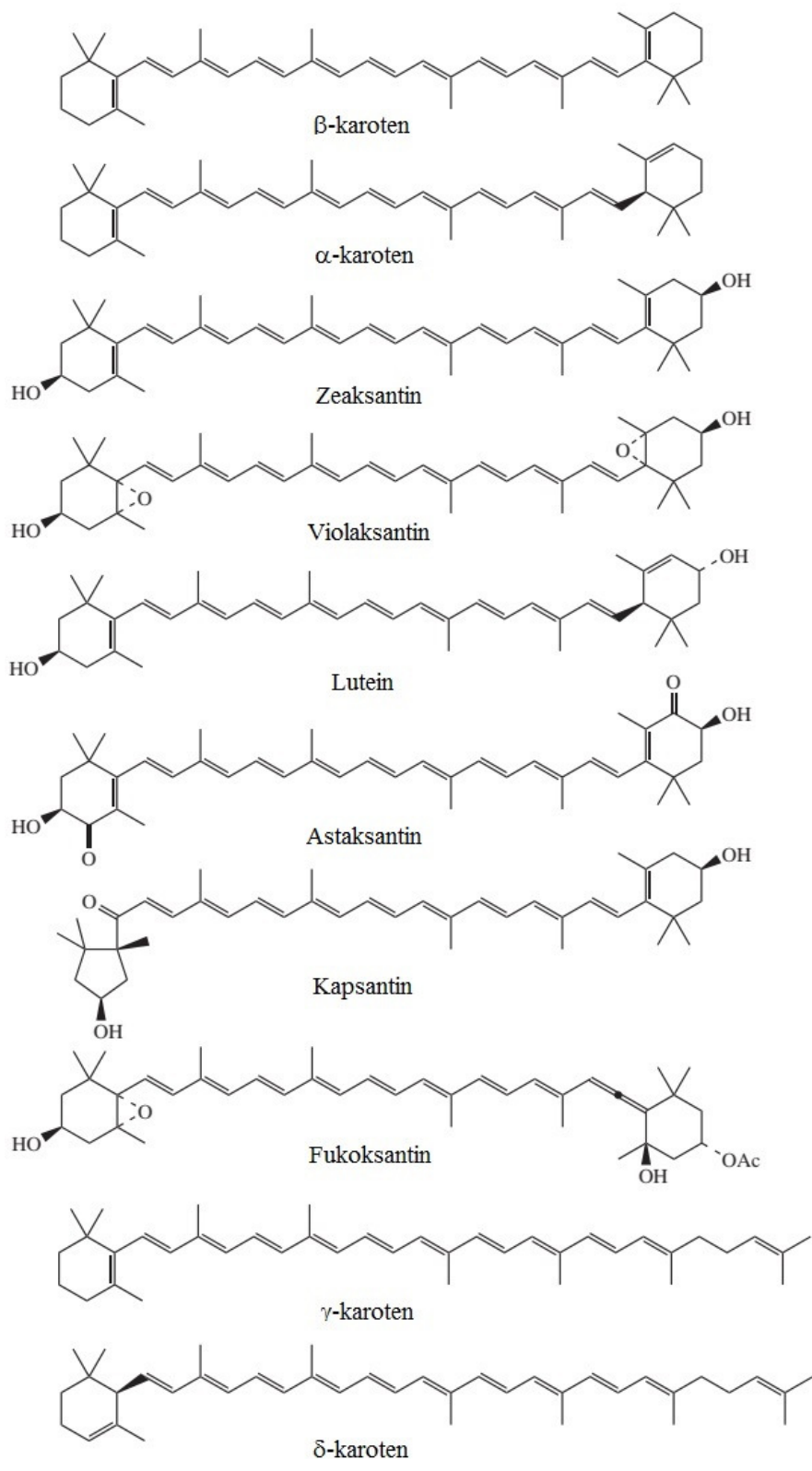
Slika 29. Struktura skvalena

2.2.3 Karotenoidi i vitamini

Karotenoidi pripadaju klasi tetraterpena, odnosno jedinjenja koja nastaju kuplovanjem 8 izoprenskih jedinica. Postoje u nekoliko stotina različitih strukturnih oblika. Ugljovodonični niz nastaje kuplovanjem dva molekula geranilgeranil-pirofosfata (GGPP) na već prethodno opisan način. Posle niza promena, koje uključuju W-M 1,3-alkilno pomeranje, gubitak protona, izomerizaciju i desaturaciju, nastaje likopen (slika 30) [28].



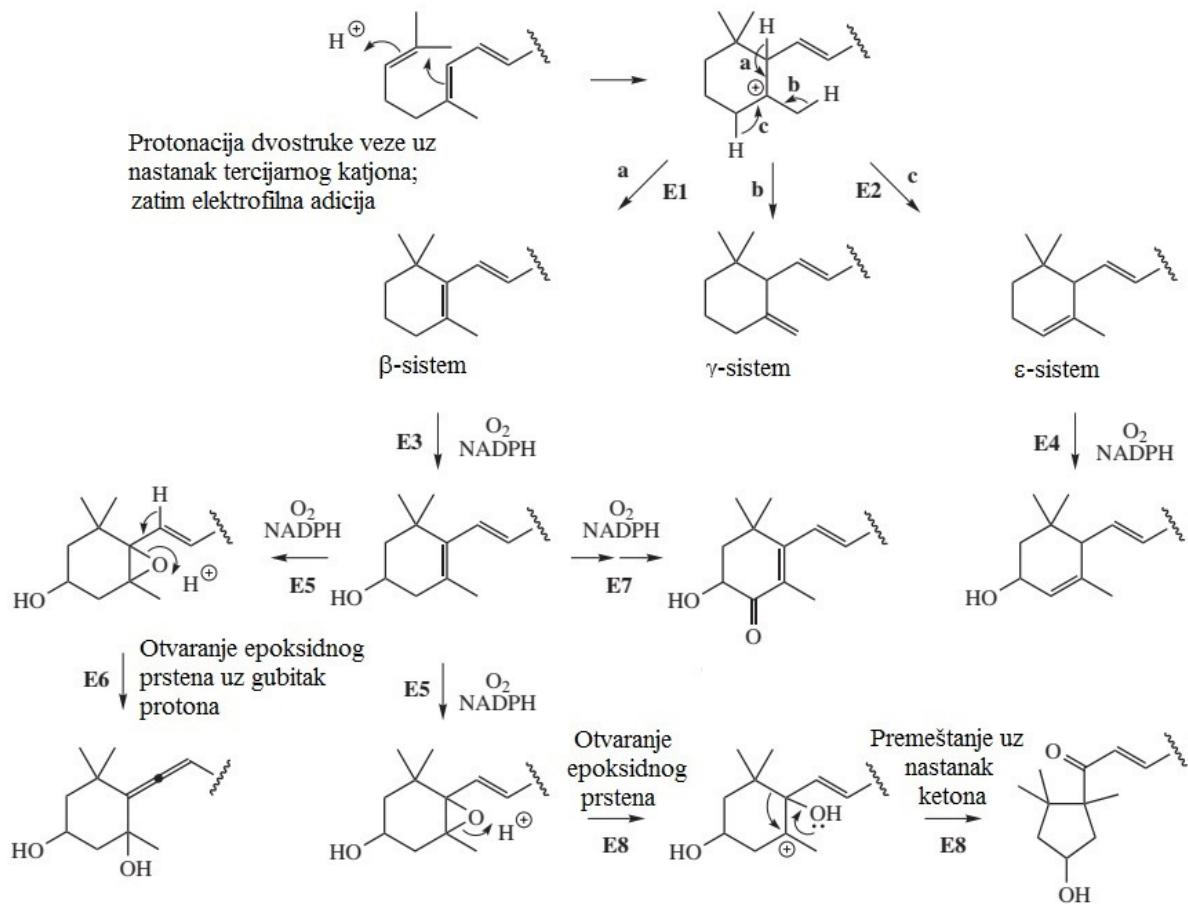
Slika 30. Biosinteza likopena (E1: fitoen sintaza, E2, E5: fitoen desaturaza, E3: ξ -karoten desaturaza, E4: karoten izomeraza)



Slika 31. Strukture odabranih karotenoida

Zahvaljujući π -elektronskom sistemu karotenoidi su obojeni i to žuto, narandžasto i crveno. Likopen je crven i zaslužan je za boju paradajza, β -karoten je pigment koji se nalazi u šargarepi. Karotenoidi se koriste i kao pigmenti u prehrambenoj industriji. Na slici 31 prikazane su strukture najpoznatijih predstavnika ove klase jedinjenja.

Sa slike se može primetiti da u strukturama karotenoida postoje i ciklični sistemi, i to tri različita: β -, γ - i ϵ -sistemi. Pored ovih, prisutni su i oksigenovani karotenoidi (ksantofili) koji sadrže oksigenovane sisteme. Biosinteza ovih sistema prstenova prikazana je na slici 32 [28].



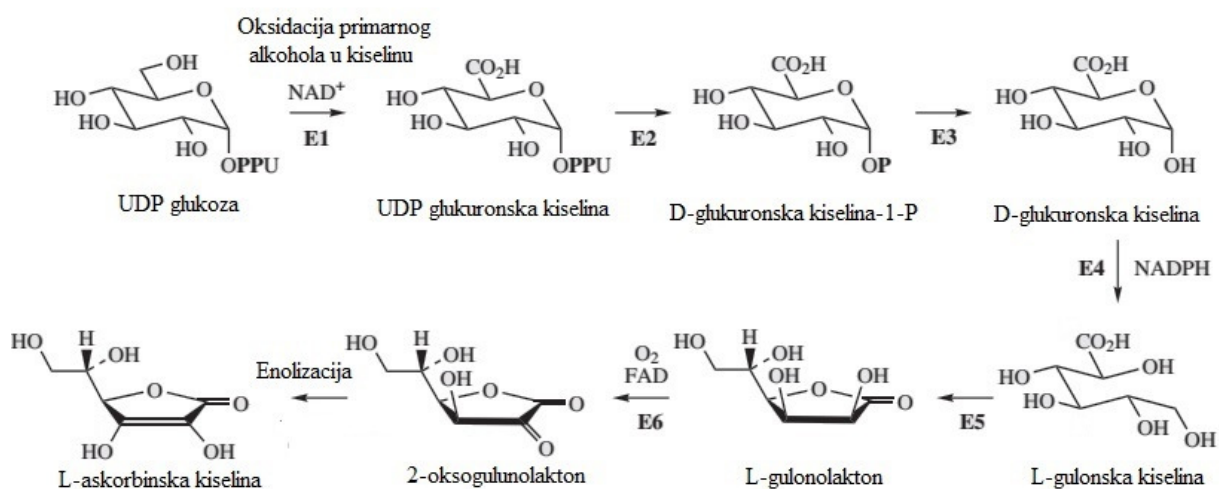
Slika 32. Biosinteza cikličnih sistema kod karotenoida (E1: β -ciklaza, E2: ϵ -ciklaza, E3: β -prsten hidroksilaza, E4: ϵ -prsten hidroksilaza, E5: zeaksantin epoksidaza, E6: neoksantin sintaza, E7: β -karoten oksigenaza, E8: kapsantin/kapsorubin sintaza)

Pored navedene upotrebe karotenoida kao pigmentata, oni imaju važnu ulogu u procesu fotosinteze kao „hvatači“ fotona i njihovi prenosioci. Osim toga, karotenoidi sprečavaju oštećenje hlorofila

uzrokovano kiseonikom, odnosno sprečavaju pojavu oksidativnog stresa i inaktivacije ovog veoma značajnog pigmenta [28,34].

Vitamini C i B serije pripadaju grupi hidrofilnih vitamina, odnosno oni su rastvorni u vodi. Vitamin C, odnosno askrobinsku kiselinu, sintetise većina životinja sa izuzetkom čoveka, drugih primata, slepih miševa i nekih ptica. Iz tog razloga oni moraju unositi ovaj vitamin putem ishrane. On je prisutan u većini voća i povrća. Brzo se razlaže na visokim temperaturama na vazduhu, a takođe i u vodenom rastvoru. Gubitak ovog vitamina izaziva oboljenje skorbut. Vitamin C ima značajnu ulogu u sintezi kolagena. On ima ulogu kofaktora u procesu hidroksilacije prolina u 4-hidroksiprolin, kao i lizina u 5-hidroksilizin. Ove reakcije katalizuje 2-oksiglutarat dioksigenaza, dok vitamin C služi za redukciju kompleksa gvožđe-kiseonik vezanog za protein. Ovaj vitamin se takođe povezuje sa procesom hidroksilacije tirozina u procesu nastajanja kateholamina, kao i sa procesom biosinteze homogentizinske kiseline koja je prekursor za sintezu tokoferola i plastohinona [28].

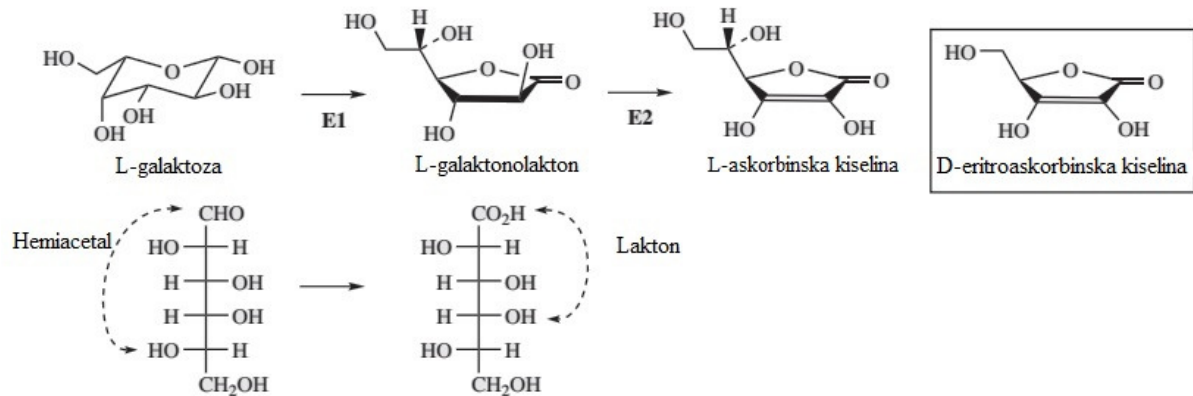
Kod životinja se vitamin C sintetise u jetri od glukoze (slika 33). Ovaj sintetički put uključuje oksidaciju pri čemu nastaje glukuronska kiselina.



Slika 33. Biosinteza vitamina C kod životinja (E1: UDP glukoza-6-dehidrogenaza, E2: UDP glukuronatpirofosforilaza, E3: glukuronokinaza, E4: glukuronat reduktaza, E5: glukunolaktonaza, E6: L-gulonolakton-oksidaza)

Nakon ovog sledi redukcija karbonilne grupe, zatim nastanak laktona praćeno oksidacijom sekundarnog alkohola u karbonil-produkt. Na kraju se odvija enolizacija čime nastaje askorbinska

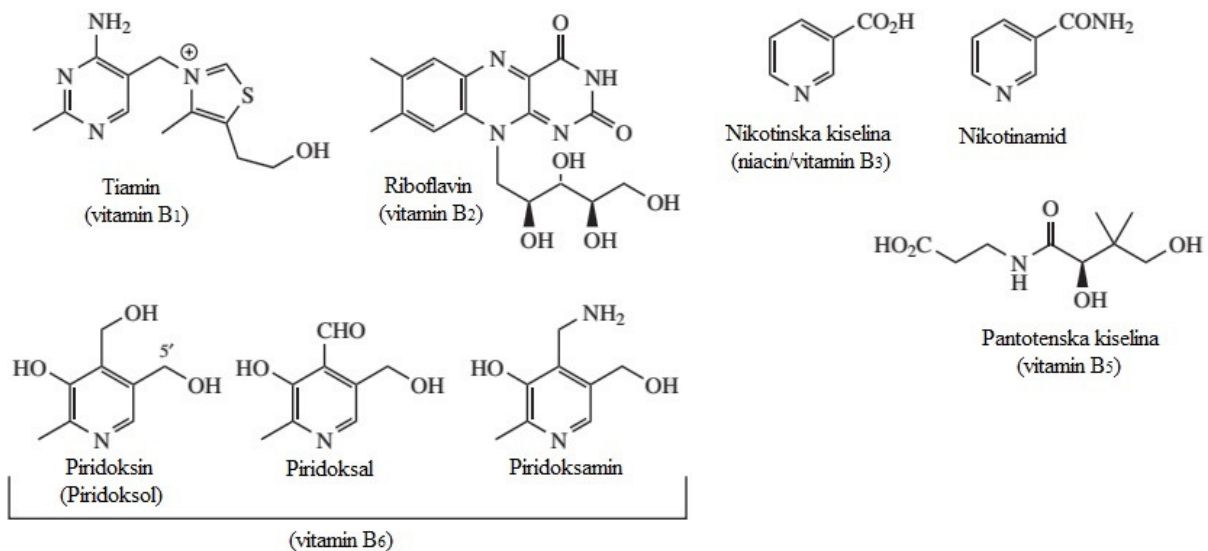
kiselina. U slučaju biljaka postoji nekoliko sintetičkih puteva, a dominantni put je prikazan na slici 34 [28].



Slika 34. Biosinteza askorbinske kiseline kod biljaka (E1: L-galaktoza dehidrogenaza, E2: L-galaktonolakton dehidrogenaza)

Sa slike 34 se može zapaziti da proces biosinteze počinje iz galaktoze i da ne uključuje nastanak derivata uronske kiseline. Sa druge strane, kvasci i neke gljive sintetišu D-eritroaskorbinsku kiselinu (struktura prikazana na slici 34) iz L-arabinoze. Ovaj analog vitamina C ima ista biološka svojstva [28].

Vitamini B serije su takođe rastvorni u vodi. Strukture odabranih vitamina ove serije prikazane su na slici 35 [28].



Slika 35. Strukture odabranih vitamina B grupe

Vitamin B₁ (tiamin) je prisutan u pasulju, žitaricama, lešnicima, jajima, kvascima i povrću. Nedostatak ovog vitamina izaziva bolest beriberi, koja se karakteriše neurološkim poremećajima, gubitkom apetita, umorom i slabošću. U obliku difosfata ovaj vitamin je koenzim za piruvat dehidrogenazu. Takođe, kofaktor je za transketolazu koja prenosi 2C fragment u pentoza fosfatnom putu. Ovaj vitamin je stabilan u kiselom medijumu, a razgrađuje se na pH > 5, kao i pri kuvanju [28].

Vitamin B₂ (riboflavin) je zastupljen u jetri, bubrezima, mlečnim proizvodima, jajima, mesu i svežem povrću. Kvasac je naročito bogat izvor ovog vitamina. Stabilan je u kiseloj sredini, ne razlaže se tokom kuvanja, međutim, osetljiv je na svetlost. Ovaj vitamin je komponenta FAD (flavin adenin dinukleotid) i FMN (flavin mononukleotid) koenzima koji imaju značajnu ulogu u oksido-redukcionim reakcijama. Mnogi ključni enzimi sadrže riboflavin (flavoproteini), i oni imaju značajnu ulogu u metaboličkim procesima [28].

Vitamin B₃ (nikotinska kiselina, niacin) je zastupljen u jetri, mesu, ribi i kvascu. Sa druge strane, u pojedinim prehrambenim proizvodima, kao što je kukuruz, ovaj vitamin se nalazi u vezanom stanju i nije dostupan. Triptofan se može prevesti u ovaj vitamin čime se može nadoknaditi njegov nedostatak. Nikotinska kiselina se dalje prevodi u nikotinamid koji se i sam nalazi u hrani. U formi NAD⁺ i NADP⁺, nikotinamid igra glavnu ulogu u oksido-redukcionim procesima i predstavlja jedan od osnovnih nosača elektrona u primarnom metabolizmu. Nedostatak vodi ka pojavi pelagre. Nikotinamid se uglavnom preporučuje kao pogodniji dodatak ishrani u odnosu na nikotinsku kiselinu zbog rizika od vazodilatacije. Nikotinska kiselina može da smanji nivo holesterola i triglicerida putem inhibicije njihove sinteze [28].

Vitamin B₅ (pantotenska kiselina) se najviše nalazi u jetri, kvascima i cerealijama. Nedostatak ovog vitamina je jako redak zato što se može vrlo lako uneti u organizam putem ishrane. On ulazi u strukturu koenzima A koji predstavlja nosač u metabolizmu ugljenih hidrata, masti i proteina. Pantotenska kiselina je posebno važna za sintezu masnih kiselina, poliketida i nekih peptida [28]. Vitamin B₆ se sastoji iz tri piridinska derivata: piridoksina (piridoksol), piridoksala i piridoksamina. U biljnom materijalu prevladava piridoksin, dok su druge dve forme zastupljenije kod životinjskog tkiva. Banana, meso, losos, orah, krompir i cerealije se smatraju dobrim izvorom ovog vitamina. Piridoksal-5'-fosfat predstavlja koenzim za veliki broj enzima, a naročito one koji su uključeni u metabolizam amino kiselina [28].

2.2.4 Fenolna i polifenolna jedinjenja

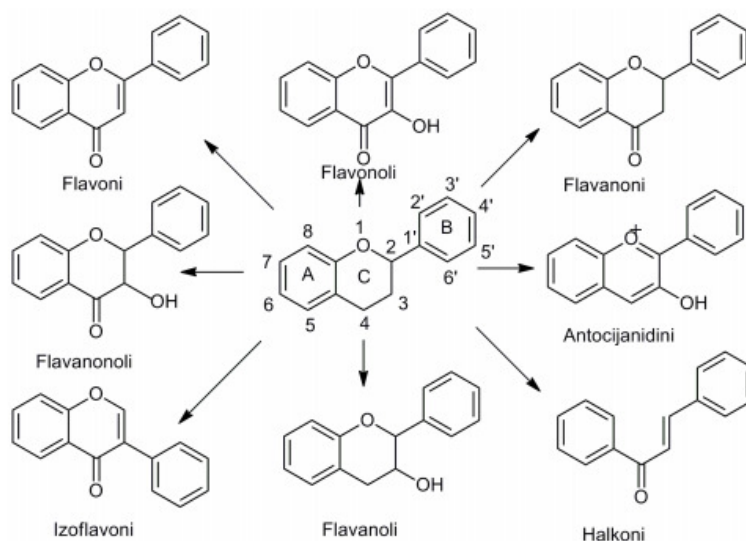
U ovu grupu spadaju jedinjenja koja u svojoj osnovi sadrže aromatični prsten sa hidroksilnim supstituentima. Mogu se javiti u obliku aglikona, odnosno bez šećernih komponenti, a mogu imati vezane i šećerne komponente (glikozidi). Od ugljenih hidrata koji ulaze u sastav ovih glikozida najčešće se javljaju glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manosa, itd. Klasifikacija ovih jedinjenja prema strukturnim jedinicama data je u tabeli 4 [35].

Tabela 4. Podela fenolnih jedinjenja prema strukturi

Broj C-atoma	Skelet	Klasa
6	C ₆	Prosti fenoli
7	C ₆ -C ₁	Hidroksi-benzoati
8	C ₆ -C ₂	Acetofenoni i fenil-acetati
9	C ₆ -C ₃	Kumarini, hromoni, hidroksi-cinamati i fenil-propeni
10	C ₆ -C ₄	Naftohinoni
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantoni
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeni i antrahinoni
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidi
n	(C ₆) _n	Katehol melanini
n	(C ₆ -C ₃) _n	Lignini
n	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Kondenzovani tanini

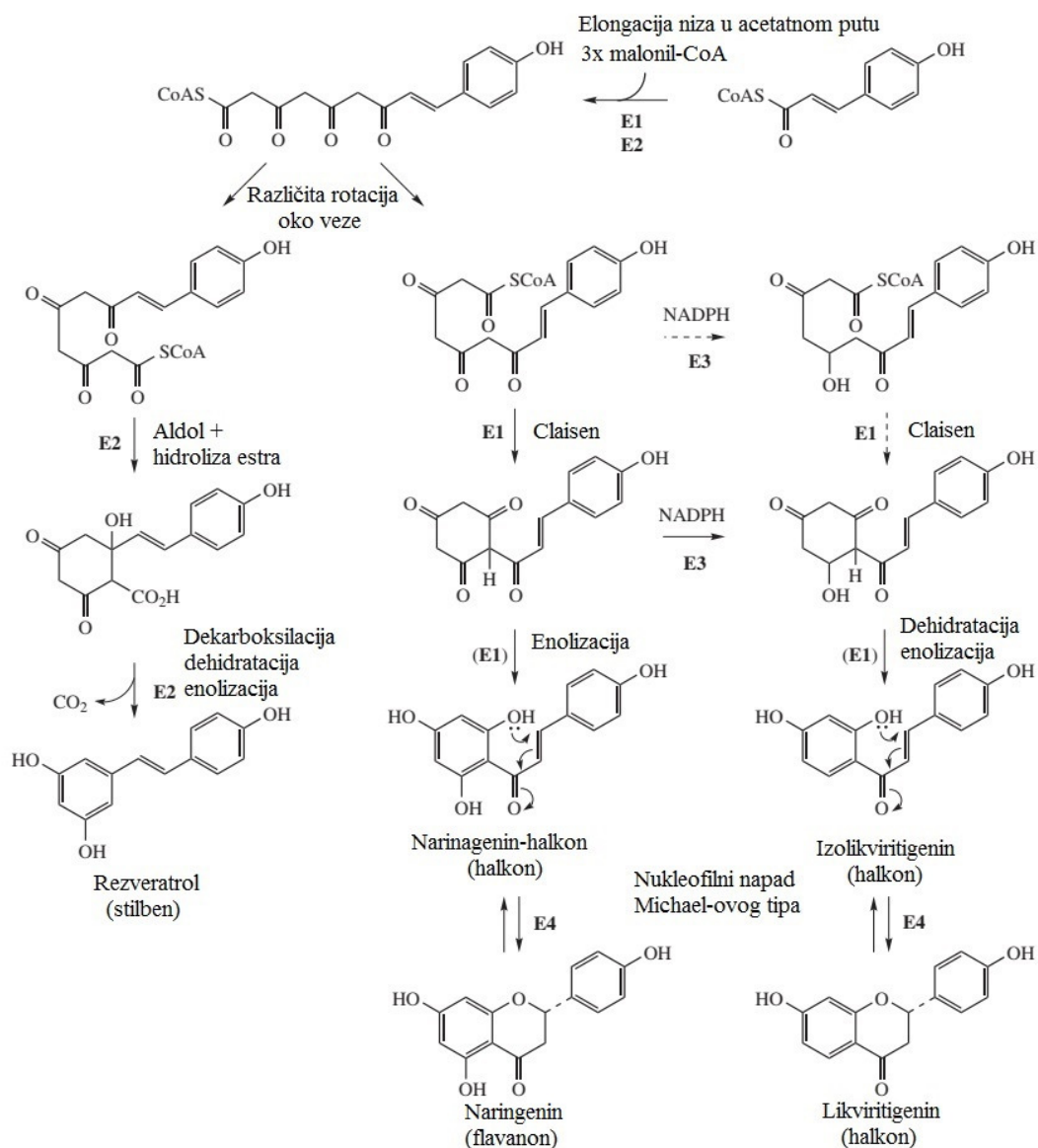
Flavonoidi predstavljaju najveću grupu biljnih polifenola. Izolovano je preko 6000 jedinjenja koji pripadaju ovoj grupi [36]. Osnovna struktura jedinica ove klase jeste γ -piron, odnosno piran-4-on, benzo- γ -piron (hromon) ili 2-fenil-benzo- γ -piron (flavon). Iz njihovog osnovnog skeleta (C₆-C₃-C₆) se dalje mogu izvesti strukture ostalih grupa koji pripadaju ovoj klasi (slika 36).

Flavonoidi mogu biti hidroksilovani, alkilovani, glikozilovani, pa čak i acilovani, a mogu se i umrežavati, odnosno polimerizovati. Glikozidne grupe su najčešće vezane O-glikozidnom vezom, dok se ređe mogu naći i C-glikozidi. Glikozilacija se najčešće javlja u poziciji 3, ređe u poziciji 7, dok se izuzetno retko javlja u pozicijama 3', 4' i 5' [7].



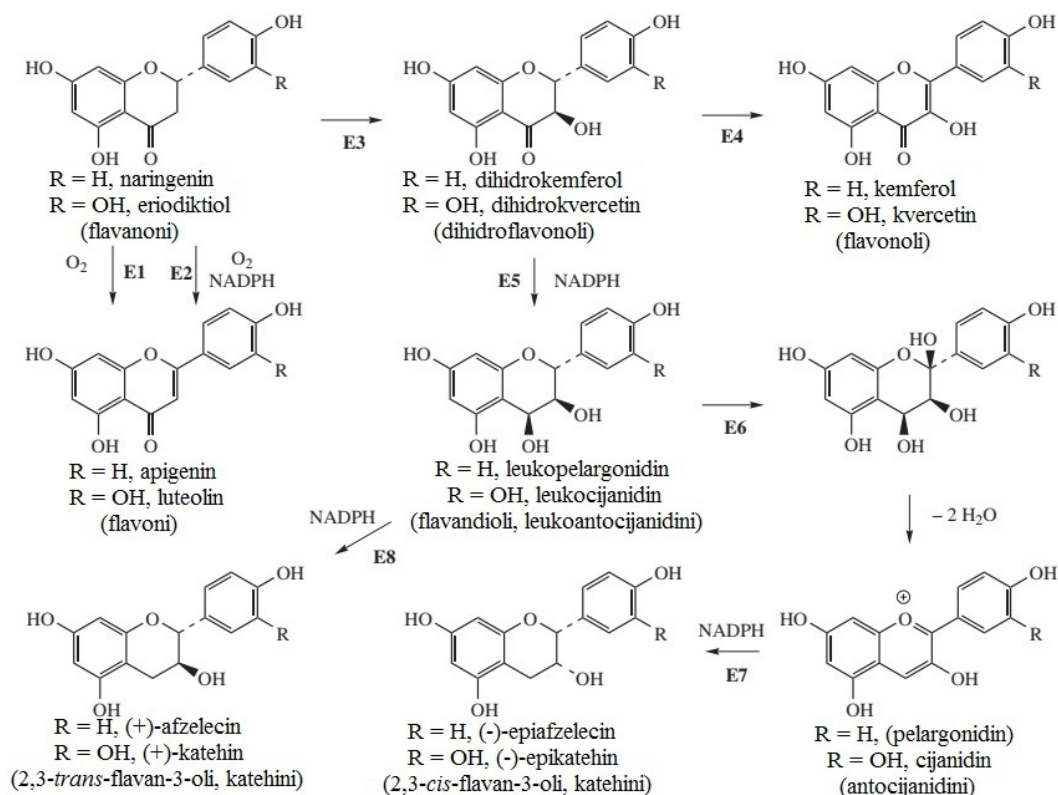
Slika 36. Strukturna podela flavonoida

Biosinteza polifenolnih jedinjenja započinje u šikimatnom putu gde se odvija sinteza hidroksicinamoil strukturne jedinice. Nakon toga se nastavlja u acetatnom putu gde se odvija elongacija niza i formiranje A-prstena, dok se proces završava u šikimatnom putu. Reakcije su šematski prikazane na slici 37 [28]. Sam proces elongacije niza se odvija uz prisustvo tri malonil-CoA i uz dejstvo dva enzima: halkon sintaze i stilben sintaze. Kao produkt nastaje poliketidni niz koji se zatim može orijentisati na dva načina. Ove orijentacije omogućavaju dalje odvijanje intramolekulske Claisen-ove kondenzacije uz prisustvo enzima halkon sintaze. Intramolekulsku ciklizaciju prati enolizacija za koju se smatra da se odvija spontano i da je neenzimski proces ili da se eventualno odvija uz prisustvo halkon sintaze, što nije još potvrđeno. Nakon enolizacije dolazi do kondenzacije (Michael-ova adicija) uz dejstvo enzima halkon izomeraze. U ovom momentu nastaje drugi šestočlani prsten koji je karakterističan za većinu flavonoida. Ova reakcija kondenzacije se karakteriše nukleofilnim napadom fenolne grupe na nezasićeni keton. U prisustvu enzima ova reakcija je stereospecifična, odnosno nastaje isključivo jedan enantiomer [28].



Slika 37. Biosinteza flavonoida (E1: halkon sintaza (naringenin halkon sintaza), E2: stilben sintaza (rezveratrol sintaza), E3: halkon reduktaza, E4: halkon izomeraza)

Nakon nastanka, flavanoni dalje mogu biti transformisani u druge tipove flavonoida kao što su flavoni, flavonoli, antocijanidini i stilbeni (slika 38). Sve ove reakcije su katalizovane enzimima [28].



Slika 38. Transformacija flavanona u druge tipove flavonoida (E1: flavon sintaza I, E2: flavon sintaza II, E3: flavanon-3-hidroksilaza, E4: flavonol sintaza, E5: dihidroflavanol-4-reduktaza, E6: antocijanidin sintaza (leukoantocijanidin dioksigenaza), E7: antocijanidin reduktaza, E8: leukoantocijanidin reduktaza)

Flavonoidi su uglavnom čvrsta, bezbojna ili žuto obojena jedinjenja, sa izuzetkom antocijana kod kojih boja može da varira od roze do plave. Aglikoni su teško rastvorni ili nerastvorni u vodi, dok su njihovi glikozidi rastvorni u polarnim rastvaračima. Smatraju se odgovornim za boju plodova, listova i cvetova biljaka. Spektroskopska analiza ukazuje na postojanje dva glavna maksimuma apsorpcije. Jedan je u oblasti 240-285 nm koji potiče od π - π^* prelaza u A prstenu. Drugi apsorpcioni maksimum se javlja u oblasti 300-400 nm koji potiče od prelaza u B prstenu [7].

Kada je u pitanju njihova biološka uloga, smatra se da su ovi molekuli odgovorni za privlačenje oprašivača, stimulaciju rasta polenske cevi, resorpciju metala iz odumrlog lišća, kao i da učestvuju u odbrambenom sistemu biljaka [36].

2.3 Biološka aktivnost biljaka i njihovih ekstrakata

2.3.1 Antioksidativna aktivnost

Oksidativni stres je relativno nov pojam koji se šire primenjuje u biomedicinskim naukama poslednjih godina. Značajno je prisutan u patofiziologiji bolesti kao što su dijabetes, hipertenzija, arteroskleroza, akutni renalni zastoj, Alchajmerova i Parkinsonova bolest [37]. U poslednje dve ili tri decenije došlo je do veoma značajnih pomaka u razumevanju značaja antioksidanasa i reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. Reactive oxygen species, ROS). Otkriveno je da antioksidansi imaju veoma važnu ulogu u lečenju kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti i kancera. Pored ovoga, pokazalo se da je primena antioksidanasa u tretmanu različitih oboljenja veoma efikasna, što ukazuje da je u razvoju tih bolesti uključen i oksidativni stres [38]. Molekulski kiseonik je neophodan za život aerobnih organizama. Međutim, polovična oksidacija i ekscitacija kiseonika tokom metaboličkih procesa vodi ka formiranju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Ove visoko reaktivne vrste sposobne su da izazovu oštećenja na komponentama ćelija, uključujući tu i proteine, lipide i nukleinske kiseline. Kao vid zaštite od ROS aerobni organizmi su stvorili seriju komplementarnih antioksidativnih enzima i neenzimskih molekula koji imaju antioksidativna svojstva čime se biomolekuli štite od oksidativnih oštećenja. Pored ovih prirodnih sistema i molekula, antioksidansi koji se unose ishranom takođe doprinose sistemu odbrane organizma od oksidativnog oštećenja. Treba napomenuti da su, u fiziološkim uslovima, ROS i antioksidansi u ravnoteži. Međutim, povećanje koncentracije ROS ili oštećenje sistema odbrane može dovesti do narušavanja te ravnoteže koja, tako narušena, vodi daljem oksidativnom stresu što može izazvati razna oboljenja [37,38]. Iz ovih razloga istraživanja se nastavljaju i očekuju se nova dostignuća na polju pronalaska novih strategija za tretman poremećaja i bolesti čiji mehanizmi nastanka uključuju i oksidativni stres.

Sam pojam oksidativni stres se odnosi na pojavu koja se javlja kada količina reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i/ili reaktivnih azotnih vrsta (engl. Reactive nitrogen species, RNS) značajno premaši kapacitet antioksidativnog sistema odbrane u biološkom sistemu. Takvo stanje može biti uzrokovano povećanjem koncentracije reaktivnih vrsta ili opadanjem aktivnosti antioksidanasa ili oba slučaja istovremeno. Samo stanje se povezuje sa oksidativnim oštećenjem biomolekula među kojima su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Pojava umerenog oksidativnog stresa može izazvati

disfunkciju ćelije, dok jači oksidativni stres izaziva ćelijsku smrt. Međutim, porast nivoa ovih reaktivnih vrsta nije uvek povezan sa oštećenjima. Pod određenim uslovima blagi porast nivoa ROS/RNS može predstavljati deo signalnog mehanizma koji dalje inicira fiziološki ćelijski odgovor [38–40]. Dokazano je da je oksidativni stres usko povezan sa procesom inflamacije. Tokom procesa se aktiviranjem inflamatornih ćelija formiraju velike količine ROS uključujući tu i NAD(P)H oksidazu i inducibilnu NO-sintazu. Sa druge strane ROS/RNS koji nastaju izazivaju povećanu ekspresiju proinflamatornih citokina i adhezivnih molekula, čime pospešuju ili propagiraju disregulisani inflamatorni proces [38].

Prvi otkriveni ROS bio je superoksidni radikal, a otkrio ga je Pauling tridesetih godina XX veka [37,41]. Međutim, tada se nije znalo da ovaj radikal nastaje u živom organizmu i da je uzrok mnogih bolesti. Mann i Keilin [37] su u istoj deceniji prečistili iz goveđe krvi enzim superoksid dizmutazu (SOD) i opisali ga kao Cu-vezivni protein nepoznate funkcije. Do šezdesetih godina nije se ništa znalo o patofiziološkom značaju ROS. Međutim, prvo su 1968-1969. godine McCord i Fridovich opisali aktivnost SOD, a zatim je otkriveno da se SOD nalazi u skoro svim ćelijama sisara [42,43]. Knowles i sar. [42] su 1969. godine dokazali da enzim ksantin oksidaza (XO) proizvodi superoksid. Babior i sar. [44] su 1973. godine pokazali da je baktericidna aktivnost neutrofila povezana sa velikom količinom superoksid-radikala, i time povezali proces inflamacije sa generisanjem ROS. Postalo je jasno da se oštećenje tkiva povezano sa procesom inflamacije može pripisati neutrofilima generisanim superoksidnim radikalima, i da će SOD pomoći tako što će štititi ćelije i ekstracelularne komponente od oštećenja [45,46]. Otkriće EDRF (engl. Endothelium-derived relaxing factor) 1980. godine omogućilo je formulaciju novih koncepata u patogenezi hipertenzije [47]. Međutim, bilo je potrebno sedam godina da se odredi identitet ovog faktora i da se dokaže da on korespondira sa NO [48,49]. Granger i sar. su 1981. godine dokazali da do oštećenja tkiva creva izazvanog ishemijom/reperfuzijom dolazi zbog povećanog generisanja ROS [50]. Od tog momenta do današnjih dana mnoge istraživačke grupe su se bavile ispitivanjem oksidativnog stresa i njegovog uticaja na nastanak raznih, na izgled sa njim nepovezanih bolesti. Slobodni radikali predstavljaju atom ili molekul koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona, a koji su ujedno sposobni da se održe u životu, odnosno koji se mogu detektovati. Slobodni radikali mogu nastati kao posledica odvijanja homolitičkih, heterolitičkih ili redoks reakcija. Ove vrste uglavnom čine reaktivne kiseonične vrste (ROS) i reaktivne azotne vrste (RNS). ROS čine reaktivne vrste koje sadrže kiseonik (slobodni radikali), kao i molekuli koji sadrže kiseonik, a koji

nisu slobodni radikali (vodoni peroksid). Indentično ROS, RNS čine reaktivne vrste i molekuli koji sadrže azot [51].

Izvori slobodnih radikala se mogu svrstati u endogene i egzogene. U endogene izvore se ubrajaju mitohondrijska respiracija, enzimske reakcije, auto-oksidacija, infekcija, ishemija/reperfuzija, NADP(H) oksidaze, ksantin oksidoreduktaze, citohrom P450 enzimi. Sa druge strane, egzogene izvore čine zagađenje vazduha, prisustvo neorganskih čestica u vazduhu, duvanski dim, industrijski rastvarači, neki lekovi i izlaganje zračenjima. Medikamenti koji mogu da dovedu do nastanka radikala su neki antibiotici, analgetici, antimalarijski agensi, imunosupresanti, diuretici, itd. Pored svega ovoga, i konzumacija psihoaktivnih supstanci, kao i konzumacija alkohola mogu dovesti do oksidativnog stresa [38,51].

Termin antioksidansi se javlja kako u svakodnevnom životu, tako i u naučnim krugovima, a naročito u biologiji, medicini i hemiji. Postoji više definicija koje se javljaju u literaturi, a najčešća je ona koja antioksidanse definiše kao supstance koje su sposobne da spreče, smanje ili poprave oštećenje biomolekula izazvano delovanjem ROS/RNS [38,52]. Jednostavnije rečeno, antioksidansi predstavljaju supstance koje su sposobne da neutrališu slobodne radikale i spreče ih da izazovu oštećenja [53]. Kada je način delovanja ove grupe jedinjenja u pitanju, postoje tri potencijalna modela po kojima oni deluju, odnosno štite biomolekule od oštećenja koje mogu izazvati nastali ROS/RNS. Ta tri modela su sledeća [38]:

- **Neutralizacija ROS/RNS:** mnogi antioksidansi su sposobni da direktno neutrališu slobodne radikale, pri čemu se sama neutralizacija može odvijati putem reakcija koje katalizuju enzimi. Primer je SOD koji katalizuje dizmutaciju superoksida do vodonik-peroksida i molekularnog kiseonika. Neenzimski antioksidansi neutrališu radikale putem direktnih hemijskih reakcija.
- **Inhibicija procesa nastanka ROS/RNS:** antioksidansi mogu da deluju na ove izvore nastanka radikala i inhibiraju ili spreče njihov nastanak. Primeri su mono-*O*-metilovani flavanoli koji inhibiraju NAD(P)H oksidazu u vaskularnim ćelijama. Ta inhibicija dalje vodi ka smanjenju koncentracije superoksida [54].
- **Uklanjanje ili saniranje oštećenja izazvanih dejstvom ROS/RNS:** ćelije sisara su razvile jedinstveni sistem odbrane koji, između ostalog, služi da ukloni ili popravi molekule koji su pretrpeli promene. ROS/RNS oksiduju rezidue metionina u proteinima pri čemu

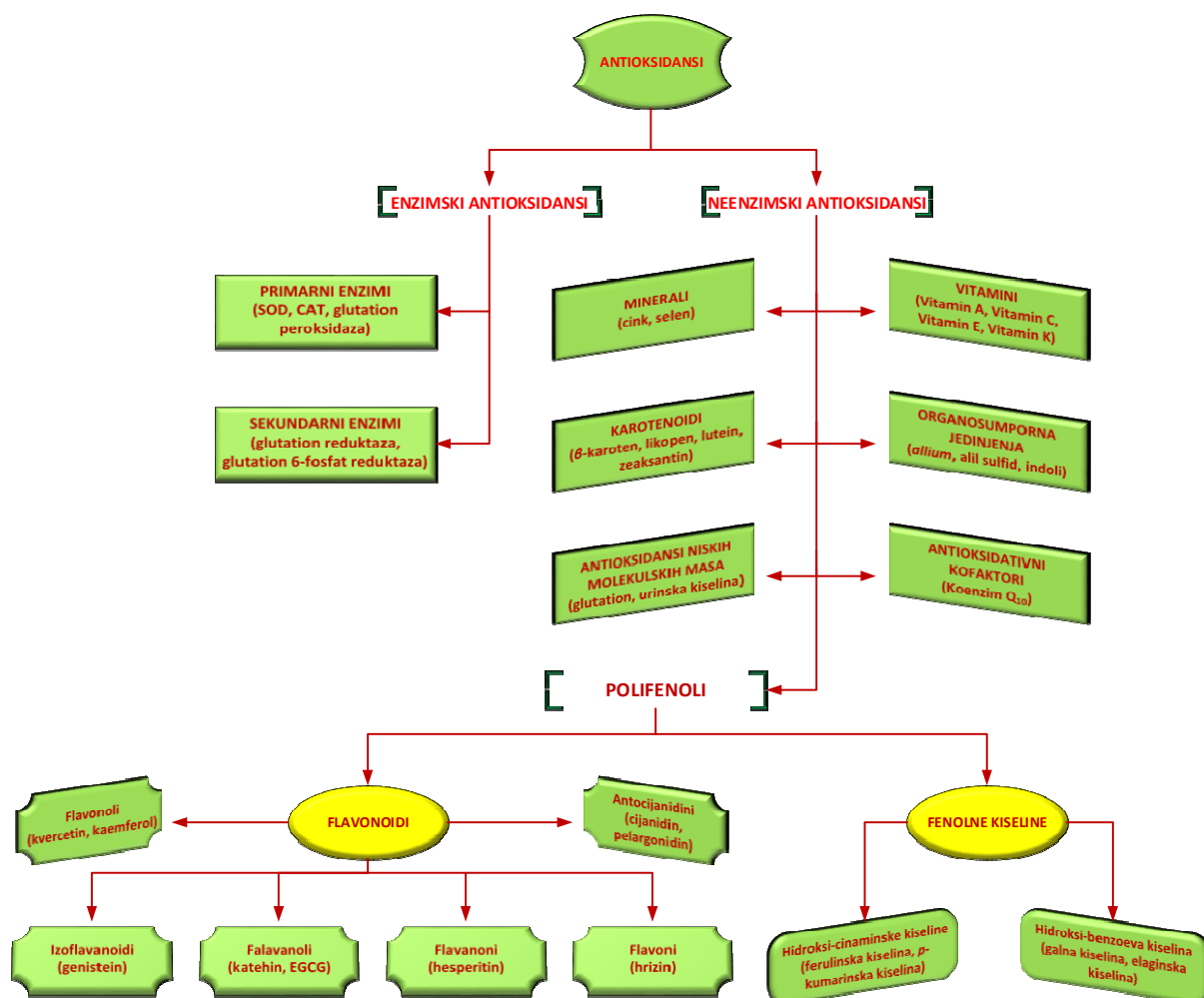
nastaje metionin sulfoksid koji se dalje redukuje u metionin dejstvom enzima metionin sulfoksid reduktaze [55]. Samim tim ovaj enzim predstavlja važnu kariku u lancu odbrane organizma od dejstva slobodnih radikala. Čelije su takođe snabdevene i enzimima koji mogu da poprave oksidativna oštećenja lipida i nukleinskih kiselina.

Sve grupe molekula se mogu, uopšteno, prema izvoru podeliti na endogene i egzogene. Na osnovu te podele, i antioksidansi mogu biti *endogeni* i *egzogeni*. Endogeni antioksidansi su oni koje ćelija sintetise, dok su egzogeni oni koji se unose u organizam, a oni mogu dalje da se podele na dve velike grupe [38]:

- ❖ Proteinski antioksidansi i
- ❖ Neprroteinski antioksidansi.

Endogenim proteinskim antioksidansima pripadaju enzimi kao što su SOD i CAT (katalaza), kao i neenzimski kao što su feritin i metalotionein, dok su primeri za endogene neprroteinske antioksidanse redukovana forma glutationa i bilirubin. Grupi egzogenih antioksidanasa pripadaju oni koje ćelije ne mogu da sintetisu, odnosno oni koji se unose putem ishrane. Prema poreklu se mogu podeliti na prirodne i sintetičke. Najpoznatiji primeri egzogenih antioksidanasa prirodnog porekla su vitamini C i E, kao i polifenolna jedinjenja. U grupu sintetičkih antioksidanasa spadaju mimetici enzima, spinske zamke (spin traps) i nano-čestice cerijum-oksida [38].

Ratnam i saradnici [53] su predstavili opširniju podelu prema kojoj se antioksidansi dele na enzimске i neenzimске. Enzimski se dalje dele na primarne i sekundarne enzime, dok se neenzimski antioksidansi dela na minerale, karotenoide, antioksidanse malih molekulskih masa, vitamine, organosumporna jedinjenja, antioksidativne kofaktore i polifenole. Opisana podela prikazana je na slici 39.



Slika 39. Podela antioksidanasa

2.3.2 Antimikrobna aktivnost

Mikroorganizmi kao što su virusi, bakterije i gljive se odlikuju sposobnošću da uzrokuju različite bolesti u živom organizmu. Sam proces izazivanja bolesti se odvija na različite načine, npr. produkcijom toksina, ometanjem metabolizma, mehaničkim putem i razmnožavanjem u samim ćelijama [7]. U borbi protiv njih posebno mesto danas zauzimaju antibiotici koji se izuzetno široko koriste. Međutim, usled intezivnog korišćenja sve se češće javlja rezistencija na antibiotike, pa se sve veća pažnja obraća na jedinjenja koja se nalaze u prirodi, a da pri tome pokazuju antimikrobno dejstvo.

Među takvim jedinjenjima su i terpeni koji se nalaze u etarskim uljima. Iako mehanizam njihovog dejstva još uvek nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da se njihovo delovanje odvija na nivou inhibicije sinteze ćelijskih membrana, narušavanjem strukture enzima, smanjenjem njihove koncentracije ili delovanjem na genetski materijal mikroorganizama. Pored etarskih ulja, odnosno terpena, i polifenolna jedinjenja se sve češće ispituju u pogledu antimikrobne aktivnosti. Mnogobrojni *in vitro* testovi su ukazali da visoku aktivnost flavonoida, kao i određenih fenolnih kiselina [56–58]. Modifikacijom prirodnih flavonoida može se povećati njihova antimikrobna aktivnost. Tako, izuzetno potentan molekul se može dobiti halogenacijom B-prstena i supstitucijom geranil i lavadulil grupa u A-prstenu.

Metode za određivanje ove aktivnosti su različite. Najčešće se primenjuje difuziona metoda na disku. Metoda se zasniva na difuziji ispitivane supstance u hranjivu podlogu pri čemu ona deluje inhibitorno na rast i razmnožavanje mikroorganizama koji su prethodno zasejani na tu podlogu. Nakon perioda inkubacije rezultat se očitava kao prečnik zone inhibicije rasta mikroba. Pored ove metode često se koristi i diluciona metoda na tečnoj ili čvrstoj podlozi [7].

2.3.3 Citotoksična aktivnost

Tumori nastaju usled poremećaja mehanizama koji regulišu ćelijske cikluse. U takvim okolnostima ćelije ne reaguju na signale koji regulišu njihov razvoj, već počinju da se nekontrolisano razvijaju i dele. Svaki ovakav poremećaj može se podeliti na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne). Za maligna oboljenja karakteristična je nekontrolisana deoba uz odsustvo apoptoze, zatim invazivnost i metastaza. Za metastaziranje tumora odgovoran je enzim matriks metaloproteinaza (MMP) koji se stvara tokom odvijanja metaboličkih procesa. Sam enzim ima sposobnost da razgradi gust međućelijski matriks i vezivna tkiva. Prilikom nastanka tumora, sa povećanjem ćelijske mase povećava se i koncentracija ovog proteina. Usled povećane aktivnosti enzima maligne ćelije se odvajaju od mase i putuju organizmom putem krvi ili limfe pri čemu dospevaju i do drugih organa. Za razliku od malignog, benigni tumor se karakteriše ograničenim rastom uz odsustvo invazivnog ponašanja i metastaziranja [7].

Sam proces prelaska normalnih ćelija u maligne se naziva onkogeneza, dok se agensi koji uzrokuju pojavu onkogeneze nazivaju kancerogenima. Proces onkogeneze može započeti u svim organima, dok su organi koji su izloženi uticaju spoljašnjih faktora (pluća, creva, itd.) posebno podložni

pojavi ovog procesa. Sama pojava je višefazni proces i da bi do njega došlo treba da se desi više mutacija, što obično zahteva duži vremenski period. Faza inicijacije započinje kada genom ćelije pretrpi promene koje nisu blagovremeno korigovane ili su korigovane pogrešno. U drugoj fazi (promocija) dolazi do deobe oštećene ćelije pri čemu nastaje premaligni tumor. Treća faza se odvija usled uticaja različitih faktora pri čemu dolazi do progresije [59–61].

Jedan od faktora koji ograničava rast tumora jeste apoptoza, odnosno programirana smrt ćelije. Do apoptoze dolazi tokom embrionalnog razvoja, kao i tokom procesa obnove tkiva i organa odraslih jedinki. Sam proces je neophodan za održavanje ravnoteže između starih i novih ćelija [62]. Proces odvijanja apoptoze je genetski regulisan. Tokom njega ćelija trpi niz morfoloških promena. Ključnu ulogu u odvijanju procesa apoptoze imaju kaspaze koje odmah po svom aktiviranju započinju pomenuti proces. Signali za njihovu aktivaciju mogu doći od okolnih ćelija (spoljašnji put) ili iz unutrašnjosti same ćelije (unutrašnji put aktivacije). Spoljašnji put aktivacije kaspaza uključuje receptore smrti iz TNF/Fas porodice koja se proteže od spoljašnje do unutrašnje površine ćelije, odnosno njene membrane [63,64]. Sa druge strane, tokom unutrašnjeg aktiviranja kaspaza signali nastaju usled pojave oštećenja u pojedinim organelama. Centralno mesto u ovom procesu imaju mitohondrije čije membrane postaju permeabilnije za manje molekule koji izlaze iz njih i aktiviraju kaspazu.

Hemoterapija uključuje primenu jedinjenja, najčešće sintetičke prirode, koja mogu da uspore ili potpuno zaustave rast malignih ćelija, pa čak i da izazovu njihovu smrt. Pored ovoga, tretmani kancera uključuju i primenu radijacije, odnosno zračenja. Ovakvi pristupi lečenja često dovode do slabljenja imunog sistema pacijenata koji postaju podložni raznim infekcijama. Iz tog razloga je svetska naučna javnost pristupila iznalaženju novih medikamenata koji su manje štetni, a pri tome imaju širok spektar dejstva.

Veliki broj prirodnih jedinjenja koje pokazuju citotoksično dejstvo jesu u stvari sekundarni metaboliti biljaka. Među njima posebnu pažnju su privukli polifenoli, odnosno flavonoidi. Pokazalo se da biljni ekstrakti i njihova fenolna jedinjenja mogu da dejstvuju na brojne ciljeve koji su u stvari molekuli signalnih puteva u malignim ćelijama. Kako različiti tipovi kancera koriste različite mehanizme, tako ekstrakti pojedinih biljaka pokazuju specifične antikancerogene efekte prema određenim tipovima kancera. Poseban značaj polifenolnih jedinjenja se ogleda u njihovoj antioksidativnoj aktivnosti kojom oni u stvari štite biomolekule od oštećenja [65,66]. Pored prevencije oštećenja, oni inhibiraju tačno određene enzime prve faze i povećavaju ekspresiju

kancerogen-detoksifikujućih enzima druge faze. Takođe, polifenoli mogu da dovedu do zastoja u G1, G2/M ili S fazi ćelijskog ciklusa putem uticaja na proces ekspresije važnih proteina [7].

2.4 Kopriva (*Urtica dioica* L.)

Naziv vrste potiče od grčke reči *oikia* - kuća i latinske reči *dioica* - dve kuće. Sam naziv se odnosi na to da je ova biljna vrsta dvodoma, odnosno da ima jednopolne, muške i ženske cvetove na različitim biljkama [67]. Kopriva je višegodišnja zeljasta biljka visine 30-150 cm (slika 40).



Slika 40. Kopriva (*Urtica dioica* L.)

Sama biljka ima drvenast, valjkast i razgranat rizom. Stabljika je uspravna, nerazgranata ili razgranata sa kratkim čekinjama ili dugačkim žarnim dlakama. Dugih je zalizaka koji su linearni i slobodni. Po pršljenu najčešće ima dva lista, a ređe tri. Lisna drška je dužine 2,5-4 cm sa žarnim i čekinjastim dlakama. Liska je duga 5-15 cm, širine 2-6 cm. Može biti jajasta ili lancetasta, zaobljena do srcasta u osnovi, dok je na vrhu zašiljena. Liska ima tri do pet nerava, na obodu je gusto testerasta, ponekad čak i dvostruko. Na licu su proređene žarne i čekinjaste dlake, dok su na naličju one raspoređene obično duž nerava. Cvast je dužine 3-7 cm, metličastog oblika sa drškom i jednopolna je. Ženski cvet ima omotač koji se sastoji od četiri listića koji su srasli u donjem delu. Dva su spoljašnja (dužine 0,8-1,2 mm), linearna do usko lopatičasta ili lancetasta. Dva unutrašnja listića su dužine 1,4-1,8 mm i širine 1,1-1,3 mm. Jajastog su oblika. Plod je dužine 1-1,4 mm i

širine 0,7-0,9 mm, jajast je do blago spljošten, sivo-braon boje i okružen listićima cvetnog omotača.

Kopriva raste na nizijskim područjima do onih na nadmorskim visinama do 1800 m. Prvenstveno nastanjuje zemljišta bogata azotom na veoma različitim staništima kao što su: vlažna mesta, šume, rečne doline, torovi, njive, bašte, voćnjaci, pored puteva i u naseljenim mestima. Skoro je kosmopolitska, antropogeno rasprostranjena. Smatra se korovskom vrstom koja raste gotovo svuda.

2.4.1 Hemijski profil koprive

Dostupno je više različitih istraživanja koja su se bavila ispitivanjem hemijskog sastava ove biljke. Ispitivani su različiti delovi biljke kao što su list, stabljika i koren [68]. Tom prilikom je utvrđeno prisustvo različitih fenolnih, odnosno polifenolnih jedinjenja [69–76]. Među njima su glikozilovani oblici, kao i aglikoni pomenutih jedinjenja. Detektovani su kvercetin, rutin, kemferol, apigenin, kao i kafena, kumarna, galna, hininska kiselina, itd. Pored polifenola, detektovane su i druge klase jedinjenja kao što su masne kiseline [77,78], pigmenti (hlorofil i karotenoidi) [77,79–82], amino kiseline [83], mineralne materije [84–88], steroli i njihovi glikozidi [89], vitamini B grupe i vitamin C [68].

Istraživanja su pokazala da od minerala u listu koprive dominira gvožđe sa sadržajem do 150 mg/kg [84,85]. Dominantne masne kiseline su palmitinska (C16:0), *cis*-9,12-linolna kiselina (C18:2) i α -linoleinska kiselina (C18:3) [77,78]. Pored navedenih klasa detektovani su i terpenoidi, dok je sam sadržaj etarskog ulja u listu ove biljke izuzetno mali [90]. Dominantna komponenta etarskog ulja je karvakrol (38,2%), praćen karvonom (9,0%). Detektovana su i razna druga jedinjenja, odnosno različiti ugljovodonici i derivati navedenih klasa [91,92].

2.4.2 Biološka aktivnost koprive i njenih ekstrakata

Dosadašnja istraživanja su ukazala na širok spektar dejstva ove biljke i njenih ekstrakata. Ispitivani su različiti ekstrakti dobijeni primenom različitih rastvarača i njihovih međusobnih kombinacija, kao i primenom različitih ekstrakcionih tehnika, kako konvencionalnih, tako i nekonvencionalnih.

Istraživanja su pokazala da kopriva i njeni ekstrakti ispoljavaju antioksidativno, antimikrobno, analgetičko dejstvo, kao i dejstvo na čireve [68,93–96]. Akbay i sar. [97] i Francišković i sar. [98] su ispitali i ustanovili da ekstrakt koprive, odnosno njegove komponente, utiče na imuni sistem putem stimulacije MyD88/NF- κ B/p38 signalnog puta. Istraživanja na pacovima ukazala su na pozitivan efekat koprive u prevenciji hepatotoksičnosti koja je indukovana CCl₄ [99,100]. Pokazalo se da kopriva ima pozitivan uticaj na kardiovaskularni sistem kod pacova [101], sprečava agregaciju trombocita [102], stimuliše proliferaciju limfocita, dok inhibira produkciju NO [103], utiče na ključne receptore i enzime koji su povezani sa alergijskim rinitisom [104], inhibira pojavu depresije i memorijske disfunkcije kod pacova [105], utiče na hronični stres [106] i pokazuje antiviralno dejstvo [107].

Pored navedenih aktivnosti, istraživanja su pokazala da kopriva i njeni ekstrakti ispoljavaju pozitivan uticaj na povišen šećer [108], da indukuje sekreciju insulina kod dijabetesnih miševa [109], kao i da utiče na lipidni profil krvi kod pacova [110]. Nekoliko istraživanja potvrdilo je i citotoksični efekat ove biljke kod nekoliko vrsta kancera, kao i pozitivan uticaj na selektivnost određenih citostatika [111–113].

3. Eksperimentalni deo

Veći deo eksperimenata ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Deo istraživanja urađen je u laboratorijama Enološke stanice u Vršcu, SP laboratoriji u Bečeju, laboratorijama Instituta za opštu i fizičku hemiju u Beogradu, laboratorijama Naučnog nstituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, kao i u laboratorijama Agronomskog fakulteta u Čačku.

3.1 Biljni materijal

Biljni materijal koprive (*Urtica dioica* L.) sakupljen je u toku maja 2015. godine u okolini sela Vljakovac (opština Vršac), dok je sertifikovani biljni materijal kupljen od Instituta za lekovito bilje „dr Josif Pančić“ (Beograd).

3.2 Hemikalije i reagensi

Linolna kiselina (99%), β -karoten (95%), Tween 40, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, trihlorsirćetna kiselina (TCA), Folin-Ciocalteu reagens, butilovani hidroksitoluen (BHT), askorbinska kiselina, etilendiamintetraacetat dihidrat (EDTA), gvožđe(II)-sulfat heptahidrat, gvožđe(III)-hlorid, galna kiselina, rutin, metil metan sulfonat, 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT), 5,5-dimetil-pirolin-N-oksid (DMPO), akarboza, kojik kiselina, L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin), α -amilaza (EC 3.2.1.1), α -glukozidaza (EC 3.2.1.20), L-glutation, ferozin i tirozinaza su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka). Dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoniloksid (DMSO) i etanol HPLC čistoće proizvedeni su u J.T. Baker (Deventer, Holandija), dok su metanol HPLC čistoće, mravlja kiselina, natrijum karbonat, nitrofenil- α -D-glukopiranozid (PNPG), natrijum-hlorid, hlorovodonična kiselina, kao i kvercetin proizvedeni u kompaniji Merck (Darmstadt, Nemačka). Mueller Hinton agar (MHB) i Sabouraud dekstrozni agar su nabavljeni iz Instituta „Torlak“ (Beograd, Srbija).

Ultračista voda je dobijena korišćenjem sistema Millipore, Elix UV i Simplicity Water Purification System-a (Molsheim, Francuska). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su bili analitičkog stepena čistoće.

3.3 Analiza biljnog materijala

3.3.1 Određivanje vlage

Sadržaj vlage u biljnom materijalu je određen gravimetrijskom metodom prema *Ph. Jug.* IV [114]. Dobijeni rezultati su izraženi kao procentni sadržaj vlage (% m/m).

3.3.2 Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja u ispitivanom biljnom materijalu je određen metodom destilacije vodenom parom koristeći aparaturu prema Cleaveger-u [114].

3.4 Ekstrakcija biljnog materijala

3.4.1 Konvencionalne metode ekstrakcije

Za ekstrakciju biljnog materijala primenjene su dve konvencionalne metode ekstrakcije: maceracija i Soxhlet ekstrakcija. Maceracija (MAC) je izvedena tako što je 5 g biljnog materijala pomešano sa 150 mL vode u erlemajeru i ostavljeno da stoji tri dana uz povremeno mešanje.

Soxhlet ekstrakcija (SE) je izvedena u aparaturi po Soxhlet-u. Određena masa uzorka (8 g) je ekstrahovana sa 120 mL različitih rastvarača (heksan, metilen-hlorid i 96% etanol).

Prinosi MAC i SE ekstrakcija su određeni tako što je 10 mL tečnog ekstrakata upareno na rotacionom vakuum uparivaču (Devarot, Slovenija), a ostatak je sušen 3 h na 110°C.

3.4.2 Nekonvencionalne metode ekstrakcije

Od nekonvencionalnih ekstrakcionih tehnika primenjene su ultrazvučna, mikrotalasna i superkrična ekstrakcija. Preliminarne ekstrakcije su izvedene u ultrazvučnom kupatilu.

Ultrazvučna ekstrakcija (UAE) je izvedena u ultrazvučnom kupatilu (EUP540A, Euinstruments, Francuska) na konstantnoj frekvenciji od 40 kHz. Određena masa biljnog materijala (5 g) je pomešana sa različitim rastvaračima (heksan, metilen-hlorid, aceton, etil-acetat, 96% etanol i voda) u zapremini od 150 mL (preliminarna ispitivanja). Sve dalje ultrazvučne ekstrakcije su izvedene vodom uz isti odnos biljnog materijala i rastvarača. Preliminarne ekstrakcije su rađene u periodu od 45 minuta, dok su sve dalje izvođene u vremenskom periodu od 30 minuta. Jačina ultrazvuka je u svim slučajevima bila 156 W.

Mikrotalasna ekstrakcija (MAE) je izvedena u kućnoj mikrotalasnoj pećnici koja je prilagođena za ove potrebe. 5 g uzorka je pomešano u balonu sa 150 mL vode. Ekstrakcija je rađena u vremenskom periodu od 30 minuta, dok je jačina mikrotalasa bila 450 W.

Prinosi UAE i MAE ekstrakcija su određeni tako što je 10 mL tečnog ekstrakata upareno na rotacionom vakuum uparivaču (Devarot, Slovenija), a ostatak je sušen 3 h na 110°C.

Superkrična ekstrakcija (SFE) je izvedena u laboratorijskom postrojenju za ekstrakciju pod pritiskom (HPEP, NOVA-Swiss). Ekstraktor je napunjen sa 50 g biljnog materijala, zatvoren i ekstrahovan pomoću ugljen-dioksida u superkričnom stanju na tri različita pritiska (100, 200 i 300 bar) i dve temperature (40 i 60°C). Svi eksperimenti su izvedeni pri konstantnom protoku ugljen-dioksida (0,2 kg/h).

3.5 Hemijska analiza biljnog materijala i ekstrakata

3.5.1 Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (TPC) je određen spektrofotometrijski prema metodi po Folin-Ciocalteu (F-C metoda) [115]. Ekstrakt ili njegovo razblaženje je pomešano sa 7,9 mL vode. Dodato je 0,5 mL F-C reagensa i 1,5 mL 20% rastvora natrijum-karbonata. U slepu probu je umesto uzorka dodata odgovarajuća zapremina vode. Smeša je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega

je izvedeno merenje apsorbance na 750 nm. Rezultat je izražen kao mg ekvivalenta hlorogenske kiseline po gramu lista koprive (mg CAE/g SN).

3.5.2 Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen spektrofotometrijski prema Markham-u [116,117]. Određena zapremina uzorka ili njegovog razblaženja (1 mL) je pomešana sa 4 mL vode. Zatim je dodato 0,3 mL 3% rastvora natrijum-nitrita i ostavljeno da stoji 5 minuta. Nakon isteka vremena inkubacije, dodato je 0,3 mL 10% aluminijum-hlorida i ostavljeno da stoji 6 minuta. Nakon toga dodato je 1 mL 1 M rastvora NaOH i 3,4 mL vode. Zatim je merena apsorbance na 510 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta katehina po gramu lista koprive (mg CE/g SN).

3.5.3 Sadržaj hlorofila i karotenoida

Sadržaj hlorofila A, hlorofila B, ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida određen je prema opisanoj spektrofotometrijskoj metodi [118,119] uz manje modifikacije opisane od strane Pavlića i sar. [120]. Dobijeni ekstrakti su rastvoreni u dietil-etru. Uzorci su analizirani na talasnim dužinama 660, 642 i 470 nm gde se nalaze maksimumi apsorpcije za hlorofil A, hlorofil B i karotenoide. Sadržaj navedenih jedinjenja izračunat je prema sledećim formulama:

$$Chl A = 9,93A_{660} - 0,78A_{642} \quad (1)$$

$$Chl B = 17,60A_{642} - 2,81A_{660} \quad (2)$$

$$Chl A + B = 7,12A_{660} + 16,80A_{642} \quad (3)$$

$$TC = \frac{1000A_{470} - 0,52Chl A - 7,25Chl B}{226} \quad (4)$$

$$m = \frac{CVDF}{G1000} \quad (5)$$

gde su: *Chl A*, *Chl B*, *Chl A + B* i *TC* sadržaji hlorofila A, hlorofila B, ukupnog hlorofila i karotenoida u mg/L, dok su A_{480} , A_{642} and A_{660} vrednosti apsorbanca izmerenih na 480, 642 i 660 nm. *C* je izračunata koncentracija *Chl A*, *Chl B*, *Chl A + B* i *TC* iz jednačina (1)-(4), *V* je zapremina dietil-etra, *DF* faktor razblaženja, *G* je početna masa uzorka, dok je *m* sadržaj *Chl A*, *Chl B*, *Chl A*

+ *B* i *TC* u listu koprive (mg/g). Krajnji sadržaj ovih pigmenata je izražen u mg/g ekstrakta lista koprive (mg/g E), kao i mg pigmenata u 100 g lista koprive (mg/100 g SN).

3.5.4 Analiza etarskog ulja

Za analizu etarskog ulja koprive korišćene su GC/MS i GC/FID tehnike. Analize su rađene na Agilent GC890N sistemu opremljenom HP-5MS kolonom (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm). Uzorci su rastvarani u metilen-hloridu, dok je zapremina injektovanog uzorka 5 µL. Uslovi rada masenog detektora bili su sledeći: split mod (30:1), temperatura injektora 250°C, temperaturni program od 60°C do 150°C (4°C/min). Kao gas nosač korišćen je helijum sa protokom od 2 mL/min.

Uslovi rada FID detektora su bili sledeći: temperatura injektora 250 °C, temperaturni program od 60°C do 150°C (4°C/min), temperatura detektora je bila 300°C, dok je protok helijuma 2 mL/min. Identifikacija jedinjenja izvedena je pomoću masenog spektrometra MS 5795 marke Agilent. Maseni spektri su poređeni sa masenim spektrima iz baze podataka (NIST).

3.5.5 Analiza sadržaja minerala

Sadržaj minerala je određen kako u listu, tako i u ekstraktima lista koprive. Određivanje iz lista je urađeno uz prethodnu pripremu uzorka pomoću mikrotalasne digestije. Određena masa uzorka (0,5 g) je prenetu u mikrotalasnu pećnicu (Milestone, Ethos 1, Terminal T640, Italija) i pomešana sa 7 mL cHNO₃ i 1 mL vodonik-peroksida (30%). Temperaturni program je bio sledeći: 15 minuta od 0-200°C i 1000 W, 20 minuta na 200°C i 1000 W i 10 minuta hlađenje.

Tečni uzorci (ekstrakti) se analiziraju direktno. Uzima se reprezentativni uzorak, doda određena zapremina (1+1) azotne kiseline tako da bude 1% (v/v). Za razblaživanje ekstrakata korišćeni su normalni sudovi od 100, 50 ili 25 mL, koji su zatim dopunjeni do crte ultra čistom H₂O i analizirani na ICP-OES.

Rastvori se uvode u plazmu ICP-OES spektrometra (Agilent 5100) preko peristaltičke pumpe, koja obezbeđuje stalan protok rastvora, i pneumatičkog raspršivača koji rastvor prevodi u aerosol, koji se uvodi strujom inertnog gasa argona u indukovanu spregnutu plazmu sa optičkim emisionim spektrometrom (ICP-OES), gde se emituje karakteristično zračenje za svaki element pri čemu se analizira dobijeni signal. U uređaj se sve vreme uvodi i interni standard itrijuma koncentracije 0,5

mg/L na osnovu koga se koriguje rezultat. Izbor talasnih dužina linija na kojima se meri zavisi od vrste ispitivanog rastvora, odnosno od sastava uzorka i postojanja eventualne interferencije merene linije sa linijama osnove. Uređaj je povezan sa računarom, i za akviziciju i obradu podataka (izračunavanje koncentracija iz intenziteta snimljenih spektrograma odabranih analitičkih linija) koristi se softver. Rezultati su izraženi u mg/kg (u listu) i mg/L (za ekstrakte).

3.5.6 UHPLC-DAD MS/MS analiza

Određivanje fenolnih jedinjenja izvedeno je primenom Dionex Ultimate 3000 UHPLC tečnog hromatografa sa DAD detektorom (eng. Diode Array Detector) povezanog sa TSQ Quantum Access Max tripl-kvadrupol masenim detektorom (ThermoFisher Scientific, Basel, Švajcarska). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Synchronis C18 kolona pri temperaturi od 40°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0,01% sirćetne kiseline (A) i acetonitrila (B). Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 5% B u prve dve minute, 2-12 minuta sa 5-95% B, 12-13 minuta sa rasponom koncentracija B od 95% do 5% i 5% B nakon 20 minuta. Protok je bio podešen na 0,3 mL/min, a talasne dužine na DAD detektoru 254 i 280 nm. Injektovana zapremina svih uzoraka iznosila je 5 µL. Primenjeni standardi fenolnih komponenti rastvoreni su u metanolu u koncentraciji od 1 mg/mL. Ovaj rastvor je dalje mešan sa vodom kako bi se dobili radni rastvori standarda sledećih koncentracija: 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 i 1,00 mg/L. Tripl-kvadrupol maseni spektrometar (MS) sa HESI (engl. Heated Electrospray Ionization) izvorom je korišćen uz temperaturu isparavanja od 250°C i sledeće parametre izvora jonizacije: napon 4500 V, pritisak gasa (N₂) 27 AU (arbitrarnih jedinica), pritisak gasa za čišćenje 0 AU, pritisak pomoćnog gasa (N₂) 7 AU, temperatura kapilare 275 °C, ofset letača 0 V, ofset kapilare 35 V. Maseni spektri snimani su u negativnom jonizacionom modu. Za kvalitativnu analizu primenjen je višestruki skenirajući mod uključujući kompletno skeniranje (FS) (engl. Full Scanning) i skeniranje jonskih produkata (PIS) (engl. Product Ion Scanning). Kolizioni fragmentacioni eksperimenti su izvedeni uz upotrebu argona kao kolizionog gasa, dok je koliziona energija varirana u zavisnosti od jedinjenja. tSRM (engl. The Time-Selected Reaction Monitoring) eksperimenti za kvantitativnu analizu izvedeni su upotrebom dva MS² fragmenta za svako jedinjenje koje se prethodno pokazalo kao dominantno u PIS eksperimentima [121]. Obrada podataka je izvedena preko Xcalibur softvera (verzija 2.2). Fenolna jedinjenja su identifikovana

direktnim poređenjem spektara sa spektrima komercijalnih standarda. Sadržaj svakog jedinjenja pojedinačno je izračunat preko površine pika i izražen kao mg jedinjenja po litri ekstrakta (mg/L).

3.5.7 Sadržaj masnih kiselina

Masne kiseline su određene pomoću GC/FID analitičke tehnike. Korišćen je Agilent 7890A gasni hromatograf povezan sa FID detektorom. Kolona je bila CP-Sil 88 (100 m, 0,25 mm, 0,20 μ m). Gas nosač je bio azot (1 mL/min). Protok azota u detektoru je bio 25 mL/min, protok vazduha 400 mL/min i vodonika 30 mL/min, dok su temperature injektora i detektora bile 240°C i 270°C, redom. Temperaturni program bio je sledeći: 80°C (0,5 min) sa linearnim rastom od 4°C/min do 220°C (4 min) i daljim rastom od 4°C/min do 240°C (10 min). Krajnji rezultat je izražen kao relativni procenat (%) i kao μ g masne kiseline po gramu lista koprive (μ g/g SN).

3.5.8 Sadržaj vitamina

Analiza vitamina C i B serije rađeni su na HPLC-UV aparatu koji je opremljen sa reverzno-faznom C18 kolonom (Waters SymetryShield RP18, 150 mm, 4,6 mm, 3,5 μ m) na sobnoj temperaturi. Hromatografsko razdvajanje ispitivanih jedinjenja rađeno je pomoću mobilne faze koju čine 70% pufera (natrijum-heskasulfonska kiselina) i 30% metanola. Protok mobilne faze bio je 0,5 mL/min, dok je injektovana zapremina uzorka bila 20 μ L. Detekcija analita je rađena UV detektorom na 254 nm, indentifikacija na osnovu relativnog retencionog vremena, a kvantifikacija metodom eksternog standarda.

3.5.9 Termogravimetrijska analiza ekstrakata koprive

Sva merenja su izvršena na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru (TA Instruments DSC Q1000, Delaware, SAD) i termogravimetrijskom analizatoru (TA Instruments TGA Q500, Delaware, SAD). Analiza podataka dobijenih termalnom analizom rađena je pomoću softvera (TA Universal analysis 2000). Diferencijalni skenirajući kalorimetar je kalibrisan pomoću standarda indijuma visoke čistoće (tačka topljenja 156,60°C, entalpija topljenja 28,51 J/g).

Termogravimetrijski analizator je za masu kalibrisan pomoću standardnih tegova od 100 mg i 1 g, a za temperaturu pomoću Ni na osnovu njegove Kirijeve temperature (358°C).

Za analizu osušenih ekstrakata iz koprive *DSC* metodom korišćeni su otvoreni aluminijumski čančići. Uzorci mase $3,0 \pm 0,5$ mg odmeravani su u aluminijumske čančice koji se potom postavljaju na platformu za uzorke u ćeliji diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra. Kao referentni čančić korišćen je prazan otvoren aluminijumski čančić. Kroz ćeliju diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra se održavao protok azota od 50 mL/min. Merenja su vršena u temperaturnom opsegu od -90 do 300°C pod sledećim režimom: uzorak osušenog ekstrakata je odmah po zatvaranju ćelije diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra ohlađen na -90°C i držan na ovoj temperaturi 5 min do uravnoteženja, a potom je brzinom od 5°C/min grejan do 300°C.

Ispitivanje termalnog razlaganja osušenih ekstrakata koprive vršeno je pomoću termogravimetrijske analize. U tu svrhu uzorci su grejani u temperaturnom opsegu od 25 do 700°C, u struji azota sa protokom od 60 mL/min. Uzorci ekstrakata mase $6,0 \pm 0,5$ mg odmeravani su u čančiću od platine i potom unošeni u *TG* peć pomoću autosamplera. Dobijene *TG* krive, kao i njihove derivativne krive (*DTG*), korišćene su za određivanje termalne stabilnosti osušenih ekstrakata koprive. Temperatura početka (T_{on}) termalnog razlaganja ispitivanih uzoraka određivana je na *DTG* krivama (kao presek ekstrapolisane bazne linije i tangente na nagib pika koji nastaje kao rezultat termalnog razlaganja). T_{on} je korišćena kao pokazatelj termalne stabilnosti osušenih ekstrakata koprive.

3.6 Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata

3.6.1 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

3.6.1.1 Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost neutralizacije DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala određena je pomoću spektrofotometrijske metode [122]. Sama metoda je zasnovana na promeni boje ljubičasto obojenog DPPH radikala u redukovanu formu koja je žute boje. Određena zapremina uzorka se pomeša sa 1 mL rastvora DPPH. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta,

meri se apsorbanca na 515 nm. Na osnovu dobijenih rezultata se izračunava RSC (engl. Radical scavenging capacity) vrednost pomoću sledeće jednačine:

$$RSC(\%) = 100 - \frac{A_u 100}{A_{sp}} \quad (6)$$

gde su: A_u apsorbanca uzorka, A_{sp} apsorbanca slepe probe. Na osnovu izračunatih vrednosti konstruiše se grafička zavisnost RSC vrednosti od koncentracije uzorka. Iz jednačine prave se zatim računaju IC₅₀ vrednosti koje predstavljaju koncentraciju ekstrakta koja neutrališe 50% DPPH radikala. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.6.1.2 Sposobnost neutralizacije hidroksilnih radikala

Sposobnost inhibicije nespecifičnog hidroksilnog radikala određena je ranije opisanom metodom [123]. Od suvih ekstrakata napravljena je serija rastvora od sedam razblaženja u koncentracionom opsegu 0,02 - 0,08 mg/mL. Rastvori su pomešani sa 500 µL 5,6 mM rastvora 2-deoksi-D-riboze u KH₂PO₄-NaOH puferu (50 mM, pH 7,4), 100 µM rastvorom FeCl₃ (200 µL), 104 mM rastvorom EDTA (1:1 v/v), 1,0 mM rastvorom H₂O₂ (100 µL) i 1,0 mM vodenog rastvora askorbinske kiseline (100 µL). Nakon toga, reakciona smeša je inkubirana 30 minuta na 50°C. Po završetku perioda inkubacije 1 mL 2,8% trihlorsirćetne kiseline i 1 mL 1% tiobarbiturne kiseline je dodato u reakcionu smešu. Dalja inkubacija je rađena na 50°C u trajanju od 30 minuta. Kao kontrola korišćena je smeša u koju je umesto uzorka dodata destilovana voda. Svakoј probi i kontroli merena je apsorbanca na 532 nm. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.6.1.3 Sposobnost neutralizacije ABTS radikala

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) test, koji je izvođen po prethodno opisanoj metodi [124], koja se zasniva na reakciji ABTS sa kalijum-persulfatom pri čemu nastaje ABTS katjon radikal. Rastvor nastalog radikala se zatim ostavi da stoji u mraku na sobnoj temperaturi od 12 do 16 časova, pri čemu se rastvor oboji tamno plavo. Dobijeni rastvor se zatim razblažuje fosfatnim puferom (pH 7,4), dok apsorbanca na 734 nm ne bude $0,70 \pm 0,02$. Nakon

toga se 4 mL ovog rastvora inkubira sa 10 μ L uzorka na 30°C u toku 30 minuta, a zatim se očitava apsorbanca. U prisustvu antioksidansa rastvor će se obezbojiti pošto antioksidansi redukuju nastali radikal katjon do ABTS, a obezbojavanje rastvora je u korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću ispitivanih ekstrakata. Kao kontrola korišćena je smeša u koju je umesto uzorka dodata destilovana voda. Sposobnost "hvatanja" ABTS^{•+} radikala izračunata je na osnovu sledeće jednačine:

$$RSC(\%) = 100 - \frac{A_k - A_u}{A_k} \quad (7)$$

gde su: A_u apsorbanca uzorka, A_k apsorbanca kontrole. Iz dobijene zavisnosti $RSC(\%)$ od koncentracije ekstrakta izračunata je IC_{50} vrednost (mg/mL). Kao referentne supstance korišćene su galna kiselina, askorbinska kiselina i butilhidroksitoluen (BHT). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.6.1.4 Redukciona sposobnost ekstrakata

Reduktivna sposobnost ekstrakata određena je prema metodi po Oyaizu [125]. Ova metoda se zasniva na praćenju redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} pod dejstvom ispitivanih uzoraka. Kao mera reduktivne sposobnosti koristi se EC_{50} vrednost koja predstavlja koncentraciju ispitivanog uzorka pri kojoj se postiže 50% redukcije. Uzorci su pomešani sa fosfatnim puferom i 1 mL 1% kalijum-fericijanida, $K_3[Fe(CN)_6]$. Dobijena smeša ostavljena je 20 minuta na temperaturi od 50°C. Nakon toga, 1 mL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline dodat je smeši i ona je centrifugirana 10 minuta. Dobijenom supernatantu (2 mL) dodata je bidestilovana voda (2 mL) i 0,1% $FeCl_3$ (0,4 mL). Apsorbanca uzorka izmerena je na talasnoj dužini od 700 nm. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Redukciona sposobnost ispitivanih ekstrakata je izražena preko EC_{50} vrednosti (mg/mL).

3.6.1.5 Sposobnost heliranja metalnih jona

Određivanje helirajuće sposobnosti je izvedeno prema ustaljenoj metodi [126]. Reakciona smeša je pripremana mešanjem sa 0,125 mM $FeSO_4$ (1 mL). Odmah zatim je dodat 1 mL ferozina (0,3125

mM). Ovako pripremljenoj reakcionoj smeši merena je apsorbanca ($\lambda = 562$ nm) nakon 10 minuta. Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednosti (mg/mL). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.6.1.6 Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije

Sposobnost ekstrakata koprive da inhibiraju lipidnu peroksidaciju određen je po tiocijanidnoj metodi [127]. Uzorak je pomešan sa 2,5 mL emulzije linolne kiseline (40 mM, pH 7,0). Emulzija linolne kiseline pripremana je mešanjem 0,2804 g linolne kiseline i 0,2804 g Tween-20 u 50 ml 40 mM fosfatnog pufera. Smeša je nakon toga inkubirana na 37°C tokom 72 sata. Nakon isteka vremena, 0,1 mL reakcione smeše je pomešano sa 4,7 mL etanola (75%), 0,1 ml FeCl₂ (20 mM) i 0,1 mL amonijumtiocijanata (30%). Nakon intenzivnog mešanja u trajanju od 3 minuta, izmerena je apsorbanca na talasnoj dužini 500 nm. Askorbinska kiselina, galna kiselina, α -tokoferol i BHT korišćeni su kao referentne supstance u ovom eksperimentu. Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednosti (mg/mL).

3.6.1.7 Određivanje antioksidativne aktivnosti HMPC metodom

Polarografska merenja rađena su uređajem PAR (engl. Princeton Applied Research) 174A sa X-Y pisačem (Houston Instruments, Omnigraph 2000) radi automatskog beleženja polarograma. Primljeni elektrodni sistem se sastojao od tri elektrode: radne kapljuće živine elektrode, zasićene kalomelove elektrode i platinske elektrode. Polarografska ćelija je zapremine 30 mL. Brzina isticanja žive bila je 1 s. Brzina promene polarizujućeg napona iznosila je 10 mV/s, dok je početni potencijal bio 0,1 mV prema ZKE. Merenja su izvedena prema postupku koji je opisan od strane Gorjanović i sar. [128], dok su rezultati izraženi kao procenat smanjenja anodne struje po mL ekstrakta (%/mL). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.6.2 Antimikrobna aktivnost ekstrakata

Antimikrobna aktivnost ekstrakata koprive određena je merenjem njihove minimalne inhibitorne koncentracije MIC (engl. Minimum Inhibitory Concentration) mikrodilucionom metodom [129] na sojevima mikroorganizama: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae*

(ATCC 13883), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231) i *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Identifikacija ispitivanih mikroorganizama potvrđena je od strane Laboratorije za mikologiju Odseka za mikrobiologiju Instituta Torlak u Beogradu, Srbija. Sterilisani Mueller Hinton agar (MHB) je korišćen u slučaju bakterija, dok je u eksperimentima sa kvascima korišćen Sabouraud dekstrozni agar. Pri određivanju antimikrobne aktivnosti suvi ekstrakti koprive su rastvoreni u vodi do sadržaja 400 µg/mL, odakle je dalje pravljen serija razblaženja (312, 156, 78, 39 i 19,5 µg/mL). Nakon mešanja uzoraka ekstrakata sa sojevima mikroorganizama koncentracija bakterijskih ćelija iznosila je 10⁶ CFU/mL (Colony Forming Unit - jedinica formiranih kolonija), dok je koncentracija kvasaca iznosila 3×10⁴ CFU/mL. Kao pozitivna kontrola korišćen je Amracin u slučaju bakterija, odnosno Nistatin kod sojeva kvasca. Ploče sa zasejanim mikroorganizmima su obavijene parafilmom i inkubirane. Inkubacija je, u slučaju bakterija, izvođena 24 h na 37°C, odnosno u slučaju kvasaca 48 h na 28°C, nakon čega je određivana minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Ova vrednost predstavlja onu koncentraciju ekstrakata pri kojoj je došlo do promene boje, odnosno najmanju koncentraciju koja je inhibirala rast mikroorganizama. Za svaki uzorak i svaku koncentraciju postupak je ponovljen tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost (µg/mL). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.6.3 Citotoksična aktivnost ekstrakata

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata koprive određena je MTT testom [130,131]. Test se zasniva na nastanku ljubičastih kristala formazana raspadom tetrazolijumove MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromida) pod dejstvom dehidrogenaze živih ćelija. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih ćelija i očitava se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 580 nm. Pri određivanju antiproliferativne aktivnosti ekstrakata korišćene su sledeće tumorske ćelije: Hep2 (engl. Human cervix carcinoma; podloga: MEM Eagle/5% FCS), RD (engl. Human Rhabdomyosarcoma; podloga: MEM Eagle/10% FCS) i L2OB (engl. Murine fibroblast; podloga: MEM Eagle/10% FCS). Za potrebe ispitivanja antiproliferativne aktivnosti ekstrakata koprive, suvi ekstrakti su rastvarani u apsolutnom etanolu (5 mg/mL). Suspenzije ćelija prenešene su na mikrotitar ploče (2 x 10⁵ ćelija/mL; 100 µL/otvor), a potom inkubirane na 37°C u atmosferi

sa 5% CO₂ u inkubatoru. Nakon 24 časovne inkubacije ćelijskim suspenzijama je dodat rastvor ekstrakata koprive različitih koncentracija (25, 50, 100, 250, 500, 750, 1.000 µg/mL), kao i kontrola (apsolutni etanol). Potom su ćelije inkubirane na 37°C, 48 sati. Kontrolne, netretirane ćelije su rasle pod istim uslovima. Po završetku perioda inkubacije supernatant je odbačen, a ćelijama je dodat rastvor MTT koncentracije 500 µg/mL. Nakon dodatka po 100 µL MTT rastvora usledila je četvoročasovna inkubacija (37°C). Reakcija je prekinuta dodavanjem 100 µL natrijum-dodecilsulfata (10% u 10 mM HCl). Nastali formazanski kristali rastvoreni su dodatkom DMSO, a apsorbancija je očitana 24 sata kasnije na 580 nm na spektrofotometru. Obzirom da je apsorbancija novonastalog formazana direktno srazmerna broju živih ćelija, apsorbancija tretiranih ćelija podeljena je apsorbancijom kontrolnih netretiranih ćelija i potom je ta vrednost pomnožena sa 100. Apsorbancija slepe probe je uvek oduzeta od apsorbance odgovarajućeg uzorka. Antiproliferativna aktivnost je izražena kao IC₅₀ vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta). Sva merenja su izvedena u tri ponavljanja.

3.7 Pripremanje i analiza hleba sa dodatkom lista i ekstrakta koprive

3.7.1 Priprema hleba

Hleb je pripreman prema postupku koji je propisan standardnom AACC metodom. Sirovinski sastav hlebnog testa je bio sledeći: brašno, suva kopriva (2,5% ili 5% računato na brašno) ili ekstrakt koprive (2,5% ili 5% računato na brašno), kuhinjska so (2%), pekarski suvi kvasac (0,5%) i voda [132].

3.7.2 Zapremina hleba

Zapremina hleba je ocenjena 24 h nakon pečenja, a određena je postupkom istiskivanja semena uljane repice [132].

3.7.3 Tekstura hleba

Tekstura hleba je rađena na teksturometru TA.XT Plus (Stable Micro Systems, England, UK), po modifikovanoj AACCC metodi 74-10A gde je merena elastičnost u funkciji čvrstoće hleba. Korišćena je aluminijumska cilindrična sonda 36 mm i ćelija opterećenja 5 kg. Radni parametri su sledeći: početna brzina 1 mm/s, brzina 1,7 mm/s i brzina vraćanja 1,7 mm/s. Za ispitivanja uzorci hleba su sečeni u vidu pravougaonika dimenzija 3 cm x 2 cm x 2 cm (dužina x širina x debljina). Hlebovi su ocenjeni na 40% deformacije. Čvrstoća hleba je snimana kao maksimum sile pri deformaciji. Elastičnost hleba je izračunata kao površina ispod prve kompresije i predstavlja pokazatelj brzine oporavka sredine hleba [133].

3.7.4 Boja hleba

Boja hleba određena je u pet ponavljanja upotrebom kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Japan) (prečnik kontaktne površine 8 mm). Uzorci za merenje boje su pripremljeni mlevenjem na laboratorijskom mlinu Foss knifetec 1095. Pre merenja izvršena je kalibracija standardom bele boje. Rezultati su prezentovani prema CIELab sistemu boja, gde su koordinate definisane na sledeći način: L* je koordinata svetloće boje (gde 0 označava crno, a 100 belo), a* je crveno-zelena koordinata (gde a*+ označava crvenu i a*- označava zelenu boju), b* je žuto-plava koordinata (gde b*+ označava žutu i b*- označava plavu), C je razlika u obojenosti, h je razlika u tonovima i DW dominantna talasna dužina [133].

3.7.5 Osnovni hemijski sastav hleba

Sadržaj proteina je dobijen na osnovu sadržaja azota koji je određen po A.O.A.C Micro-Kjeldahl metodu 962.52 (AOAC, 1994) i upotrebom faktora 6,25 za preračunavanje sadržaja azota u sadržaj proteina. Sadržaj skroba je određen metodom po Ewers-u. Sadržaj ukupnih šećera je određen po Luff-Schoorl metodi. Sadržaj lipida je određen hidrolizom po Weibull Stold metodi. Sadržaj celuloze je određen po Weender-u. Sadržaj pepela je određen gravimetrijski [133].

3.7.6 Mineralni sastav hleba

Određivanje sadržaja Zn, Cu, Mg, Ca i Fe je određen po akreditovanoj metodi (Fins.lab. 5.4.3 –M-004/13 2011).

3.7.7 Deskriptivna senzorska analiza-potrošački test

Test za procenu kvaliteta i prihvatljivosti hleba sa koprivom i ekstraktom koprive obavljen je od strane potrošača deskriptivnom senzorskom analizom. Identifikacija i odabir deskriptora za utvrđivanje senzorskog profila je urađena multidimenzionim postupkom. Senzorni parametri (izgled, ukus, miris, tekstura) hleba sa koprivom i ekstraktom koprive ocenjen je u skali od 6 tačaka intenziteta (0 - nije zapaženo, 5 – jako prisutno).

3.7.8 Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u hlebu

Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida je određen prema prethodno opisanim metodama (poglavlja 3.5.1 i 3.5.2) uz male modifikacije. Određena masa uzorka je usitnjena i prenesena u erlemajer gde je pomešana sa neophodnim reagensima. Erlemajer je zatim postavljen u laboratorijsku tresilicu sa termostatom (KS 40000, IKA, Staufen, Nemačka) na 150 obrtaja u minuti (rpm).

3.7.9 Antioksidativna aktivnost hleba

Antioksidativna aktivnost je ispitana prema DPPH radikalima po prethodno opisanoj metodi (poglavlje 3.6.1.1) uz modifikacije. Određena masa uzorka je usitnjena i prenesena u erlemajer gde je pomešana sa rastvorom DPPH radikala. Erlemajer je postavljen u laboratorijsku tresilicu [134]. Nakon 1 h određena je apsorbanca na 515 nm.

3.7.10 Citotoksična aktivnost hleba

Citotoksična aktivnost uzoraka hleba je određena prema prethodno opisanoj metodi (poglavlje 3.6.3).

4. Rezultati i diskusija

4.1 Hemijski sastav lista koprive

4.1.1 Hemijski sastav etarskog ulja

Kako bi se ispitaio hemijski sastav lista koprive, primenjene su različite analitičke tehnike za pripremu uzoraka i samu analizu. Među njima su čvrsto-tečna ekstrakcija, mikrotalasna digestija, hidrodestilacija, zatim GC/MS, GC/FID, ICP-OES i živin analizator.

Uzorak etarskog ulja (EU) lista koprive je dobijen hidrodestilacijom lista u aparaturi po Clevenger-u. Uzorak je dalje analiziran upotrebom GC/MS i GC/FID tehnika, pri čemu je MS korišćen za identifikaciju, dok je FID korišćen za kvantifikaciju komponenata u analiziranom uzorku. Dobijeni rezultati su dati u tabeli 5 [135].

Tabela 5. Hemijski sastav etarskog ulja lista koprive

Jedinjenje	Sadržaj (mg/g EU)
<i>Ciklični monoterpeni</i>	
(+)-Limonen	< 0,1
α -Pinen	< 0,1
β -Pinen	< 0,1
γ -Terpinen	< 0,1
<i>Aciklični oksigenovani monoterpeni</i>	
Linalool	5,1
Geraniol	< 0,1
<i>Ciklični oksigenovani monoterpeni</i>	
Kamfor	< 0,1
Eukaliptol	< 0,1
α -Terpineol	< 0,1
<i>Aromatični oksigenovani monoterpeni</i>	
Karvakrol	4,1
Eugenol	1,2
Metil-kavikol	< 0,1

Iz prikazanih rezultata može se zapaziti da je mali broj monoterpena detektovano, kao i da je njihov sadržaj mali, pa se može zaključiti da sam list koprive nije bogat etarskim uljem. Sam prinos ulja

je bio izuzetno mali (4,5 mg/100 g SN). Dominantna jedinjenja u uzorku bila su linalool, karvakrol i eugenol sa sadržajima od 5,1, 4,1 i 1,2 mg/g EU. Sličan sadržaj ova tri oksigenovana monoterpena je potvrđen i u prethodno sprovedenom istraživanju [90].

Međutim, iako je sadržaj ovih komponenata mali, njihovo prisustvo u listu koprive je veoma značajno. Ranije sprovedena istraživanja su pokazala da etarska ulja i njihove komponente poseduju antikancerogenu, antivirusnu i antinociceptivnu aktivnost, kao i blagotvorno delovanje na faktore rizika vezane za kardiovaskularna oboljenja [136,137]. Limonen i eugenol ispoljavaju antikancerogenu aktivnost delujući u početnim ili progresivnim fazama putem inhibicije proliferacije ćelija ili učešćem u procesu prenosa apoptičkog signala generisanjem ROS [137–140]. Istraživanja karvakrola su pokazala da utiče na morfološke promene ćelije, čime utiče na apoptozu [141]. Za linalool se utvrdilo da pokazuje antinociceptivno dejstvo putem različitih mehanizama [142–145]. γ -Terpinen sprečava oksidaciju LDL [146], dok karvakrol suzbija aktivnost 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze preko post-transkripcionih delovanja [147], što dalje rezultuje smanjenjem koncentracije LDL putem stimulisanja LDL receptora i istovremenim povećanjem koncentracije holesterola [148]. Takođe, postoje i radovi koji potvrđuju antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost ovih jedinjenja koja je usko povezana sa njihovim strukturama [148–152].

4.1.2 Hlorofil i karotenoidi

Sadržaj hlorofila i karotenoida je određen u ekstraktima dobijenim Soxhlet ekstrakcijom upotrebom 96% etanola, metilen-hlorida i *n*-heksana kao rastvarača. Dobijeni rezultati su dati u tabeli 6, dok su etanolni i metilen-hloridni ekstrakti prikazani na slici 41 [135].

Tabela 6. Sadržaj hlorofila A, hlorofila B, ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida u listu koprive

Rastvarači	Sadržaj (mg/g E)			
	HL-A	HL-B	HL	Cx
96% etanol	16,55	7,58	24,13	5,47
metilen-hlorid	15,65	5,60	21,25	12,71
<i>n</i> -heksan	4,12	0	4,12	6,48
Sadržaj u 100 g lista (mg/100 g SN)	208,95	95,68	304,63	69,07

Oznake: HL-A: hlorofil A; HL-B: hlorofil B; HL: ukupni hlorofil; Cx: ukupni karotenoidi

Kao što je i očekivano, najveći sadržaj ukupnog hlorofila bio je u etanolnom ekstraktu, dok je najmanji bio u heksanskom. Najveći sadržaj hlorofila A je dobijen upotrebom metilen-hlorida, dok je najveći prinos hlorofila B bio u etanolnom ekstraktu. Sadržaj ukupnih karotenoida je najveći upotrebom metilen-hlorida kao ekstragensa, dok je najmanji bio u etanolnom ekstraktu. Sastav ekstrakata dovodi do njihove karakteristične boje (slika 41). Iz rezultata se može zaključiti da se hlorofil najbolje rastvara u etanolu, dok su karotenoidi veoma dobro rastvorni u metilen-hloridu.



Slika 41. Etanolni (levo) i metilen-hloridni (desno) ekstrakti lista koprive

Kao što se iz tabele 6 može videti, sadržaji ovih pigmenata u 100 g lista koprive bili su sledeći: 208,95; 95,68; 304,63 i 69,07 mg/100 g za hlorofil A, hlorofil B, ukupni hlorofil i ukupne karotenoide. Prethodna ispitivanja sadržaja ovih pigmenata u listu koprive pokazala su njihov značajnije manji sadržaj. Kukurić i saradnici [81] su dobili 88,20 mg/100 g (hlorofil A), 28,50 mg/100 g (hlorofil B), i 117,40 mg/100 g (ukupni hlorofil) u mladom listu koprive, dok je sadržaj ukupnih karotenoida bio 32,30 mg/100 g. Isti autori su ispitali sadržaj ovih pigmenata u lišću koje se nalazi na središnjem delu stabljike, a koji je bio 69,80; 32,00; 102,00 i 21,60 mg/100 g za

hlorofil A, hlorofil B, ukupni hlorofil i ukupne karotenoide. Guil-Guerrero i saradnici [77] su utvrdili da postoji razlika u sadržaju karotenoida u mladom i starom listu koprive gde su dobili 5,14 mg/100 g i 7,48 mg/100 g za mladi i stari list. Analiza sprašenog lista koprive pokazala je sadržaj karotenoida od 349,67 mg/100 g lista [153], što je značajnije veći rezultat od onog dobijenog u ovom radu [135].

Značaj ovih pigmenata je opšte poznat. Hlorofil A igra značajnu ulogu u procesu fotosinteze gde predstavlja primarni fotoreceptor, dok hlorofil B i karotenoidi predstavljaju dodatne fotoreceptore koji prenose energiju do reakcionog centra. Pored ove uloge, karotenoidi predstavljaju zaštitu za hlorofil od procesa degradacije, a predstavljaju i veoma potentne antioksidanse neutrališući ROS/RNS putem različitih mehanizama delovanja [28,34,154–157]. Karotenoidi predstavljaju najpoznatije prekursore za sintezu vitamina A, odgovorni su za boju žute tačke (deo retine) i akumuliraju se u koži gde vrše zaštitnu ulogu od UV zračenja [154].

4.1.3 Masne kiseline

Masne kiseline (MK) se prema svojoj strukturi mogu podeliti u dve velike grupe: zasićene (SFA) i nezasićene masne kiseline (UFA). Nezasićene se mogu dalje podeliti na mononezasićene masne kiseline (MUFA) i polinezasićene masne kiseline (PUFA). Uzorci za ovu analizu pripremljeni su primenom dve različite metode: klasične i ubrzane Soxhlet ekstrakcije pomoću Soxtherm aparata. Klasična čvrsto-tečna ekstrakcija je rađena pomoću smeše formaldehid-etanol (2:1, v/v), dok je Soxhlet ekstrakcija izvedena pomoću petrol-etra [135,158]. Nazivi masnih kiselina koje su analizirane u ovom radu dati su u tabeli 7, dok su dobijeni rezultati dati u tabeli 8.

Iz prikazanih rezultata se može zapaziti da je veći broj masnih kiselina izdvojen upotrebom Soxhlet ekstrakcije. U pitanju su C6:0, C8:0, C10:0, C15:0, C15:1 i C20:5 kiseline koje su se u Soxhlet ekstraktu javile u maloj koncentraciji. Kod ekstrakta dobijenog klasičnim pristupom, dominantna MK je C18:3, praćena C16:0 i C18:2. Pored ove tri kiseline u većim koncentracijama se javljaju još i C20:0, C22:0 i C24:0. Sa druge strane, kod Soxhlet ekstrakta dominira C12:0 koja je praćena C16:0 i C18:1 kiselinama. Pored ove tri MK ističu se i C14:0, C18:0, C22:0, C20:0, C24:0, C8:0 i C10:0. Iz ovoga se vidi da u Soxhlet ekstraktu dominiraju SFA, dok su u slučaju klasične ekstrakcije dominantne UFA. Pored odnosa SFA-UFA, kod ove dve ekstrakcione metode se

razlikuju i odnosi MUFA-PUFA. Tabela 8 pokazuje da u slučaju klasične metode dominiraju PUFA, dok je kod Soxhlet ekstrakcije obrnuto, odnosno dominiraju MUFA [135,158].

Tabela 7. Nazivi i oznake analiziranih masnih kiselina

Oznaka	IUPAC naziv	Trivijalni naziv
C6:0	Heksanska kiselina	Kaprnska kiselina
C8:0	Oktanska kiselina	Kaprilna kiselina
C10:0	Dekanska kiselina	Kaprinska kiselina
C11:0	Undekanska kiselina	Undecilinska kiselina
C12:0	Dodekanska kiselina	Laurinska kiselina
C13:0	Tridekanska kiselina	Tridecilinska kiselina
C14:0	Tetradekanska kiselina	Miristinska kiselina
C14:1	<i>cis</i> - Δ^9 -tetradekenska kiselina	Miristoleinska kiselina
C15:0	Pentadekanska kiselina	Pentadecilnska kiselina
C15:1	<i>cis</i> - Δ^{10} -Pentadekenska kiselina	-
C16:0	Heksadekanska kiselina	Palmitinska kiselina
C16:1	<i>cis</i> - Δ^9 -heksadekenska kiselina	Palmitoleinska kiselina
C17:0	Heptadekanska kiselina	Margarinska kiselina
C17:1	<i>cis</i> - Δ^{10} -Heptadekenska kiselina	-
C18:0	Oktadekanska kiselina	Stearinska kiselina
<i>cis</i> -C18:1	<i>cis</i> - Δ^9 -oktadekenska kiselina	Oleinska kiselina
<i>trans</i> -C18:1	<i>trans</i> - Δ^{11} -oktadekenska kiselina	Vakcenska kiselina
C18:2	<i>cis,cis</i> - $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoinjska kiselina	Linolna kiselina
α -C18:3 n-3	<i>cis,cis,cis</i> - $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoinjska kiselina	α -Linolenska kiselina
γ -C18:3 n-6	<i>cis,cis,cis</i> - $\Delta^{6,9,12}$ -oktadekatrienoinjska kiselina	γ -Linolenska kiselina
C20:0	Eikozanoinjska kiselina	Arahidinska kiselina
C20:1	<i>cis</i> - Δ^{11} -Eikozenoinjska kiselina	Gondoinska kiselina
C20:2	<i>cis,cis</i> - $\Delta^{11,14}$ -Eikozadinoinska kiselina	-
C20:3 n-6	<i>cis,cis,cis</i> - $\Delta^{8,11,14}$ -Eikozatrinoinjska kiselina	Dihomo- γ -linolenska kiselina (DGA)
C20:3 n-3	<i>cis,cis,cis</i> - $\Delta^{11,14,17}$ -Eikozatrinoinjska kiselina	-
C20:4	<i>cis,cis,cis,cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eikozatetraenoinjska kiselina	Arahidonska kiselina
C20:5	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eikozapentaenoinjska kiselina	Eikozapentaenoinjska kiselina (EPA)
C21:0	Heneikozanonska kiselina	-
C22:0	Dokozanoinjska kiselina	Behenska kiselina
C22:2	<i>cis,cis</i> - $\Delta^{13,16}$ -Dokozadinoinska kiselina	-
C22:6	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> - $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -Dokozaheksaenoinjska kiselina	Dokozaheksaenoinjska kiselina (DHA)
C23:0	Trikozanoinska kiselina	Trikozilna kiselina
C24:0	Tetrakozanoinska kiselina	Lignocerinska kiselina
C24:1	<i>cis</i> - Δ^{15} -Tetrakozenoinjska kiselina	Nervonska kiselina

Tabela 8. Sadržaj masnih kiselina u listu koprive

Masna kiselina*	Klasična ekstrakcija		Soxhlet ekstrakcija	
	Relativni sadržaj (%)	Sadržaj (µg/g)	Relativni sadržaj (%)	Sadržaj (µg/g)
C6:0	/	/	0,27	5,09
C8:0	/	/	2,23	37,56
C10:0	/	/	2,12	35,67
C12:0	1,30	4,09	20,94	348,07
C14:0	3,00	9,19	9,45	157,54
C14:1	0,50	1,72	0,26	4,65
C15:0	/	/	0,32	5,51
C15:1	/	/	0,16	2,86
C16:0	20,20	60,97	18,57	309,06
C16:1	1,00	3,19	0,24	4,18
C17:0	0,30	1,09	0,25	4,33
C17:1	0,50	1,46	0,13	2,20
C18:0	3,30	9,95	8,72	145,25
<i>cis</i> -C18:1	3,20	9,80	13,16	219,44
C18:2	18,20	55,99	3,00	50,17
C20:0	6,90	20,91	5,26	87,80
α -C18:3 n-3	22,60	67,98	1,02	17,02
C21:0	0,90	2,76	0,50	8,20
C20:2	2,80	8,53	0,75	12,68
C22:0	5,90	17,95	6,13	102,08
C20:4	0,50	1,76	0,41	7,13
C23:0	1,10	3,52	0,17	3,05
C22:2	1,30	4,40	0,31	5,94
C24:0	4,30	12,99	4,84	80,50
C20:5	/	/	0,30	5,22
C24:1	1,70	5,07	0,49	8,36
SFA	47,20	143,42	79,77	1329,71
UFA	52,70	159,90	20,23	339,85
MUFA	6,90	21,24	14,44	241,69
PUFA	45,80	138,66	5,79	98,16
SFA : UFA odnos		0,9		3,9

*Za nazive masnih kiselina videti tabelu 7

Prethodna ispitivanja sadržaja MK u listu koprive pokazala su dominaciju C16:0, C18:2 i C18:3 kiselina [77,78]. Međutim, razlika u profilu koja se javlja kod Soxhlet ekstrakta može se objasniti interakcijom C18:2 i C:18:3 MK sa polarnim rastvaračem (etanolom), pa je samim tim njihov sadržaj u ekstraktu dobijenom klasičnim postupkom veći. Ovo su prethodno utvrdili Peres i

saradnici [159] koji su ispitivali uticaj tehnika i rastvarača na sadržaj MK u biljci *Piper gaudichaudianum* K.

Najpoznatija uloga MK je da služe kao gradivne jedinice ćelijskog zida (kao triacilgliceroli), kao oblik skladištenja energije (u obliku fosfolipida) i kao prenosioci signala (kao diacil gliceroli) [29]. Prisustvo n-3 i n-6 MK u listu koprive je veoma značajno, jer ove MK pokazuju anti-inflamatorno, antitrombično, antiaritmično, hipolipidemijsko i vazodilatorno dejstvo. Ove kiseline su sekundarni preventeri nekih poremećaja i bolesti kao što su koronarna oboljenja srca, a imaju i uticaj na faktore rizika od pojave kancera i bolesti srca [30–32].

4.1.4 Sadržaj minerala

Sadržaj minerala i metala u listu koprive određen je nakon mikrotalasne digestije uzorka lista na ICP-OES, dok su dobijeni rezultati dati u tabeli 9 [135].

Tabela 9. Sadržaj minerala i metala u koprivi

Element	Sadržaj (mg/kg)
<i>Makroelementi</i>	
Na	296,20 ± 1,29
K	33.899,00 ± 4077,05
Mg	8.699,76 ± 310,18
Ca	28.605,00 ± 825,04
<i>Mikroelementi</i>	
Fe	150,97 ± 5,41
Cu	8,00 ± 0,38
Mn	81,40 ± 4,24
Zn	18,03 ± 0,60
Cr	0,31 ± 0,03
Sn	0,49 ± 0,05
Ni	0,03 ± 0,01
<i>Toksični elementi</i>	
Pb	0,18 ± 0,02
Cd	0,02 ± 0,01
Hg	ND*
As	0,35 ± 0,26

*ND-nije određen

Očekivano se može zapaziti visok sadržaj makroelemenata (natrijum, kalijum, kalcijum i magnezijum), gde kalijum dominira u odnosu na natrijum, a kalcijum u odnosu na magnezijum. Od mikroelemenata dominira gvožđe (150,97 mg/kg) koje je praćeno manganom (81,40 mg/kg) i cinkom (18,03 mg/kg). Sa druge strane, zabeleženo je prisustvo olova, kadmijuma i arsena u veoma niskim koncentracijama, dok živa nije detektovana [135]. Ovo ukazuje na izuzetnu čistoću zemljišta i podzemnih voda na mestu gde je ova biljka rasla.

Prisustvo mikroelemenata gvožđa, mangana, cinka i bakra je veoma značajno, pogotovo za zdravlje ljudi. Gvožđe ima ulogu u procesu transporta kiseonika, odnosno kofaktor je enzima hemoglobina i mioglobina. Takođe, neophodan je i za pravilno funkcionisanje citohroma. Cink i mangan su neophodni za pravilno funkcionisanje enzima kao što su hidrolaze, peptidaze i oksidaze, dok cink učestvuje u procesu ekspresije gena i pravilnom uvijanju peptidnih lanaca u sekundarne i tercijarne strukture putem formiranja cink finger proteina. Bakar učestvuje u procesu prenosa elektrona [34,160].

4.2 Ekstrakcije koprive i ispitivanje ekstrakata

4.2.1 Preliminarne ekstrakcije lista koprive

Na samom početku ispitivanja lista koprive dobijeni su UAE ekstrakti upotrebom sledećih rastvarača: voda, 96% etanol, etil-acetat, metilen-hlorid, aceton i *n*-heksan. List koprive je ekstrahovan uz odnos droga-rastvarač 1:30 u toku 45 minuta. Određeni su prinosi (Y), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) i flavonoida (TFC), kao i antioksidativna aktivnost (IC₅₀ i EC₅₀) upotrebom dva različita testa [161]. Rezultati su dati u tabeli 10.

Tabela 10. Prinosi i antioksidativna aktivnost preliminarno dobijenih ekstrakata lista koprive

Rastvarač	Y (g/100 g)	TPC (mg CAE/g SN)	TFC (mg CE/g SN)	IC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ (mg/mL)
Voda	16,98	183,41 ± 13,85	5,70 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00
96% Etanol	3,66	12,52 ± 0,07	1,59 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,13 ± 0,00
Metilen-hlorid	1,44	10,77 ± 0,57	1,84 ± 0,18	0,10 ± 0,00	0,37 ± 0,02
Etil-acetat	1,50	8,82 ± 0,89	1,40 ± 0,00	0,12 ± 0,00	1,25 ± 0,05
Aceton	1,14	7,57 ± 0,96	1,16 ± 0,03	-	1,28 ± 0,04
<i>n</i> -Heksan	1,56	4,08 ± 0,16	0,78 ± 0,10	-	-

Iz priloženih rezultata može se zapaziti da se daleko najveći prinos dobija upotrebom vode kao rastvarača. Isti rezultat se dobija i u slučaju sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, gde voda apsolutno dominira kao rastvarač. Pored vode, dobri rezultati su se pokazali i u slučaju metilenhlorida. Ovo takođe važi i za antioksidativne testove, gde su se najniže IC₅₀ i EC₅₀ vrednosti dobile kod vodenih ekstrakata. Na osnovu celokupnih rezultata, odlučeno je da se za sve dalje ekstrakcije koristi voda kao ekstragens.

4.2.2 Dobijanje i ispitivanje sastava vodenih i Soxhlet ekstrakata koprive

Nakon početnih ispitivanja, dobijeni su vodeni ekstrakti listova koprive maceracijom (MAC), ultrazvučnom (UAE) i mikrotalasnom ekstrakcijom (MAE), dok je za Soxhlet ekstrakciju (SE) korišćen 96% etanol. Nakon završetka procesa određeni su prinosi ekstrakcije uparavanjem i sušenjem tečnog ekstrakata, kao i određivanje sadržaja TPC i TFC [161]. Rezultati su dati u tabeli 11.

Tabela 11. Prinosi ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima koprive

Parametar	Ekstrakt			
	SE	MAC	UAE	MAE
Y (g/100 g)	21,75	10,25	18,30	30,75
TPC (mg CAE/g SN)	128,20 ± 20,20	115,35 ± 12,15	147,46 ± 18,31	380,08 ± 14,91
TFC (mg CE/g SN)	3,55 ± 0,90	2,21 ± 0,54	5,34 ± 0,09	10,99 ± 0,12

Iz dobijenih rezultata se može zapaziti da najveći prinos ekstrakcije daje MAE, što važi i za sadržaje TPC i TFC. Najniže vrednosti sva tri ispitivana parametra zabeleženi su u slučaju MAC, dok su SE i UAE dali bliske rezultate. Tako, TPC u MAE ekstraktu je 2,6 puta veći od vrednosti dobijene u UAE ekstraktu, dok je TPC u UAE ekstraktu veći 1,2 puta od TPC u SE i 1,3 puta od vrednosti detektovane u MAC ekstraktu. Slična razlika se javlja i kod TFC, gde je vrednost za MAE ekstrakt 2,1 puta veća od one za UAE ekstrakt [161].

Prethodno objavljeni rezultati ukazuju na zavisnost TPC i TFC od upotrebljenog rastvarača i ekstrakcione metode. Takođe, pokazalo se da su značajni faktori vreme branja koprive, kao i od lokacije na kojoj biljka raste [72,74,81,95,162,163]. Soxhlet ekstrakt je pokazao TPC u opsegu 1,27-24,22 mg GAE/g SN, dok je TFC bio u opsegu 4,33-43,34 mg QE/g SN (miligrami ekvivalenta kvercetina) [163]. Kako se u ovim analizama mogu koristiti različita fenolna jedinjenja

kao ekvivalenti, rezultati nisu uvek uporedivi. Poređenjem MAE i UAE metoda ekstrakcije, dokazana je veća efikasnost MAE [162], što je takođe potvrđeno i u ovom radu.

Kako bi se utvrdio polifenolni profil, urađena je HPLC analiza ekstrakata. Rezultati kvalitativne analize dati su u tabeli 12. Najveći broj jedinjenja je identifikovan u SE ekstraktu, dok je najmanje detektovano u MAC ekstraktu. Identifikovana jedinjenja se mogu podeliti u tri grupe: fenolne kiseline, derivate kumarina i flavonoide [161].

Tabela 12. Kvalitativni profil vodenih ekstrakata lista koprive

Jedinjenje	<i>m/z</i> [M-H]	MS/MS	Ekstrakt			
			SE	MAC	UAE	MAE
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	137	93	+	-	+	+
Cinaminska kiselina	147	103	+	+	+	+
Protokatehinska kiselina	153	109	+	-	+	-
Gentizinska kiselina	153	109	+	+	-	+
<i>p</i> -Kumarna kiselina	163	119	+	+	+	+
Galna kiselina	169	125	+	+	+	+
Ferulna kiselina	193	134	+	-	+	+
Siringinska kiselina	197	182	+	+	+	+
Sinapinska kiselina	223	193	+	+	+	+
Hininska kiselina	191	85	+	+	+	+
Umbeliferon	161	133	+	-	-	+
Eskuletin	177	133	+	+	+	+
Skopoletin	191	176	+	+	+	+
Apigenin	269	117	+	-	-	-
Luteolin	285	133	+	-	-	-
Hrizoeriol	299	284	+	-	+	+
Kemferol	285	285	+	-	-	-
Kvercetin	301	151	+	-	-	-
Izoramnetin	315	300	+	-	+	+
Mircetin	317	179	+	+	+	+
Genistein	269	133	+	+	-	+
Naringenin	271	151	+	-	+	+
Katehin	289	245	+	+	+	+
Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	447	284	+	+	+	+
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	447	285	+	-	+	+
Kvercitrin	447	300	+	-	+	+
Rutin	609	300	+	+	+	+

Fenolne kiseline kao što su *p*-hidroksibenzoeva, cinaminska, protokatehinska, gentizinska, *p*-kumarna i galna kiselina su identifikovane preko [M-H-44]⁻ fragmenta koji nastaje gubitkom karboksilne funkcionalne grupe (-CO₂). Ferulna, siringinska i sinapinska kiselina su identifikovane

preko fragmenata koji nastaju gubitkom metil (-CH₃), metoksi (-OCH₃) i karboksilne grupe čime se formiraju [M-H-15]⁻, [M-H-30]⁻ i [M-H-59]⁻ jonski fragmenti [164]. Hininska kiselina je identifikovana po jonskom fragmentu *m/z* 85 [165], dok skopoletin, eskuletin i umbeliferon daju karakteristične [M-H]⁻ fragmente na *m/z* 191, 177 i 161. Skopoletin gubi metil grupu i daje [M-H-15]⁻ fragment na *m/z* 176. Eskuletin i ubeliferon daju karakterističan pik na *m/z* 131 koji potiče od [M-H-44]⁻ i [M-H-28]⁻ fragmenata [73].

Detektovani flavonoidi se mogu dalje podeliti u nekoliko grupa: flavoni (apigenin, luteolin i hrizoeriol), flavonoli (kemferol, kvercetin, izoramnetin i mircetin), izoflavoni (genistein), flavanoni (naringenin), flavanoli (katehin) i njihovi glikozidi (kemferol-3-*O*-glukozid, luteolin-7-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid ili kvercitrin i kvercetin-3-*O*-rutinozid ili rutin). Apigenin, luteolin i hrizoeriol daju [M-H]⁻ fragmente na *m/z* 269, 285 i 299. Potvrda prisustva apigenina i luteolina jesu pikovi na *m/z* 117 i 133 koji potiču od [M-H-C₇H₄O₄]⁻ i [M-C₈H₇O₂-H₂O]⁻ fragmenata. Hrizoeriol daje karakteristični [M-H-15]⁻ fragment gubitkom metil grupe na *m/z* 284 [166,167]. Pikovi na *m/z* 285, 301, 315 i 317 odgovaraju [M-H]⁻ fragmentima kemferola, kvercetina, izoramnetina i mircetina. Flavonoli sa strukturama sličnim kvercetinu daju karakteristične fragmente koji potiču od RDA fragmentacije [164,168]. Tako su ova četiri jedinjenja identifikovana pomoću karakterističnih MS/MS pikova na *m/z* 285, 151, 300 i 179 za kemferol, kvercetin, izoramnetin i mircetin. Izoramnetin je identifikovan po fragmentu [M-H-15]⁻ koji nastaje usled gubitka metil grupe. Mircetin daje pikove na *m/z* 300 i 179, od koji onaj na *m/z* 300 potiče od [M-H₂O]⁻ fragmenta [169]. Genistein daje karakterističan [M-H]⁻ fragment na *m/z* 269 i MS/MS pik na *m/z* 133 koji potiče od [M-C₈H₇O-H₂O]⁻ fragmenta koji nastaje disocijacijom hromen-4-on motiva iz molekula. Pored [M-H]⁻ fragmenta na *m/z* 271, daje i karakteristični fragment koji se javlja na *m/z* 151 nakon RDA fragmentacije. Ova fragmentacija je praćena 1,3-cepanjem i odvija se u C prstenu molekula (slika 36), kao i u slučaju kvercetina [164]. Pik na *m/z* 289 predstavlja [M-H]⁻ fragment katehina, dok MS/MS pik na *m/z* 245 potiče od fragmentacije -CH₂-CHOH- motiva pri čemu nastaje jonski [M-H-44]⁻ fragment [170].

Kada su glikozidi u pitanju, pik na *m/z* 447 odgovara kemferol-3-*O*-glukozidu, luteolin-7-*O*-glukozidu i kvercetin-3-*O*-ramnozidu (kvercitrinu), dok pik na *m/z* 609 odgovara kvercetin-3-*O*-rutinozidu (rutinu). Rutin je identifikovan pomoću karakteristične fragmentacije rutinozidnog motiva ([M-H-308]⁻ fragment), pri čemu se dobija jonski fragment na *m/z* 300. Fragment [M-H-162]⁻ na *m/z* 285 je karakterističan za luteolin-7-*O*-glukozid i dobija se nakon odvajanja glukoze.

Ovo isto važi i za kvercitrin iz kojeg se odvaja ramnozid i nastaje kvercetin, a dobija se jonski [M-H-147]⁻ fragment na *m/z* 300 [166]. Kemferol-3-*O*-glukozid je identifikovan po karakterističnom piku na *m/z* 284 koji se dobija nakon disocijacije glukoze.

Kvantitativni podaci HPLC analize ekstrakata koprive dati su u tabeli 13. Najveći broj jedinjenja je kvantifikovan, a ubedljivo najveći prinos ostvaren u SE ekstraktu, dok je najmanji broj jedinjenja kvantifikovan u MAC ekstraktu, gde je i ukupni sadržaj bio najmanji.

Tabela 13. Polifenolni profil ekstrakata koprive

Jedinjenje	Sadržaj (mg/L)			
	SE	MAC	UAE	MAE
Protokatehinska kiselina	3,413	ND*	4,647	ND
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	3,341	ND	1,088	1,422
Kafena kiselina	31,650	0,734	20,982	53,782
Vanilinska kiselina	2,183	2,088	1,093	1,424
Eskulin	3,499	0,150	1,933	3,567
5- <i>O</i> -kafeoilhininska kiselina	152,381	0,291	31,076	70,986
<i>p</i> -Kumarna kiselina	3,150	5,742	4,641	10,002
Ferulna kiselina	2,861	ND	1,807	6,607
<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina	1,493	1,546	0,296	0,906
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	11,701	0,012	0,052	0,142
Rutin	43,264	0,040	1,025	2,573
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	0,056	ND	ND	0,026
Kvercetin	4,320	ND	ND	ND
Luteolin	0,100	ND	ND	ND
Naringin	7,383	ND	2,230	3,682
Kemferol	0,395	ND	ND	ND
Apigenin	0,063	ND	ND	ND
Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid	7,646	ND	0,133	0,170
Taksifolin	0,118	0,449	0,252	0,608
Izoramnetin-3- <i>O</i> -glukozid	16,535	ND	0,148	0,085
Daidzein	ND	0,040	0,026	0,075
Eriodiktiol	0,118	ND	ND	ND
Hrizoeriol	0,112	ND	ND	ND
Hrizin	0,042	ND	ND	ND
Acacetin	0,022	ND	ND	ND
Genkvanin	0,029	ND	ND	ND
Galangin	0,089	ND	ND	ND
Kemferid	0,034	ND	ND	ND
Ukupan prinos	295,999	11,091	71,431	156,055

*ND-nije detektovan

Dominantno jedinjenje u SE, UAE i MAE ekstraktima je 5-*O*-kafeoilhininska kiselina, dok u MAC ekstraktu dominira *p*-kumarna kiselina. Među kvantifikovanim flavonoidima dominira rutin, čiji je sadržaj naročito visok u SE ekstraktu. Prisustvo i dominacija ovog flavonoida je i prethodno utvrđena [171]. Pokazalo se da kopriva ubrana na različitim lokacijama pokazuje različit sastav kada su polifenolna jedinjenja u pitanju [36]. Potvrđeno je prisustvo kafene i protokatehinske kiseline u svim uzorcima [36], dok je kafena kiselina kvantifikovana i u ovom radu. Pinelli i saradnici [172] su kvantifikovali 2-*O*-kafeoil-estar jabučne kiseline, rutin i hlorogensku kiselinu u značajnim količinama. Otles i Yalcin [72] su ispitali sadržaj polifenolnih jedinjenja u uzorcima koprive ubranim na različitim lokacijama. Nađeno je da su rutin, naringenin, kemferol, *p*-kumarna kiselina i ferulna kiselina zastupljeni u svim uzorcima, dok katehin i galna kiselina nisu nađeni. Kafena, hlorogenska, siringinska i vanilinska kiselina su kvantifikovane u različitim sadržajima u ovim uzorcima. Ovakvi rezultati potvrđuju veoma veliki uticaj lokacije na sadržaj polifenolnih jedinjenja u koprivi.

Iz rezultata prikazanih u tabelama 11 i 13 može se zapaziti neslaganje između podataka za TPC i ukupnih sadržaja polifenolnih jedinjenja dobijenih HPLC metodom. Ovo se može objasniti slabom selektivnošću spektrofotometrijskih testova. F-C test koji se koristi za određivanje TPC daje pozitivnu reakciju i na ugljene hidrate, amino kiseline, nukleotide, tiole, nezasićene masne kiseline, proteine, vitamine, amine, aldehide i ketone [173–175]. Pored navedenih klasa jedinjenja utvrđeno je da i hidrazini, hidroksilamini, guanidini, tercijarni amini, aromatični amini, pirol i indoli takođe reaguju sa F-C reagensom [176]. Otuda potiču neslaganja u rezultatima koji se javljaju prilikom poređenja F-C testa i HPLC analize.

Prisustvo ovih jedinjenja je izuzetno značajno zbog širokog spektra njihovog dejstva. Istraživanja su pokazala da ova klasa jedinjenja pokazuje antioksidativno, antimikrobno, antiviralno, anti-inflamatorno, anti-spazmolitičko, antitumorno, antiproliferativno i mnoga druga dejstva [136,177–179]. Antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost ova jedinjenja pokazuju zahvaljujući svojim strukturama, odnosno prisustvu delokalizovanih elektrona, kao i hidroksilnih grupa u sistemu [179–183]. Kafena kiselina deluje antikancerogeno putem inhibicije aktivnosti transkripcionog faktora STAT3 (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription) [184]. Galna kiselina indukuje apoptozu putem generisanja influksa ROS i aktivacijom kalmodulina [136]. Kvercetin utiče na neke indukcione puteve kao što su MEK/ERK i Nrf2/keap1 koji su povezani sa procesom

inflamacije i karcinogeneze [185]. On takođe modulira NF-kB p65 nuklearnu translokaciju, snižava ekspresiju mRNK inducibilnih enzima kao što su COX-2 i iNOS [136].

Pored polifenolnog sastava, urađena je analiza minerala u ekstraktima čiji su rezultati dati u tabeli 14. Elementi i minerali su podeljeni u tri grupe, kao i u slučaju analize koja je rađena direktno iz lista (tabela 9). Uopšteno, sadržaji makro i mikroelemenata su značajno manji nego u slučaju onih detektovanih u listu. Izuzeci su kalaj i nikel čiji su sadržaji veći u ekstraktima.

Tabela 14. Mineralni sastav ekstrakata lista koprive

Element	Uzorak			
	SE	MAC	UAE	MAE
Sadržaj (mg/L)				
<i>Makroelementi</i>				
Na	60,84 ± 1,59	90,37 ± 0,47	56,60 ± 0,09	46,96 ± 0,72
K	285,51 ± 2,06	405,19 ± 0,64	880,39 ± 3,39	965,60 ± 7,70
Mg	12,33 ± 1,19	104,43 ± 0,19	162,08 ± 0,52	191,99 ± 2,60
Ca	29,64 ± 1,37	464,24 ± 0,24	288,88 ± 0,84	428,23 ± 1,93
<i>Mikroelementi</i>				
Fe	3,53 ± 0,06	4,19 ± 0,93	8,24 ± 0,16	6,87 ± 0,02
Cu	3,16 ± 0,13	3,36 ± 0,99	2,08 ± 0,01	1,67 ± 0,00
Mn	0,11 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,35 ± 0,00	0,55 ± 0,00
Zn	0,61 ± 0,09	1,15 ± 0,03	2,05 ± 0,04	1,61 ± 0,04
Cr	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Sn	1,37 ± 0,83	1,67 ± 0,05	0,53 ± 0,02	0,58 ± 0,01
Ni	ND*	ND	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02
<i>Toksični elementi</i>				
Pb	1,36 ± 0,59	0,92 ± 0,07	1,13 ± 0,06	0,30 ± 0,05
Cd	0,01 ± 0,00	ND	0,01 ± 0,00	ND
Hg	ND	ND	ND	ND
As	3,64 ± 0,82	ND	ND	ND

*ND-nije detektovan

Kada su u pitanju toksični elementi, sadržaji variraju. Sadržaj olova se povećao u sva četiri ekstrakta. Sadržaj arsena je bio znatno veći u SE ekstraktu, ali nije detektovan ni u jednom drugom. Kadmijum ima manji sadržaj nego u listu, dok živa nije detektovana ni u jednom uzorku. Veliki sadržaj arsena u SE ekstraktu se može objasniti interferencijom alkohola koji je služio kao rastvarač. Alkohol u ICP povećava signal za arsen dajući veći rezultat.

Iako su sadržaji makro i mikroelemenata niži, njihovo prisustvo u ekstraktu je svakako značajno. Prema preporuci Instituta za medicinu američke nacionalne akademije [186] unos makroelemenata

se kreće u sledećim intervalima: 1-1,3 g/d (d-unos na dnevnom nivou) za kalcijum, 240-410 mg/d za magnezijum, 4,5-4,7 g/d za kalijum i 1,2-1,5 g/d za natrijum. Preporučene količine mikroelemenata kao što su bakar, gvožđe, nikel i cink su sledeće: 5-10 mg/d, 40-45 mg/d, 0,6-1 mg/d i 23-40 mg/d. Ove količine zavise od pola i uzrasta, odnosno starosti osobe. Iz ovoga se može videti da i manje količine lista mogu da podmire dobar deo dnevnih potreba za neophodnim mineralima, dok je to u slučaju ekstrakata teže zbog manjeg sadržaja. Međutim, ekstrakti se mogu koristiti kao dodatni izvori minerala koje je neophodno uneti tokom dana.

Sadržaj hidrosolubilnih vitamina u ekstraktima koprive dat je u tabeli 15. Rezultati pokazuju da su vitamini C i B₁ detektovani u svim ekstraktima, osim u SE. Sadržaj vitamina C bio je najveći u UAE, dok je B₁ bio najzastupljeniji u MAE ekstraktu. Vitamin B₂ je nađen u svim ekstraktima, dok vitamin B₆ nije dokazan samo u MAC ekstraktu. Vitamin B₃ nije nađen ni u SE i MAC, dok je najveći sadržaj bio u MAC ekstraktu.

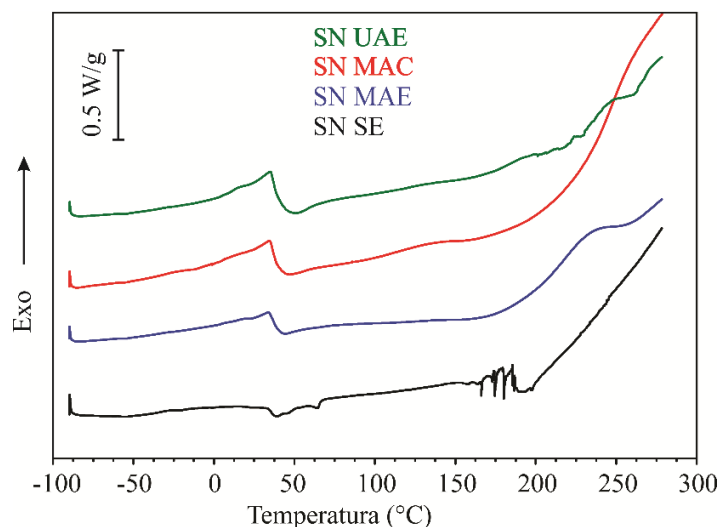
Tabela 15. Sadržaj vitamina C i B serije u ekstraktima lista koprive

Ekstrakciona tehnika	Sadržaj vitamina (mg/L)				
	C	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆
SE	-	-	89,63	-	1,22
MAC	6,69	4,52	16,38	-	-
UAE	74,89	3,46	40,27	28,37	104,15
MAE	60,17	6,70	51,16	197,35	7,14

Unos ovih vitamina takođe je definisan, kao i u slučaju minerala [186]. Preporučeni unos vitamina C je 45-90 mg/d, vitamina B₁ 0,9-1,2 mg/d, vitamina B₂ 0,9-1,3 mg/d, vitamina B₃ 12,0-16,0 mg/d i vitamina B₆ 1,0-1,7 mg/d. Iz prikazanih rezultata se vidi da je sadržaj vitamina u ekstraktima dovoljan da se zadovolji dnevna potreba organizma za ovim jedinjenjima. Samim tim, kopriva se može smatrati veoma značajnim izvorom vitamina C i B grupe.

Prethodna istraživanja dokazala su prisustvo vitamina C i vitamina B grupe u listu koprive [68,187]. Tako, vitamin C je kvantifikovan 20-60 mg/100 g SN [68], odnosno 238-333 mg/100 g SN [187]. Sadržaj vitamina B i K bio je 0,16-0,64 mg/100 g SN [68], dok je sadržaj pojedinačnih vitamina B grupe bio 20, 230, 620 i 70 µg/100 g SN za B₁, B₂, B₃ i B₆ vitamine [187]. Sadržaj vitamina varira isto kao i sadržaj polifenolnih jedinjenja. I u ovom slučaju, sadržaj ovih molekula zavisi od momenta branja biljke, geografskog porekla, kao i drugih faktora i činilaca koji utiču na rast i razvoj same biljke.

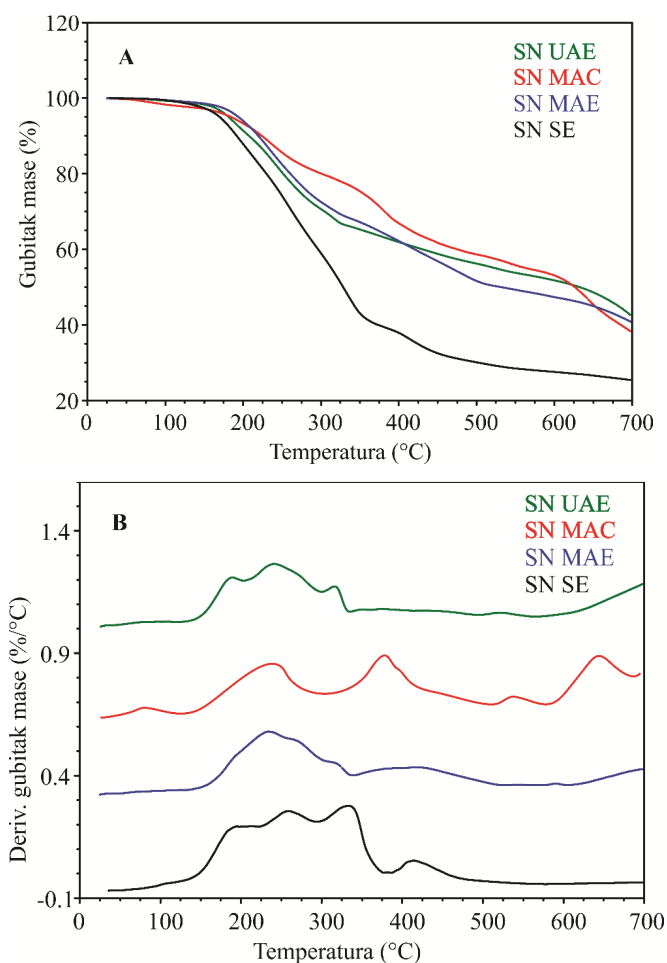
Na slici 42 prikazane su *DSC* krive dobijene zagrevanjem osušenih ekstrakata koprive u temperaturnom opsegu od -90 do 300°C , brzinom grejanja od $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Na osnovu dobijenih krivih vidi se da su termalne osobine vodenih ekstrakata koprive međusobno veoma slične, dok se alkoholni ekstrakt malo razlikuje od njih. Kod svih ekstrakata na niskim temperaturama (od -90 do 0°C) nisu detektovani nikakvi termalni efekti. Kod svih vodenih ekstrakata na oko 37°C dolazi do promene njihovog toplotnog kapaciteta, što se manifestuje spuštanjem bazne linije, a to je verovatno posledica promene unutrašnje strukture uzoraka. Kod alkoholnog ekstrakta je u opsegu od 33 do 67°C detektovan širok endotermni pik sa dva uočljiva maksimuma na oko 40 i 64°C , koji je posledica odvijanja dva ili više termalna procesa u uzorku na međusobno bliskim temperaturama, pa se njihovi toplotni efekti preklapaju i daju složen pik. Na temperaturama preko 150°C kod svih uzoraka javlja se egzotermni proces, koji je posledica termalne razgradnje ispitivanih uzoraka, pa se na osnovu *DSC* krivih može zaključiti da su svi ekstrakti termalno stabilni do 150°C , a preko ove temperature dolazi do njihove razgradnje.



Slika 42. *DSC* krive osušenih ekstrakata koprive

Za ispitivanje termalne stabilnosti osušenih ekstrakata koprive u temperaturnom intervalu od 25 do 700°C korišćena je termogravimetrijska analiza. Na slici 43 prikazane su dobijene *TG* krive (A) i njihove diferencijalne *DTG* krive (B) pri brzini grejanja od $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ u atmosferi azota. Može se zaključiti da su dobijene *TG* i *DTG* krive uzoraka UAE i MAE međusobno slične, dok se za druga dva uzorka razlikuju. Na osnovu *DTG* krivih može se uočiti da svi vodeni ekstrakti gube

masu u četiri stupnja (četiri pika na *DTG* krivama), dok alkoholni ekstrakt gubi masu u tri stupnja (tri pika na *DTG* krivi). Prvi stupanj gubitka mase pripisuje se vlažnosti uzorka, drugi stupanj termalnoj degradaciji organskih i biološki vrednih jedinjenja prisutnih u uzorcima, a treći i četvrti termalnoj degradaciji supstanci koje nastaju polimerizacijom proizvoda nastalih razlaganjem u prethodnoj fazi. Pomoću *DTG* krivih određene su temperature početka (T_s) i završetka (T_{end}) svakog stepena gubitka mase (u tačkama minimuma pre i posle odgovarajućeg pika na *DTG* krivi), a pomoću *TG* krivih procentualni gubitak mase. Rezultati su dati u tabeli 16.



Slika 43. TG (A) i DTG (B) krive termalne razgradnje osušenih ekstrakata koprive

Sa nutritivne tačke gledišta najinteresantniji je drugi stupanj gubitka mase, jer u njemu dolazi do termalne degradacije biološki vrednih jedinjenja u uzorcima. On se odvija u jednom stupnju samo kod SN MAC uzorka, dok je kod ostalih uzoraka složeniji, što se vidi iz *DTG* krivih. Kod SN

MAC uzorka pik koji odgovara termalnoj degradaciji biološki vrednih jedinjenja (gubitak 2) sadrži samo jedan maksimum, dok kod ostalih uzoraka ovaj pik sadrži po tri maksimuma ($T_{\max 1}$, $T_{\max 2}$ i $T_{\max 3}$ u tabeli 16). Razlog tome je što su svi uzorci kompleksne smeše, pa pri termalnoj degradaciji neka jedinjenja degradiraju na nižim temperaturama, a neka na višim, a kako su te temperature međusobno bliske dolazi do preklapanja efekata što rezultira u složenim *DTG* pikovima. Kod SN MAC se javlja samo jedan maksimum na piku verovatno zato što pri degradaciji dominira samo jedno jedinjenje ili više jedinjenja sa veoma bliskim temperaturama degradacije.

Tabela 16. Rezultati termogravimetrijske analize osušenih ekstrakata koprive

Parametar	SN UAE	SN MAC	SN MAE	SN SE
Gubitak 1 (%)	1,08	2,31	0,86	1,28
T_{s1} (°C)	25,78	24,97	25,10	29,31
T_{end1} (°C)	123,29	127,84	122,85	124,39
Gubitak 2 (%)	32,70	18,26	31,08	59,19
T_{s2} (°C)	123,29	127,84	122,85	124,39
T_{end2} (°C)	334,65	308,48	339,66	380,26
$T_{\max 1}$ (°C)	189,23	234,91	233,94	194,87
$T_{\max 2}$ (°C)	241,61	-	266,88	259,22
$T_{\max 3}$ (°C)	316,58	-	318,21	333,53
T_{on} (°C)	143,86	141,32	155,18	147,68
Gubitak 3 (%)	13,00	21,06	19,23	14,08
T_{s3} (°C)	334,65	308,48	339,66	380,26
T_{end3} (°C)	564,97	507,34	563,36	697,70
Gubitak 4 (%)	10,61	20,06	7,94	-
T_{s4} (°C)	564,97	507,34	563,36	-
T_{end4} (°C)	697,76	697,79	697,78	-
Ukupni gubitak (%)	57,40	61,69	59,12	74,55
T_{res} (°C)	697,76	697,79	697,78	697,70
Ostatak (%)	42,61	38,29	40,87	25,44

Pomoću *DTG* krivih određene su i T_{on} (kao presek ekstrapolisane bazne linije i tangente na nagib pika koji nastaje kao rezultat termalnog razlaganja), koje se uzimaju kao temperature početka termalne degradacije i služe kao merilo termalne stabilnosti uzoraka. Iz tabele 15 se vidi da je SN MAE termalno najstabilniji, dok SN MAC ima najnižu T_{on} vrednost, pa je samim tim najmanje stabilan. Dobijene T_{on} vrednosti su u skladu sa rezultatima dobijenim na osnovu *DSC* krivih, iz kojih se videlo da degradacija svih uzoraka počinje na oko 150°C. U tabeli 15 su, takođe, prikazani

i procentualni ostaci uzoraka na oko 700°C (T_{res}), iz koje se vidi da vodeni ekstrakti imaju sličan ostatak od oko 40%, dok alkoholni ekstrakt ima dosta niži ostatak od oko 25% početne mase.

4.2.3 Biološka aktivnost ekstrakata

Pored hemijskog sastava, ekstrakti su dalje testirani kako bi se utvrdila njihova biološka aktivnost. U tu svrhu rađeni su *in vitro* antioksidativni, citotoksični i antimikrobni testovi. Rezultati antioksidativnih i citotoksičnih testova dati su u tabeli 17 [161]. Manja vrednost IC_{50} i EC_{50} ukazuju na jaču aktivnost ispitanih ekstrakata.

Rađena su tri antioksidativna testa: DPPH test (IC_{50}), redukciona moć (EC_{50}) i polarografska metoda (HPMC). Sva tri testa pokazuju isti trend, odnosno aktivnost opada u sledećem nizu MAE > UAE > SE > MAC. Ovo isto važi i za citotoksičnu aktivnost gde aktivnost opada na isti način. Citotoksični test ukazuje na to da su svi ispitivani ekstrakti najaktivniji prema RD ćelijama. Sa druge strane, najmanja aktivnost se pokazala prema Hep2c ćelijama. Takođe, očigledna je sličnost u aktivnostima SE i MAC ekstrakata, kao i UAE i MAE ekstrakata prema sve tri ćelijske linije. Kada se uzme u obzir da je kriterijum za citotoksičnu aktivnost ekstrakata biljaka < 30 µg/mL [188], taj uslov ispunjavaju MAE i UAE ekstrakti prema sve tri ćelijske linije, kao i SE prema RD ćelijskoj liniji [161].

Tabela 17. Antioksidativna i citotoksična aktivnost ekstrakata koprive

Parametar	Ekstrakt			
	SE	MAC	UAE	MAE
<i>Antioksidativna aktivnost</i>				
IC_{50} (µg/mL)	38,07 ± 0,02	46,37 ± 0,01	29,77 ± 0,00	21,47 ± 0,00
EC_{50} (µg/mL)	52,26 ± 0,05	60,59 ± 0,00	43,93 ± 0,00	35,60 ± 0,00
HPMC (%/mL)	-	-	107,50 ± 9,50	137,80 ± 5,70
<i>Citotoksična aktivnost</i>				
Hep2c (µg/mL)	40,76 ± 0,52	42,76 ± 0,35	19,06 ± 0,17	17,25 ± 0,15
RD (µg/mL)	25,88 ± 0,20	31,52 ± 0,57	12,29 ± 0,74	10,44 ± 0,83
L2OB (µg/mL)	38,23 ± 0,92	40,55 ± 0,25	15,18 ± 0,67	12,30 ± 0,78

Kako bi se ispitala veza između ovih testova, odnosno dobijenih rezultata, urađena je korelaciona analiza. Rezultati su dati u vidu Pearson-ovih koeficijenata, i prikazani su u tabeli 18. Analizirani

su prinos ekstrakcije (Y), sadržaji ukupnih fenola i flavonoida (TPC i TFC), aktivnost prema DPPH, redukciona moć (RP), kao i aktivnost prema tri ćelijske linije (Hep2c, RD i L2OB).

Vrednosti korelacionih koeficijenata se kreću u opsegu 0-1 gde vrednost 1 označava maksimalnu korelaciju, dok 0 ukazuje da korelacija ne postoji. Faktori u opsegu 0,5-0,7 ukazuju na slabu korelaciju, 0,7-0,9 umerenu korelaciju, dok se vrednosti > 0,9 smatraju visokom korelacijom. Test je rađen pri statističkoj značajnosti od $p < 0,05$.

Tabela 18. Korelacioni koeficijenti za Y, TPC, TFC, DPPH, RP, Hep2c, RD i L2OB

Test	Y	TPC	TFC	DPPH	RP	Hep2c	RD	L2OB
Y	1							
TPC	0,96	1						
TFC	0,89	0,98	1					
DPPH	-0,88	-0,94	-0,94	1				
RP	-0,88	-0,94	-0,94	1,00	1			
Hep2c	-0,64	-0,77	-0,83	0,93	0,93	1		
RD	-0,73	-0,82	-0,84	0,96	0,96	0,99	1	
L2OB	-0,66	-0,79	-0,84	0,93	0,93	1,00	0,99	1

Iz tabele se može zapaziti visok stepen korelacije između Y, TPC i TFC. Ovo važi i za TPC, TFC, DPPH i RP. Negativni predznak ukazuje na to da sa porastom TPC, odnosno TFC opadaju vrednosti DPPH i RP, što znači da aktivnost raste. Visoki stepen korelacije se još javlja i između DPPH, RP, Hep2c, RD i L2OB. Sa druge strane, korelacioni koeficijenti između Y i testova biološke aktivnosti manji su od 0,9, a u nekim slučajevima i manji od 0,7. Ovo ukazuje na slabiju korelaciju prinosa ekstrakcije sa rezultatima ovih testova. Sve u svemu, na osnovu korelacione analize može se zaključiti da su fenolna jedinjenja delom odgovorna za aktivnost ispitivanih ekstrakata.

Iako se polifenolna jedinjenja generalno smatraju nosiocima biološke aktivnosti, rezultati prikazani u tabelama 11, 13 i 17 pokazuju izvesna neslaganja sa tim stavom. Rezultati u tabeli 17 ukazuju da iako SE ekstrakt ima najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja (videti tabelu 13), ima nižu aktivnost od UAE i MAE ekstrakata. Pored navedenog razloga, odnosno neselektivnosti ovog testa, istraživanja su pokazala da tokom mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcije pri povišenim temperaturama dolazi do odvijanja procesa kao što su Maillard-ove reakcije i reakcije karamelizacije pri čemu nastaju nova jedinjenja [189,190]. Ova jedinjenja, koja poseduju antioksidativni potencijal, reaguju sa F-C reagensom, kao i sa ostalim reagensima koji se

upotrebljavaju u *in vitro* antioksidativnim testovima, čime se dobijaju značajno veći rezultati u odnosu na ekstrakte koji se dobijaju klasičnim ekstrakcionim metodama.

Tabela 19. Antimikrobna aktivnost ekstrakata koprive

Mikrobni sojevi	Ekstrakcione tehnike / MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	SE	MAC	UAE	MAE	A*	N**
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	312,50	78,125	78,12	39,10	0,97	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	156,25	39,10	156,40	312,50	0,97	/
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	312,50	19,53	156,25	156,25	0,49	/
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	78,12	156,25	156,25	312,50	0,49	/
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14153)	19,53	39,10	312,50	78,12	0,49	/
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	39,10	312,50	156,40	625,00	0,24	/
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	78,12	19,53	312,50	156,25	/	1,95
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	39,10	78,125	156,40	156,40	/	0,97

*A-Amracin, **N-Nistatin.

Pored antioksidativne i citotoksične aktivnosti ispitana je i antimikrobna aktivnost ekstrakata. Rezultati ovog ispitivanja dati su u tabeli 19 [161]. Ispitivanja su urađena na 6 bakterijskih sojeva i dva gljivična soja. Najjača aktivnost se zapaža kod SE prema *Proteus mirabilis*, dok se najslabija aktivnost javlja u slučaju MAE prema *Bacillus subtilis*. Pored ove aktivnosti, slabije su se pokazali i SE prema *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, MAC prema *Bacillus subtilis*, UAE prema *Proteus mirabilis* i *Candida albicans*, MAE prema *Klebsiella pneumoniae*. Antimikrobna aktivnost koprive je i ranije ispitivana i potvrđena [81,96,191–193]. Međutim, veza između antimikrobne aktivnosti i hemijskog sastava lista koprive još nije utvrđena, pa su samim tim potrebna dalja istraživanja na tom polju. Mori i saradnici [181] su utvrdili da slobodna hidroksilna grupa na fenolnom prstenu u strukturi flavonoida igra glavnu ulogu u antimikrobnoj aktivnosti ovih jedinjenja. Međutim, postoje indicacije da polifenolna jedinjenja nisu jedina odgovorna za ovu aktivnost, već da i drugi sekundarni metaboliti daju svoj doprinos zajedno sa sinergijskim efektom [179].

4.3 Superkritični ekstrakti koprive

4.3.1 Prinos i kinetika ekstrakcije

Superkritični ekstrakti su dobijeni ekstrakcijama koje su vršene pri tri različita pritiska (100, 200 i 300 bar) i dve različite temperature (40°C i 60°C), pri konstantnom protoku CO₂ od 0,2 kg/h (tabela 20).

Tabela 20. Uslovi superkritične ekstrakcije lista koprive

Parametar	Ekstrakti					
	1	2	3	4	5	6
Pritisak (bar)	100	100	200	200	300	300
Temperatura (°C)	40	60	40	60	40	60
Gustina (g/cm ³)	0,629	0,290	0,840	0,724	0,910	0,830

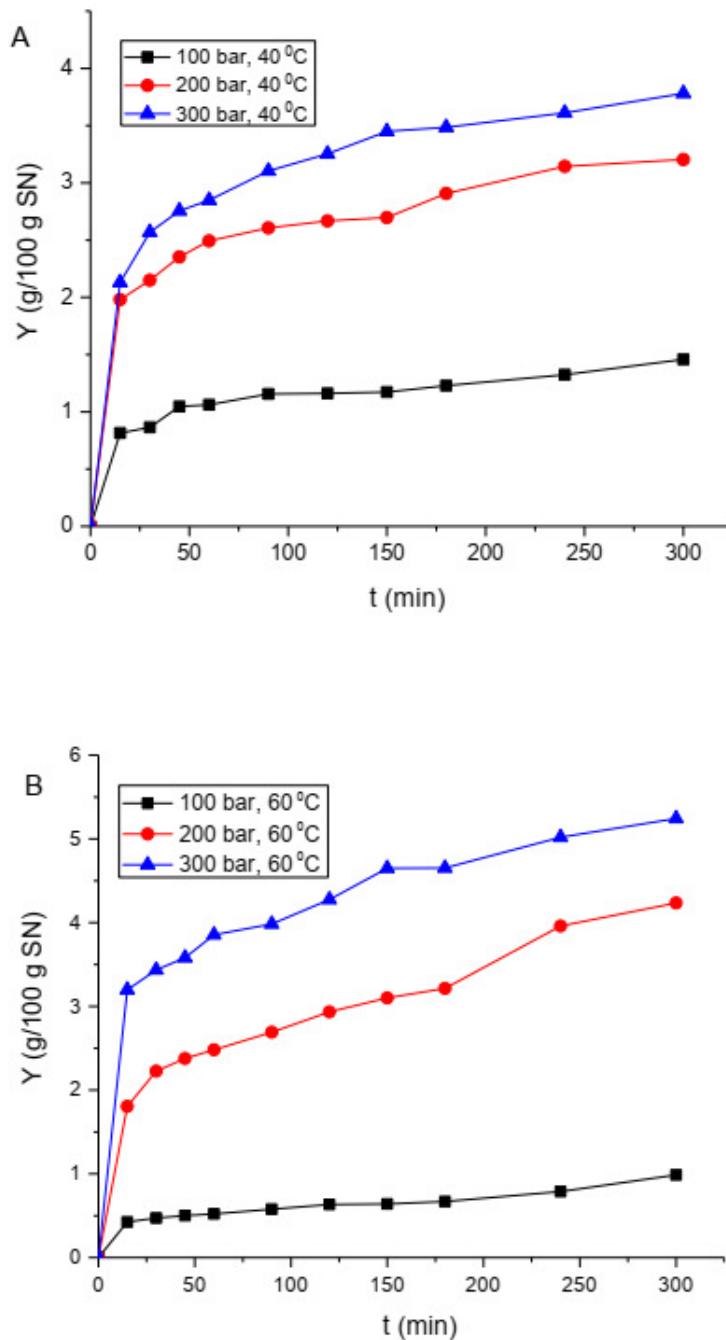
Merenja prinosa ekstrakcije su rađena nakon 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 i 300 minuta, a dobijeni rezultati su dati u tabeli 21, dok su kinetičke krive prikazane na slici 44.

Tabela 21. Kinetički podaci za superkritičnu ekstrakciju lista koprive

Vreme (min)	Uzorak/prinos ekstrakcije (g/100 g SN)					
	1*	2	3	4	5	6
15	0,81448	0,42512	1,98040	1,80396	2,13040	3,19648
30	0,86514	0,47216	2,14920	2,22628	2,56800	3,43538
45	1,04630	0,50034	2,35324	2,37652	2,75530	3,58072
60	1,06240	0,52064	2,49312	2,47996	2,84832	3,85328
90	1,15568	0,57680	2,60616	2,69176	3,10490	3,98368
120	1,16068	0,63336	2,66764	2,93456	3,25386	4,27550
150	1,17268	0,64010	2,69720	3,09940	3,44988	4,64814
180	1,22824	0,66959	2,90648	3,21444	3,48528	4,65158
240	1,32436	0,78740	3,14328	3,95860	3,61174	5,01812
300	1,45860	0,98660	3,20380	4,23500	3,78120	5,24280

*Za uslove ekstrakcije 1-6 videti tabelu 20.

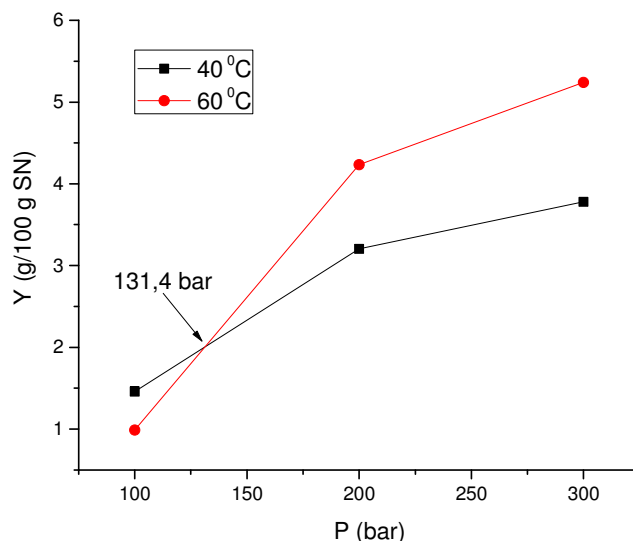
Ono što se odmah može zapaziti jeste da prinosi rastu sa porastom pritiska, dok je uticaj temperature dvojak. Tako, na pritisku od 100 bar prinos pada sa porastom temperature, dok na 200 i 300 bar prinos ekstrakcije raste sa temperaturom.



Slika 44. Kinetičke krive superkritične ekstrakcije lista koprive

Povećanje prinosa sa porastom pritiska se može jednostavno objasniti. Pritisak utiče na gustinu superkritičnog fluida, odnosno sa porastom pritiska raste i gustina, a samim tim i njegova solvaciona moć. Sa druge strane, uticaj temperature nije toliko jednostavan kao što je to u slučaju pritiska. Temperatura, za razliku od pritiska, negativno utiče na gustinu superkritičnog fluida,

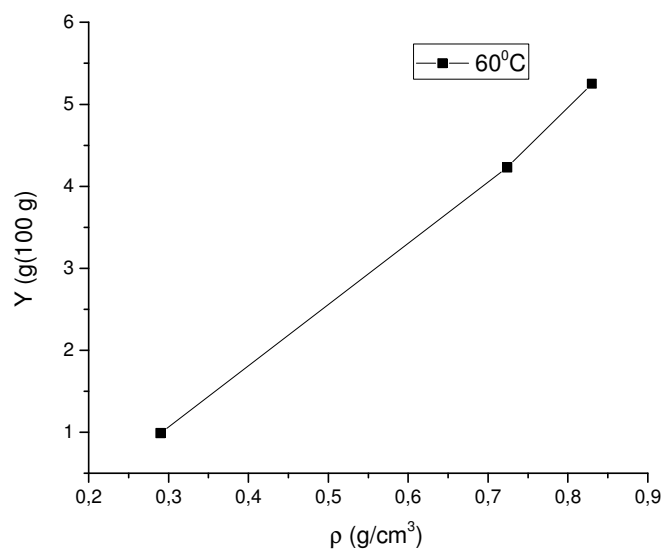
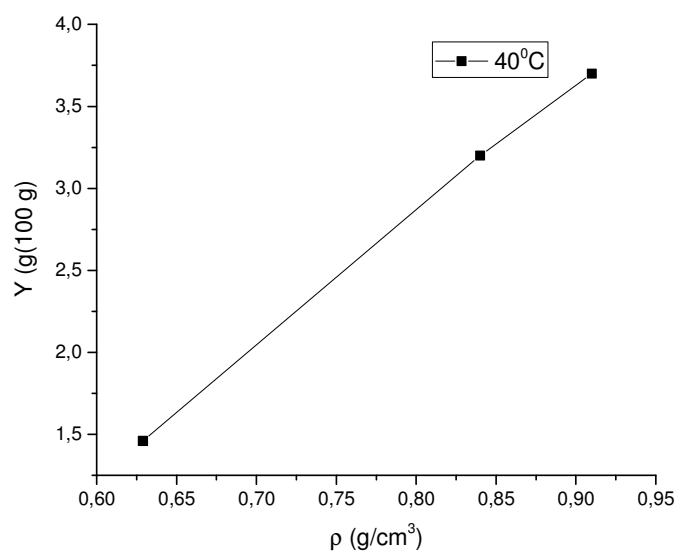
odnosno sa porastom temperature gustina se smanjuje. Pored ovoga, ona utiče i na napon pare jedinjenja koja se rastvaraju u fluidu, pri čemu sa porastom temperature raste napon pare, a samim tim i rastvorljivost jedinjenja [194–196].



Slika 45. Uticaj temperature na prinos procesa ekstrakcije pri različitim pritiscima

Rezultati ukazuju na to da u početku dominira uticaj temperature na gustinu superkritičnog CO₂, gde ona negativno utiče na rastvorljivost (slika 45). U određenom momentu dolazi do promene, odnosno porast temperature počinje pozitivno da utiče na prinos ekstrakcije. Nakon te tačke uticaj napona pare komponenti koje se ekstrahuju počinje da dominira procesom. Tačka (pritisak) pri kojoj dolazi do promene dominacije efekata naziva se prelazna tačka (engl. crossover point) ili prelazni pritisak (engl. crossover pressure) [196]. U ovom slučaju taj pritisak iznosi 131,4 bar (slika 45).

Ako se posmatra uticaj gustina na prinos, dobijaju se dijagrami prikazani na slici 46. Poznato je da gustina CO₂ raste sa porastom pritiska pri konstantnoj temperaturi, odnosno opada sa porastom temperature na konstantnom pritisku (tabela 20). Sa slike 46 može se zapaziti da prinosi rastu u oba slučaja (na 40 i 60 °C) sa porastom gustine od 100-300 bar. Ovakav trend je očekivan s obzirom na to da pritisak utiče na gustinu koja dalje utiče na solvacionu moć superkritičnog fluida [10,194-196].



Slika 46. Uticaj gustine na prinos SFE

4.3.2 Hemijski sastav superkritičnih ekstrakata

Nakon ispitivanja kinetike ekstrakcije i uticaja osnovnih parametara, urađena je hemijska analiza dobijenih ekstrakata, tačnije određen je sadržaj hlorofila, karotenoida i masnih kiselina. Sadržaji

hlorofila A, hlorofila B, ukupnog hlorofila i ukupnih karotenoida određen je spektrofotometrijskom metodom, a rezultati su dati u tabeli 22.

Tabela 22. Sadržaj hlorofila i karotenoida u superkritičnim ekstraktima koprive

Uzorak*	HL-A (mg/100 g E)	HL-B (mg/100 g E)	HL (mg/100 g E)	Cx (mg/100 g E)
1	16,94	16,06	33,00	166,88
2	16,93	11,89	28,82	169,93
3	3007,84	585,73	3593,57	556,40
4	3396,41	792,09	4188,50	722,62
5	4221,36	1046,66	5268,02	465,19
6	5696,65	1668,46	7365,11	587,38

Oznake: HL-A: hlorofil A; HL-B: hlorofil B; HL: ukupni hlorofil; Cx: ukupni karotenoidi

*Za uslove ekstrakcije 1-6 videti tabelu 20.

Iz prikazanih rezultata jasno se vidi da prinos hlorofila A, hlorofila B i ukupnog hlorofila raste sa porastom pritiska i temperature. Izuzetak su sadržaji hlorofila u uzorku 2 gde su njihovi sadržaji manji od onih u uzorku 1. Ovde se može zapaziti negativni uticaj temperature na sadržaj ovih pigmenata, tačnije njen negativni uticaj na gustinu CO₂ koji je dalje uticao na sadržaj ovih pigmenata, odnosno na njihovu ekstrakciju iz ispitivanog uzorka koprive. Ovo se takođe opaža i u slučaju karotenoida u uzorcima 5 i 6. Nakon dostizanja maksimalnog prinosa od 722,62 mg/100 g E (uzorak 4), sadržaj ukupnih karotenoida opada u uzorku 5 (465,19 mg/100 g E), pa opet raste u uzorku 6 (587,38 mg/100 g E), pri čemu je sadržaj karotenoida u uzorku 6 manji od onog u uzorku 4. Za razliku od hlorofila, ovde se može zapaziti negativan uticaj pritiska na prinos ovih pigmenata, pri čemu su u oba slučaja (na obe temperature) prinosi karotenoida na 300 bar manji od onih na 200 bar. Očigledno je da pritisak od 300 bar i uslovi koji vladaju u superkritičnom CO₂ pri ovom pritisku ne odgovaraju karotenoidima, koji su generalno manji molekuli u odnosu na hlorofile čiji prinos značajno raste sa porastom pritiska.

Sadržaj masnih kiselina određen je primenom GC-FID analize (tabela 23). I ovde je izvršena podela masnih kiselina, kao i u prethodnom slučaju, na zasićene (SFA) i nezasićene (UFA) kiseline. Nezasićene su dalje podeljene na mononezasićene (MUFA) i polinezasićene (PUFA) kiseline. Prinos ovih jedinjenja prikazan je kao miligram po gramu ekstrakta (mg/g E) [197].

Tabela 23. Sadržaj masnih kiselina u superkritičnim ekstraktima koprive

Masna kiselina*	Uzorak/sadržaj (mg/g E)					
	1	2	3	4	5	6
C6:0	0,376	0,213	0,219	/	0,208	/
C10:0	0,190	/	/	/	/	/
C11:0	0,128	/	/	/	/	/
C12:0	0,209	0,216	0,178	0,158	0,175	0,228
C13:0	0,211	0,181	0,178	/	0,143	/
C14:0	3,859	1,697	2,150	1,573	1,968	1,523
C14:1	1,155	0,860	0,659	0,414	0,611	0,483
C15:0	0,204	0,151	0,173	0,404	/	0,165
C15:1	0,185	0,142	0,612	/	0,376	0,338
C16:0	8,657	6,616	8,010	7,102	6,053	6,331
C16:1	1,075	0,588	0,432	0,702	0,497	0,556
C17:0	0,350	0,294	0,148	0,763	0,192	0,235
C17:1	0,553	0,239	0,329	0,250	0,161	0,171
C18:0	1,996	1,527	1,799	2,279	1,388	1,631
<i>trans</i> -C18:1	/	0,126	/	/	/	/
<i>cis</i> -C18:1	2,130	1,565	1,640	1,072	1,426	1,297
C18:2	10,900	7,746	9,047	7,347	7,216	7,240
C20:0	3,851	3,986	7,734	13,934	4,286	10,107
γ -C18:3 n-6	0,431	0,276	/	0,160	0,266	/
C20:1	0,159	0,152	/	0,184	0,174	/
α -C18:3 n-3	38,564	28,943	24,186	20,504	26,235	22,375
C21:0	0,301	/	17,809	1,483	0,578	0,755
C20:2	3,872	1,364	2,258	1,256	1,794	1,477
C22:0	1,967	1,844	5,945	12,577	3,078	10,638
C20:3 n-6	0,244	0,292	0,138	0,125	0,447	0,129
C20:3 n-3	/	0,336	/	/	/	0,719
C20:4	0,507	0,277	/	0,294	0,338	0,256
C23:0	1,634	0,767	/	0,399	0,821	0,539
C22:2	/	/	0,615	/	/	/
C24:0	1,146	0,950	3,590	8,634	2,923	5,768
C20:5	/	0,603	/	/	0,899	/
C24:1	/	/	1,263	/	/	/
C22:6	0,287	0,165	/	0,261	0,250	/
SFA	25,079	18,442	47,933	49,306	21,813	37,920
UFA	60,062	43,647	41,179	32,569	40,690	35,041
MUFA	5,257	3,672	4,935	2,622	3,245	2,845
PUFA	54,805	40,002	36,244	29,947	37,445	32,196
Ukupno	85,141	62,116	89,112	81,875	62,503	72,961
SFA:UFA odnos	0,42	0,42	1,16	1,51	0,54	1,08

*Za naziv masnih kiselina videti tabelu 7

I u ovom slučaju se mogu primetiti uticaji prethodno opisanih fenomena, odnosno uticaji pritiska i temperature na prinos jedinjenja. Najveći prinos MK se dobija na 200 bar i 40 °C (uzorak 3), dok je najmanji prinos ostvaren na 100 bar i 60°C (uzorak 2). Na obe temperature prinos raste sa porastom pritiska sa 100 na 200 bar, a zatim opada. Isti trend se zapaža i kod SFA, gde je najveći prinos dobijen pri 200 bar, i 40°C (uzorak 4), dok je najmanji dobijen za uzorak 2. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da povišeni pritisak i temperatura pogoduju izolovanju SFA. U slučaju UFA situacija je obrnuta. Najveći prinos je dobijen na 100 bar i 40°C (uzorak 1), a najmanji za uzorak 4 (200 bar, 40°C). U ovom slučaju niži pritisak i temperatura odgovaraju izolaciji ove grupe MK. Isti slučaj je i kod sadržaja MUFA i PUFA. U prilog ovom zaključku ide i odnos SFA:UFA, pri čemu je najveći dobijen za uzorak 4 (1,51), dok je najmanji u uzorcima 1 i 2 (0,42) [197].

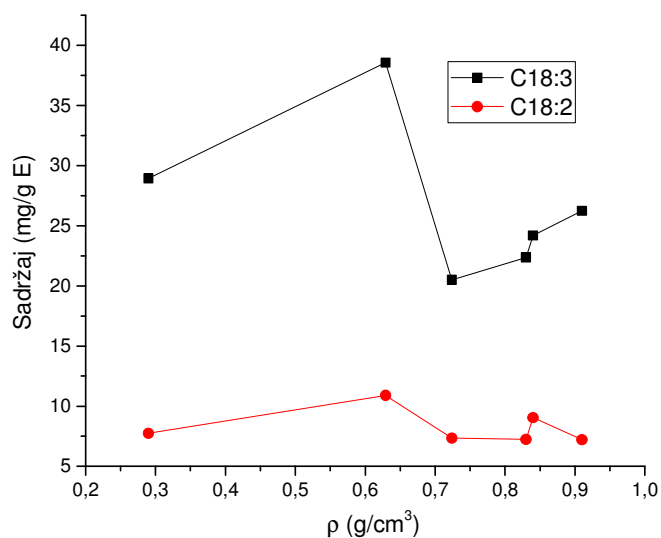
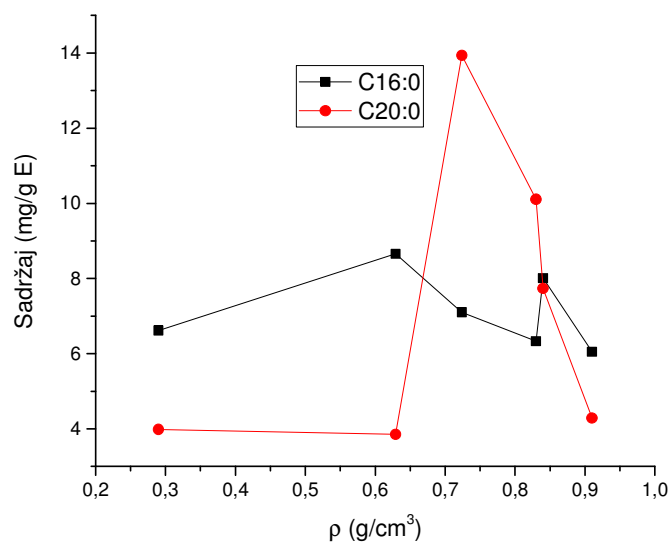
Kada je u pitanju uticaj pritiska i temperature na prinos pojedinačnih MK, pokazalo se da uticaj imaju funkcionalne grupe, dužina ugljovodoničnog niza, njegovog grananja, kao i stepen nezasićenosti. Sa porastom broja ugljenikovih atoma dolazi do smanjenja rastvorljivosti. Prisustvo dvostrukih veza povećava rastvorljivost uz smanjenje tačke topljenja MK [198,199]. Kiselina C6:0 nije nađena u uzorcima 4 i 6, dok njen sadržaj u uzorcima 1, 3 i 5 opada. Ovo ukazuje na to da porast temperature negativno utiče na njenu rastvorljivost. Isto se zapaža i u slučaju C13:0 kiseline. C10:0 i C 11:0 su kvantifikovane u uzorku 1 (100 bar, 40°C), pri čemu se jasno vidi negativan uticaj porasta pritiska i temperature na sadržaj ovih kiselina. Kiseline C15:0, C21:0 i C 23:0 nisu kvantifikovane u uzorcima 5, 2 i 3, dok su sve ostale SFA prisutne u svim uzorcima [197].

Ako se posmatra uticaj pritiska na prinos SFA (izotermalni uslovi), mogu se zapaziti određeni trendovi. Na 40°C, od C6:0 do C18:0 prinos opada, dok prinos MK nakon C18:0 opada do 200 bar, a zatim raste porastom pritiska na 300 bar. Na 60°C prinos prvo raste, a zatim opada. Sa druge strane, uticaj temperature pri izobarnim uslovima utiče različito u zavisnosti od strukture MK. Na 100 bar prinos SFA opada sa temperaturom sa izuzetkom C12:0, C20:0 i C23:0 kiselina. Na 200 bar prinos takođe opada osim u slučajevima C15:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C23:0 i C24:0. Primenom pritiska od 200 bar veći broj kiselina dostiže svoj maksimalni prinos na višoj temperaturi nego na 100 bar. Na 300 bar prinos opada samo u slučaju C6:0, C13:0, C14:0 i C23:0 [197]. Ovakav uticaj temperature na prinose MK se objašnjava pomenutim dualnim uticajem ovog parametra ekstrakcije.

Utjecaji uslova SFE, tačnije pritiska i temperature, mogu se posmatrati odvojeno za MUFA i PUFA. Tako, *trans*-C18:1 kiselina je detektovana samo u uzorku 2, dok je C24:1 kiselina prisutna u uzorku 3. Za razliku od ove dve MUFA, C15:1 kiselina nije detektovana samo u uzorku 4, a C20:1 nije nađena u uzorcima 3 i 6, dok su C14:1, C17:1 i *cis*-C18:1 prisutne u svim uzorcima. Izotermalni uslovi su, kao i u prethodnom slučaju, pokazali dvostruki efekat. Na 40°C prinos konstantno opada sa porastom pritiska u slučaju C14:1, C17:1 i *cis*-C18:1 kiselina. Na 60°C prinosi ovih kiselina dostižu maksimum na 200 ili 300 bar, u zavisnosti od same kiselina. Izobarni uslovi na 100 bar ukazuju na pad prinosa sa porastom temperature u slučaju svih MUFA, osim kod *trans*-C18:1 kiselina. Na 200 bar javlja se isti trend, osim u slučaju C16:1 i C20:1 čiji prinosi rastu sa porastom temperature. U slučaju pritiska od 300 bar, prinosi C16:1 i C17:1 opadaju sa porastom temperature [197].

Kada su PUFA u pitanju, najdominantnija je α -C18:3 kiselina sa najvećim prinosom u svim uzorcima. Za razliku od nje, γ -C18:3 kiselina nije detektovana u uzorcima 3 i 6, C20:3 n-3 je nađena u uzorcima 2 i 6, C22:2 je detektovana u uzorku 3, dok je C20:5 prisutna u uzorku 2. C20:4 kiselina nije nađena samo u uzorku 3. Rezultati pokazuju da su skoro sve PUFA dostigle svoj maksimalni prinos na 100 bar i 40°C (uzorak 1). Izuzeci su C20:3 i C22:2 kiselina. One su dostigle maksimalan prinos u uzorcima 5 (C20:3 n-6), 6 (C20:3 n-3) i 3 (C22:2). Zapaža se da obe C20:3 kiselina dostižu svoj maksimalni prinos na 300 bar, ali pri različitim temperaturama. Objašnjenje za ovo mogu biti različite pozicije dvostrukih veza koje utiču na rastvorljivost ovih jedinjenja u superkritičnom CO₂. Izotermalni uslovi na 40°C ukazuju na pad prinosa većine PUFA sa porastom pritiska na 200 bar, a zatim dolazi do porasta. Izuzeci su C18:2 i C20:2 kiselina čiji prinos konstantno opada sa porastom pritiska. Na 60°C prinosi C18:2 i γ -C18:3 kiselina konstantno opadaju, dok ostale kiselina pokazuju različit trend, pri čemu prinosi opadaju ili rastu na pritisku od 200 bar [197].

Utjecaj gustine supekritičnog CO₂ na prinos odabranih zasićenih i nezasićenih MK prikazan je grafički na slici 47. Sa grafika se može uočiti kompleksnost uticaja pritiska i temperature na gustinu CO₂, kao i na rastvorljivost ovih jedinjenja u njemu. Prilikom analiziranja zavisnosti takođe treba imati u vidu pomenuti dvojaki uticaj temperature na rastvorljivost ovih jedinjenja, dužinu ugljovodoničnih nizova i broj i položaj dvostrukih veza u molekulima MK [197-199].



Slika 47. Zavisnost sadržaja odabranih zasićenih (gore) i nezasićenih (dole) masnih kiselina od gustine CO₂

Tako, sadržaj C16:0 prvo raste sa porastom gustine, nakon čega opada pa opet raste i konačno pada. Sadržaj C20:0 prvo blago opada, zatim naglo raste, a onda konstantno opada. Sadržaj C18:2 pokazuje sličan trend kao i C16:0, dok sadržaj C18:3 kiseline konstantno raste nakon pada (slika 47).

4.3.3 Biološka aktivnost superkritičnih ekstrakata

Superkritični ekstrakti su dalje ispitani kako bi se utvrdila njihova antioksidativna i citotoksična aktivnost. Antioksidativna aktivnost je ispitana primenom pet *in vitro* testova: inhibicija DPPH radikala (DPPH), inhibicija lipidne peroksidacije (ILP), sposobnost heliranja metalnih jona (MCA), inhibicija hidroksilnih radikala (HRSA) i inhibicija ABTS radikala (ABTS) (tabela 24), dok je citotoksična aktivnost ispitana prema tri ćelijske linije kancera: Hep2c (engl. Human cervix carcinoma), RD (engl. Human rhabdomyosarcoma) i L2OB (engl. Murine fibroblast) (tabela 25). Rezultati dati u tabeli 24 ukazuju da su se ispitivani ekstrakti najbolje pokazali prema inhibiciji ABTS radikala, dok su najslabiji rezultati dobijeni u testu inhibicije lipidne peroksidacije. Takođe, rezultati pokazuju da neki od ekstrakata pokazuju veću aktivnost od standardnih jedinjenja koja se koriste kao antioksidansi (vitamin C, BHT, tokoferol i galna kiselina).

Tabela 24. Antioksidativna aktivnost superkritičnih ekstrakata lista koprive

Uzorak	IC ₅₀ (µg/mL)				
	DPPH ¹	ILP ²	MCA ³	HRSA ⁴	ABTS ⁵
1	22,55 ± 0,88	53,41 ± 0,21	21,54 ± 0,25	36,25 ± 0,78	13,64 ± 0,28
2	20,45 ± 0,65	49,48 ± 0,03	18,56 ± 0,47	33,48 ± 0,45	11,62 ± 0,75
3	17,86 ± 0,28	42,69 ± 0,28	15,52 ± 0,36	29,91 ± 0,32	9,23 ± 0,71
4	13,59 ± 0,12	36,49 ± 0,78	11,24 ± 0,82	26,40 ± 0,83	7,89 ± 0,50
5	9,96 ± 0,63	31,89 ± 0,76	8,63 ± 0,80	22,74 ± 0,74	6,87 ± 0,14
6	6,19 ± 0,44	24,85 ± 0,21	6,78 ± 0,47	19,76 ± 0,51	5,42 ± 0,12
GA ⁶	3,79 ± 0,69	255,43 ± 11,68	-	59,14 ± 1,10	7,34 ± 0,21
Vitamin C	6,05 ± 0,34	> 1000	-	160,55 ± 2,31	2,39 ± 0,93
BHT ⁷	15,61 ± 1,26	1,00 ± 0,23	-	33,92 ± 0,79	19,32 ± 0,72
α-Tokoferol	-	0,48 ± 0,05	-	-	-

¹Inhibicija DPPH radikala, ²inhibicija lipidne peroksidacije, ³sposobnost heliranja metalnih jona, ⁴sposobnost inhibicije hidroksilnih radikala, ⁵inhibicija ABTS radikala, ⁶galna kiselina, ⁷butilovani hidroksitoluen (dibutil-hidroksitoluen).

Rezultati pokazuju da aktivnost superkritičnih ekstrakata opada sa porastom pritiska i temperature u svim slučajevima. Najveća aktivnost kod svih testova pokazao je ekstrakt dobijen na 300 bar i 60°C (uzorak 6), dok je najmanja aktivnost dokazana kod uzorka 1 (100 bar i 40°C). Ovakav trend se javlja i kod citotoksične aktivnosti prema sve tri testirane ćelijske linije (tabela 25).

Objašnjenje za prikazane rezultate može biti različit hemijski sastav dobijenih ekstrakata. Hemijsko ispitivanje pokazalo je prisustvo mnogih supstanci koje su sposobne da reaguju sa radikalima, kao što su hlorofil, karotenoidi i nezasićene masne kiseline. Izvesno je da ovo nisu jedine klase jedinjenja koje su prisutne i doprinose visokoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata.

Tabela 25. Citotoksična aktivnost superkritičnih ekstrakata lista koprive

Uzorak	Ćelijska linija / IC ₅₀ (µg/mL)		
	Hep2c	RD	L2OB
1	34,02 ± 0,56	34,98 ± 0,78	35,06 ± 0,66
2	29,15 ± 0,54	31,24 ± 0,63	33,08 ± 0,89
3	26,65 ± 0,77	28,78 ± 0,44	27,29 ± 0,16
4	20,36 ± 0,20	22,69 ± 0,54	23,47 ± 0,78
5	16,63 ± 0,47	20,58 ± 0,87	18,78 ± 0,45
6	10,98 ± 0,96	15,32 ± 0,69	14,98 ± 0,77

Kada je u pitanju kriterijum za citotoksičnu aktivnost ekstrakata (IC₅₀ < 30 µg/mL) [188], rezultati ukazuju da uzorci 3-6 ispunjavaju ovaj uslov prema sve tri ćelijske linije. Pored njih, i uzorak 2 takođe ispunjava uslov prema Hep2c ćelijskoj liniji, dok su ostali bili izuzetno blizu granične vrednosti od 30 µg/mL.

4.4 Ekstrakcije iscrpljenog lista koprive

Nakon izvršene superkritične ekstrakcije, kojom su izdvojena pretežno lipofilna jedinjenja, iscrpljeni biljni materijal je ekstrahovan vodom u cilju ekstrakcije hidrofilnih jedinjenja koja su zaostala u biljnom materijalu, koristeći UAE i MAE metode. Dobijenim ekstraktima je određen ekstrakcioni prinos i ispitan je hemijski sastav spektrofotometrijskom i HPLC tehnikama. Takođe, ispitana je i biološka aktivnost dobijenih ekstrakata (antioksidativna i citotoksična aktivnost).

4.4.1 Prinos ekstrakcije i hemijski sastav ekstrakata

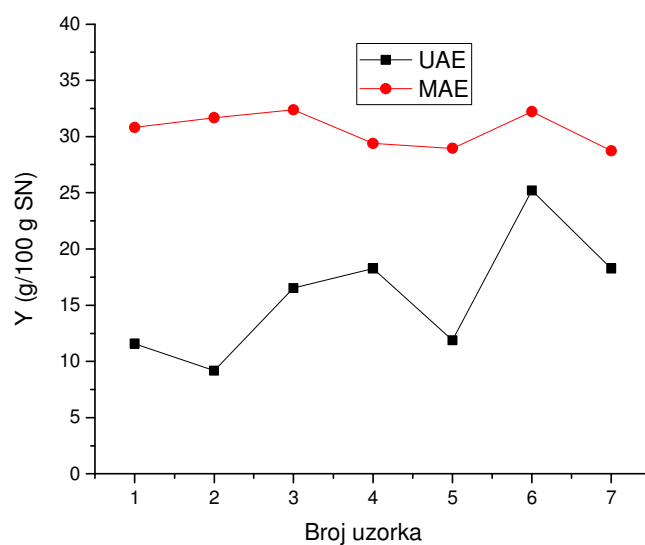
Rezultati prinosa ekstrakcije iscrpljenog lista koprive dati su u tabeli 26. Dobijeni rezultati potvrđuju prethodno utvrđenu prednost MAE, jer je prinos UAE ekstrakcije (11,58%) znatno niži od prinosa MAE (30,81%). Na osnovu grafičkog prikaza (slika 48) može se zapaziti da prinos mnogo više varira u slučaju UAE nego u slučaju MAE ekstrakcije. Takođe, u oba slučaja najveći prinos je postignut u uzorku 5, odnosno UAE-5 i MAE-5 (nakon 300 bar i 40°C). Kod UAE ekstrakcije prinos u početku opada, a zatim raste. Nakon rasta, u uzorku UAE-4 prinos pada, a zatim ponovo raste. U UAE-5 dostiže se maksimalan prinos, a zatim dolazi do ponovnog pada u uzorku UAE-6.

Tabela 26. Prinosi UAE i MAE ekstrakcije iscrpljenog lista koprive

Uzorak*	Prinos (mg/mL)	Prinos (g/100 g)
<i>Ultrazvučna ekstrakcija</i>		
UAE	3,86	11,58
UAE-1	3,06	9,18
UAE-2	5,51	16,53
UAE-3	6,09	18,27
UAE-4	3,96	11,88
UAE-5	8,40	25,20
UAE-6	6,09	18,27
<i>Mikrotalasna ekstrakcija</i>		
MAE	10,27	30,81
MAE-1	10,56	31,68
MAE-2	10,79	32,37
MAE-3	9,80	29,40
MAE-4	9,65	28,95
MAE-5	10,74	32,22
MAE-6	9,58	28,74

*Uslove SFE ekstrakcije koja je prethodila UAE 1-6 i MAE 1-6 dati su u tabeli 20. Uzorci su na grafičkim prikazima redom obeleženi brojevima 1-7. UAE i MAE ekstrakti su dobijeni ekstrakcijom polazne droge. Kada je MAE u pitanju, prinos u početku blago raste, a zatim opada. Nakon toga dolazi do ponovnog porasta prinosa (MAE-5), a zatim i do ponovnog pada.

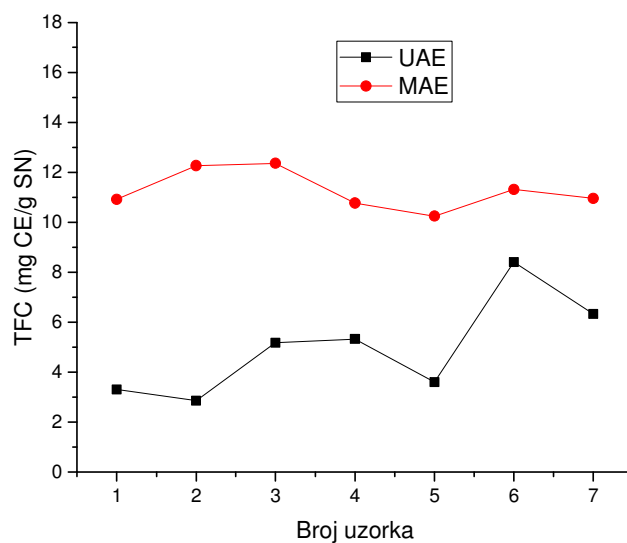
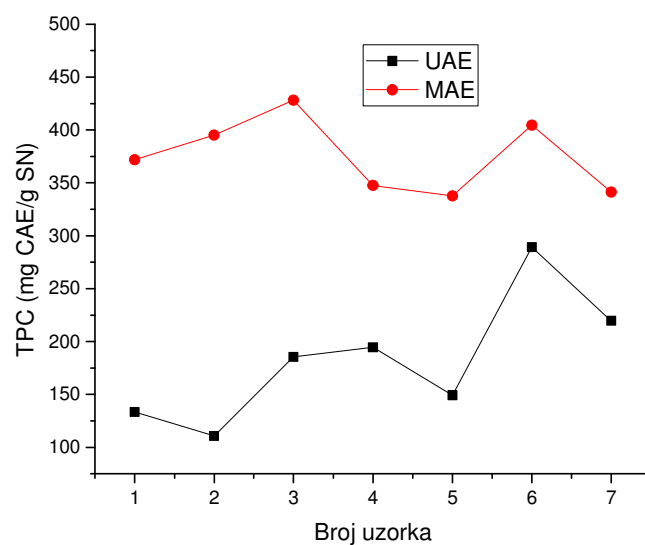
U tabeli 27 su dati rezultati za TPC i TFC u UAE i MAE ekstraktima iscrpljene droge nakon SFE, dok su na slici 49 dati njihovi grafički prikazi kako bi se lakše uočili trendovi. Prikazani rezultati su potvrdili da se kod MAE dobija veći prinos ekstrakcije nego u slučaju UAE.



Slika 48. Prinosi UAE i MAE ekstrakcija iscrpljenog lista koprive (za uzorke od 1-7 oznake videti u tabeli 26)

Tabela 27. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima iscrpljenog lista koprive

Uzorak	TPC (mg CAE/g SN)	TFC (mg CE/g SN)
<i>Ultrazvučna ekstrakcija</i>		
UAE	133,41	3,31
UAE-1	110,80	2,86
UAE-2	185,35	5,18
UAE-3	194,52	5,33
UAE-4	149,29	3,60
UAE-5	289,23	8,41
UAE-6	219,57	6,33
<i>Mikrotalasna ekstrakcija</i>		
MAE	371,92	10,92
MAE-1	395,14	12,27
MAE-2	428,14	12,36
MAE-3	347,46	10,77
MAE-4	337,69	10,25
MAE-5	404,50	11,32
MAE-6	341,37	10,96



Slika 49. Promena ukupnih fenola (gornji grafik) i flavonoida (donji grafik) u ekstraktima iscrpljene droge (za oznake uzorka 1-7 videti tabelu 26)

Sa slike 49 se jasno može zapaziti trend sadržaja ovih jedinjenja u oba slučaja. Kod UAE ekstrakcije TPC u početku opada, pa onda raste. TPC beleži dalji rast u uzorku UAE-3, a zatim drastično pada u uzorku UAE-4. U UAE-5 uzorku se beleži značajan porast TPC što predstavlja ujedno i maksimalni sadržaj ovih jedinjenja, dok se u UAE-6 uzorku ponovo beleži pad njihovog

sadržaja. Kada je u pitanju TFC u UAE ekstraktima, može se zapaziti isti trend kao i u slučaju TPC.

Za razliku od UAE ekstrakcije, kod MAE je trend sasvim drugačiji. Prinos TPC raste u uzorcima 2 i 3 (uzorci MAE-1 i MAE-2), a zatim se beleži pad sadržaja ovih jedinjenja u iscrpljenoj drogi. Nakon toga TPC ponovo raste u uzorku 6 (MAE-5), a zatim ponovo opada u uzorku 7 (MAE-6). Trend TFC kod MAE je isti kao i za TPC samo što su promene u sadržajima manje izražene. Sadržaj TFC raste u uzorcima 2 i 3 (MAE-1 i MAE-2), pa opada u uzorcima 3 i 4 (MAE-3 i MAE-4). U uzorku 6 (MAE-5) ponovo dolazi do porasta TFC, dok u uzorku 7 (MAE-6) on ponovo opada. Može se zapaziti da je SFE ekstrakcija koja je prethodila MAE i UAE ekstrakcijama olakšala izolaciju hidrofilnih komponenata. Ovo se može objasniti činjenicom da na visokim pritiscima dolazi do deformacije ćelija pa samim tim se olakšava i difuzija komponenata iz njih. Nakon izvršenih superkričnih ekstrakcija, UAE i MAE lakše rastvaraju i izdvajaju komponente, odnosno voda lakše prodire u ćelije biljnog materijala.

Kako bi se detaljnije ispitaio sastav dobijenih ekstrakata iscrpljene droge, urađena je HPLC analiza uzoraka, a rezultati su dati u tabelama 28 i 29, dok su prinosi fenolnih jedinjenja prikazani grafički (slika 50) kako bi se lakše uočile promene njihove vrednosti.

Iz prikazanih tabela se može zapaziti da se ukupni prinosi fenolnih jedinjenja značajno razlikuju od rezultata dobijenih spektrofotometrijskom analizom (F-C test). Takođe, trendovi prinosa kod obe ekstrakcione metode (slika 50) se takođe razlikuju od onih dobijenih F-C testom (slika 49). HPLC analiza je pokazala da prinos fenolnih jedinjenja značajno opada u ekstraktima iscrpljene droge u odnosu na sadržaj ovih jedinjenja u ekstraktima polaznog biljnog materijala.

Kada se analiziraju prinosi pojedinačnih jedinjenja, u oba slučaja dominiraju fenolne kiseline. U UAE ekstraktima najveći prinos je *p*-kumarne kiseline praćen kafenom i ferulnom kiselinom. U slučaju MAE ekstrakata, kafena kiselina je imala najveći prinos, ali samo u uzorku MAE-1. Pored kafene kiseline izdvajaju se 5-*O*-kafeoilhininska, *p*-kumarna i ferulna kiselina.

Kada se uporede sadržaji dominantnih jedinjenja u ekstraktima suve i iscrpljene droge, zapažaju se različiti trendovi. Kod UAE ekstrakata *p*-kumarna, *p*-hidroksifenilsirćetna i ferulna kiselina imaju veći prinos u ekstraktima iscrpljene droge, dok 5-*O*-kafeoilhininska, kafena i vanilinska kiselina imaju veći prinos u ekstraktima suve droge. U slučaju MAE ekstrakata, sadržaji kafene, ferulne i 5-*O*-kafeoilhininske kiseline su manji u ekstraktima iscrpljene droge, dok su sadržaj

vanilinske i *p*-hidroksifenilsirćetne kiseline veći u odnosu na njihove prinose u ekstraktu polazne droge. Sadržaj taksifolina je veći u ekstraktima iscrpljenog lista i kod UAE i MAE ekstrakcije.

Tabela 28. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ultrazvučnim ekstraktima iscrpljene droge

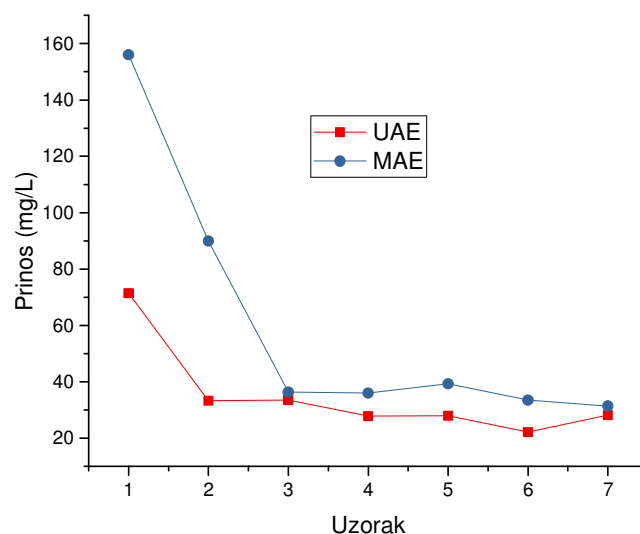
Jedinjenje	Sadržaj (mg/L)					
	UAE-1	UAE-2	UAE-3	UAE-4	UAE-5	UAE-6
Protokatehinska kiselina	2,317	2,256	ND*	ND	1,195	ND
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	1,734	1,643	1,876	1,841	1,340	1,805
Kafena kiselina	9,883	10,695	4,041	6,669	4,835	6,908
Vanilinska kiselina	1,959	1,737	1,954	2,048	1,333	2,005
Eskulin	0,691	0,878	0,962	1,145	0,688	1,095
5- <i>O</i> -kafeoilhininska kiselina	0,543	1,576	0,626	1,403	0,769	1,207
<i>p</i> -Kumarna kiselina	9,719	8,703	12,040	8,798	7,553	9,170
Ferulna kiselina	3,577	2,883	3,158	2,844	2,110	2,974
<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina	0,418	0,423	0,482	0,505	0,300	0,513
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	ND	0,025	0,013	0,020	ND	0,026
Rutin	0,071	0,090	0,022	0,067	0,046	0,081
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kvercetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Luteolin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Naringin	1,047	0,908	1,133	1,123	0,968	1,342
Kemferol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Apigenin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Izoramnetin-3- <i>O</i> -rutinozid	0,029	0,044	0,036	0,023	0,017	0,025
Taksifolin	0,836	1,112	0,982	0,899	0,638	1,002
Izoramnetin-3- <i>O</i> -glukozid	0,455	0,589	0,557	0,568	0,376	ND
Daidzein	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eriodiktiol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hrizoeriol	0,028	ND	ND	ND	0,019	ND
Hrizin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acacetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Genkvanin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galangin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kemferid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ukupan prinos	33,307	33,562	27,879	27,952	22,188	28,153

*ND-nije detektovan

Tabela 29. Sadržaj fenolnih jedinjenja u mikrotalasnim ekstraktima iscrpljene droge

Jedinjenje	Sadržaj (mg/L)					
	MAE-1	MAE-2	MAE-3	MAE-4	MAE-5	MAE-6
Protokatehinska kiselina	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	2,439	2,348	2,276	2,521	2,413	2,453
Kafena kiselina	41,955	ND	ND	ND	ND	ND
Vanilinska kiselina	1,715	1,767	1,640	1,685	1,721	1,693
Eskulin	2,131	2,048	2,162	2,415	2,218	2,259
5- <i>O</i> -kafeoilhininska kiselina	22,435	13,676	13,310	14,177	10,267	8,955
<i>p</i> -Kumarna kiselina	7,239	6,378	6,530	7,289	6,794	6,516
Ferulna kiselina	6,146	4,951	4,817	5,496	4,691	4,453
<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina	1,193	1,081	1,036	1,138	1,044	1,062
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	0,023	0,013	ND	0,012	ND	ND
Rutin	0,298	0,149	0,141	0,146	0,072	0,056
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	0,015	0,019	0,020	0,026	0,015	0,025
Kvercetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Luteolin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Naringin	2,327	2,029	2,124	2,185	2,592	2,213
Kemferol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Apigenin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Izoramnatin-3- <i>O</i> -rutinozid	0,079	ND	ND	0,035	ND	ND
Taksifolin	1,877	1,902	1,958	2,176	1,719	1,758
Izoramnatin-3- <i>O</i> -glukozid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Daidzein	0,029	ND	ND	ND	ND	ND
Eriodiktiol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hrizoeriol	ND	0,049	ND	ND	ND	ND
Hrizin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acacetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Genkvanin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galangin	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kemferid	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ukupan prinosa	89,942	36,409	36,015	39,300	33,547	31,422

*ND-nije detektovan



Slika 50. Prinosi fenolnih jedinjenja u ekstraktima polazne i iscrpljene droge (za oznake uzoraka 1-7 videti tabelu 26)

Sa slike se može videti da MAE ekstrakti ponovo imaju veći prinos od UAE ekstrakata. U oba slučaja prinos u početku naglo opada, dok su kasnije razlike minimalne. Najveća razlika u prinosima između UAE i MAE ekstrakata je između uzoraka UAE-1 i MAE-1 (uzorak 2, slika 50), dok uzorci 3 (UAE-2 i MAE-2) i 7 (UAE-6 i MAE-6) imaju međusobno bliske prinose.

Veliki pad prinosa fenolnih jedinjenja u iscrpljenoj drogi ukazuje na mogućnost odvijanja već pomenutih reakcija tokom UAE i MAE ekstrakcije, čije je odvijanje dodatno olakšano prethodnom SFE ekstrakcijom putem uklanjanja nepolarnih jedinjenja i oštećenjem ćelija na visokim pritiscima. Takođe, postoji mogućnost da je deo fenolnih jedinjenja ekstrahovan tokom SFE iako su ta jedinjenja slabije rastvorna u superkritičnom CO₂.

4.4.2 Biološka aktivnost ekstrakata

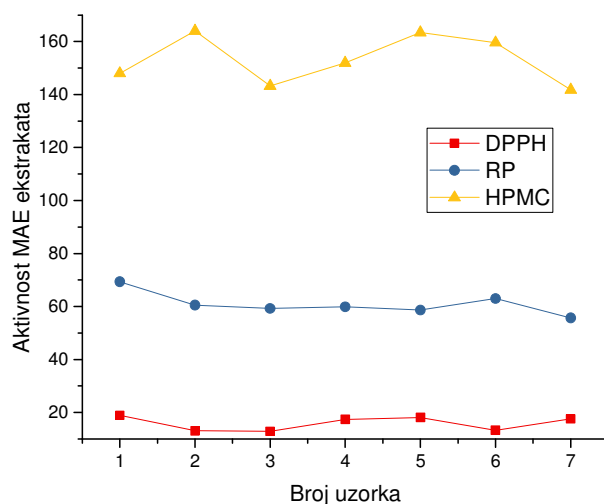
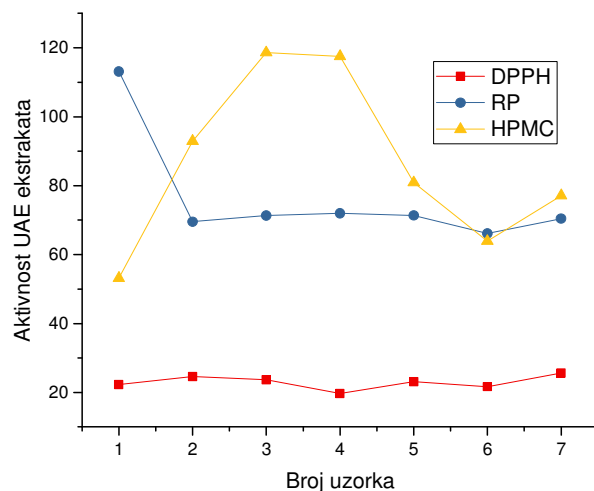
Kako bi se ispitalo ponašanje biološke aktivnosti ekstrakata iscrpljene droge, određene su antioksidativna, citotoksična i antimikrobna aktivnost ekstrakata. Antioksidativna aktivnost je određena primenom DPPH testa (IC₅₀ vrednosti), testa redukcione sposobnosti (EC₅₀ vrednosti) i

polarografskog testa (HPMC), a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 30. kako bi se lakše uočio trend ponašanja ispitivanih ekstrakata, rezultati su i grafički prikazani na slici 51.

Tabela 30. Antioksidativna aktivnost UAE i MAE ekstrakata iscrpljenog lista koprive

Uzorak	Antioksidativna aktivnost		
	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	HPMC (%/mL)
	Ultrazvučna ekstrakcija		
UAE	22,25	113,10	53,2
UAE-1	24,64	69,54	92,9
UAE-2	23,71	71,33	118,6
UAE-3	19,71	71,97	117,5
UAE-4	23,10	71,35	80,9
UAE-5	21,69	66,14	63,9
UAE-6	25,62	70,44	77,1
	Mikrotalasna ekstrakcija		
MAE	18,92	69,36	148,0
MAE-1	13,08	60,54	164,0
MAE-2	12,86	59,27	143,2
MAE-3	17,41	59,90	151,9
MAE-4	18,09	58,62	163,4
MAE-5	13,29	62,97	159,6
MAE-6	17,61	55,70	141,8

Iz prikazanih rezultata se može videti da se trendovi antioksidativne aktivnosti razlikuju međusobno, što je još jasnije uočljivo na grafičkom prikazu (slika 51). Kod UAE ekstrakata HPMC aktivnost raste i dostiže maksimalne vrednosti kod uzoraka 3 i 4 (UAE-2 i UAE-3), a zatim dolazi do pada aktivnosti. EC₅₀ vrednost opada u odnosu na UAE ekstrakt suvog lista, odnosno redukciona sposobnost (RP) raste, a zatim se ustaljuje, odnosno promene aktivnosti su minimalne. Kod DPPH testa najveću aktivnost pokazuje uzorak 4 (UAE-3), mada su aktivnosti ujednačene kao i u slučaju RP testa.



Slika 51. Grafički prikaz promene antioksidativne aktivnosti UAE (gore) i MAE (dole) ekstrakata iscrpljene droge (za oznake uzoraka 1-7 videti tabeli 26)

Kod MAE ekstrakata su trendovi različiti. Kod HPMC testa najveću aktivnost pokazao je uzorak 2 (MAE-1). Aktivnost nakon toga opada u uzorku 2 (MAE-2), a zatim ponovo raste pa opet opada (uzorci 6 i 7, odnosno MAE-5 i MAE-6). U slučaju RP i DPPH testova aktivnosti su ujednačene, odnosno promene su manje izražene.

U tabeli 31 prikazana je citotoksična aktivnost ekstrakata iscrpljene droge, dok je na slici 52 dat grafički prikaz trendova aktivnosti. Iz prikazanih vrednosti, kao i sa samih grafika se može zapaziti

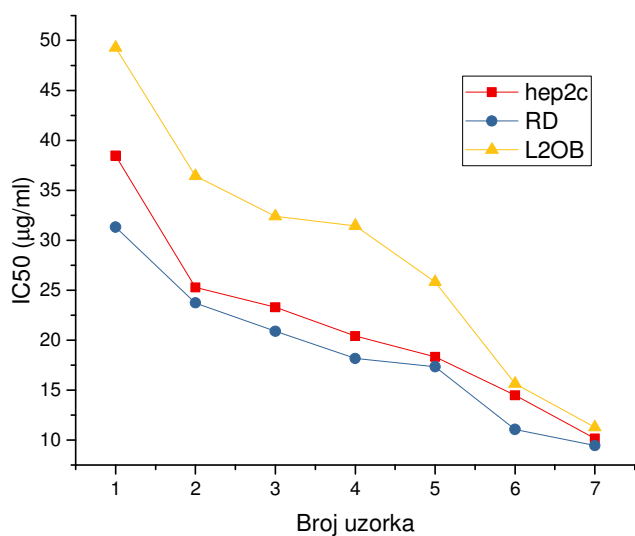
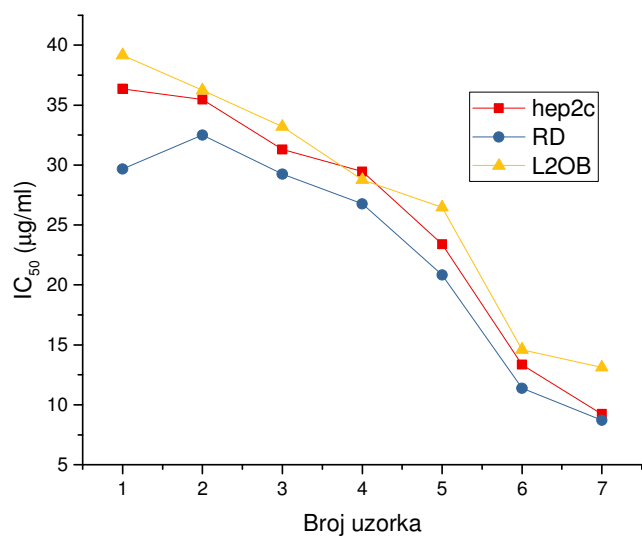
da aktivnost raste, odnosno da su u oba slučaja najaktivniji UAE-6 i MAE-6 ekstrakti (uzorak 7 na graficima).

Tabela 31. Citotoksična aktivnost UAE i MAE ekstrakata polazne i iscrpljene droge

Uzorak	Ćelijska linija / IC ₅₀ (µg/mL)		
	Hep2c	RD	L2OB
	Ultrazvučna ekstrakcija		
UAE	36,36 ± 0,12	29,67 ± 0,34	39,16 ± 0,32
UAE-1	35,45 ± 0,39	32,49 ± 0,98	36,23 ± 0,76
UAE-2	31,29 ± 0,83	29,24 ± 0,38	33,19 ± 0,43
UAE-3	29,46 ± 0,54	26,76 ± 0,83	28,76 ± 0,64
UAE-4	23,39 ± 0,72	20,84 ± 0,16	26,48 ± 0,13
UAE-5	13,35 ± 0,15	11,39 ± 0,30	14,60 ± 0,08
UAE-6	9,23 ± 0,67	8,72 ± 0,23	13,13 ± 0,32
	Mikrotalasna ekstrakcija		
MAE	38,47 ± 0,43	31,32 ± 0,54	49,28 ± 0,45
MAE-1	25,28 ± 0,20	23,73 ± 0,67	36,43 ± 0,18
MAE-2	23,29 ± 0,82	20,89 ± 0,29	32,39 ± 0,38
MAE-3	20,43 ± 0,14	18,18 ± 0,56	31,45 ± 0,24
MAE-4	18,34 ± 0,30	17,35 ± 0,91	25,83 ± 0,92
MAE-5	14,49 ± 0,29	11,08 ± 0,18	15,65 ± 0,15
MAE-6	10,17 ± 0,89	9,46 ± 0,37	11,30 ± 0,27

Najveću aktivnost UAE-6 i MAE-6 ekstrakti pokazuju prema RD ćelijskoj liniji, dok je najslabija aktivnost izražena prema L2OB ćelijama. Grafički prikaz (slika 52) pokazuje da se ovaj trend zadržava kod svih MAE uzoraka, dok se kod UAE ekstrakata taj trend u jednom momentu menja, odnosno UAE-3 ekstrakt pokazuje za nijansu veću aktivnost prema L2OB ćelijama u odnosu na aktivnost prema Hep2c ćelijskoj liniji.

Uslov za citotoksičnu aktivnost ekstrakata (IC₅₀ < 30 µg/mL) [188] prema svim ćelijskim linijama ispunjavaju UAE-3, UAE-4, UAE-5, UAE-6, MAE-4, MAE-5 i MAE-6 ekstrakti. UAE-2 ekstrakt ispunjava ovaj uslov prema RD ćelijama, dok MAE-1, MAE-2 i MAE-3 ekstrakti pokazuju aktivnost manju od 30 µg/mL prema Hep2c i RD ćelijskim linijama. Ono što je još važno naglasiti jeste da u svim slučajevima ekstrakti iscrpljene droge pokazuju veću aktivnost od ekstrakata polazne droge. Izuzetak je jedino aktivnost UAE ekstrakata prema RD ćelijskim linijama gde UAE ekstrakt pokazuje veći aktivnost od UAE-1 ekstrakta nakon čega aktivnost raste, odnosno IC₅₀ vrednosti opadaju.



Slika 52. Grafički prikaz trendova citotoksične aktivnosti UAE (gore) i MAE (dole) ekstrakata iscrpljene droge (za oznake uzoraka 1-7 videti tabelu 26)

Poredeći aktivnosti i sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima polazne i iscrpljene droge ponovo dolazi do izvesnih neslaganja. Aktivnost ekstrakata iscrpljene droge je uglavnom veća nego aktivnost ekstrakata polazne droge. Ovo navodi na zaključak da fenolna jedinjenja nisu nosioci biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata. Takođe, rezultati su u skladu sa već iznetim objašnjenjem

da se tokom UAE i MAE ekstrakcije odvijaju hemijske reakcije pri čemu nastaju nova jedinjenja koja imaju veću aktivnost [189,190]. Odvijanje ovih reakcija može takođe da objasni pad sadržaja fenolnih jedinjenja i porast aktivnosti ekstrakata iscrpljene droge.

Antimikrobna aktivnost UAE i MAE ekstrakata polazne i iscrpljene droge prikazani su u tabelama 32 i 33. Kao i u slučaju aktivnosti ekstrakata polaznog materijala (tabela 19) i ovde aktivnosti variraju u zavisnosti od mikroba i samog ekstrakta. U oba slučaja (UAE i MAE) najbolje rezultate pokazao je ekstrakt UAE-6, odnosno MAE-6.

Tabela 32. Antimikrobna aktivnost UAE ekstrakata polazne i iscrpljene droge

Mikrobni sojevi	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
	UAE	UAE-1	UAE-2	UAE-3	UAE-4	UAE-5	UAE-6
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	125,00	125,00	62,50	125,00	31,25	31,25	15,82
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	250,00	125,00	250,00	31,25	62,50	62,50	15,82
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	62,50	250,00	250,00	31,25	125,00	15,82	31,25
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	62,50	125,00	125,00	31,25	15,82	15,82	31,25
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14153)	500,00	62,50	62,50	31,25	125,00	62,50	7,81
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	250,00	125,00	500,00	125,00	62,50	125,00	31,25
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	500,00	250,00	31,25	125,00	125,00	15,82	7,81
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	500,00	250,00	125,00	500,00	62,50	62,50	7,81

Rezultati pokazuju da su ekstrakti iscrpljene droge još jednom pokazali bolju aktivnost od ekstrakata polazne droge, što ponovo potvrđuje činjenicu da fenolna jedinjenja nisu nosioci aktivnosti, kao i rezultate prethodno objavljenih istraživanja koja ukazuju da tokom ekstrakcije dolazi do odvijanja procesa koji rezultuju nastankom novih i aktivnijih jedinjenja [189,190]. Dalja istraživanja su svakako neophodna kako bi se utvrdila povezanost, odnosno zavisnost aktivnosti od hemijskog sastava ekstrakata, ali takođe treba imati u vidu i sinergističku aktivnost jedinjenja koja se u ekstraktima nalaze.

Tabela 33. Antimikrobna aktivnost MAE ekstrakata polazne i iscrpljene droge

Mikrobni sojevi	MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
	MAE	MAE-1	MAE-2	MAE-3	MAE-4	MAE-5	MAE-6
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	62,50	62,50	31,25	31,25	15,82	7,81	15,82
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	125,00	125,00	62,50	31,25	62,50	31,25	15,82
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	125,00	62,50	125,00	62,50	62,50	15,82	31,25
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	62,50	125,00	125,00	31,25	15,82	15,82	31,25
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14153)	31,25	62,50	125,00	31,25	15,82	62,50	7,81
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	62,50	125,00	62,50	31,25	62,50	31,25	15,82
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	250,00	125,00	125,00	62,50	31,25	15,82	31,25
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	125,00	31,25	62,50	125,00	62,50	31,25	7,81

4.5 Praktična primena ekstrakata koprive: hleb sa dodatkom lista i ekstrakta koprive

Kako se MAE ekstrakt lista koprive pokazao kao biološki najaktivniji, dalje istraživanje izvedeno je uz upotrebu ovog ekstrakta. U cilju ispitivanja mogućnosti praktične primene, pripremljeno je devet uzoraka hleba koji su sadržali list i/ili ekstrakt koprive, kao i njihovu smešu (tabela 34).

Tabela 34. Eksperimentalni tok proizvodnje hleba sa listom i ekstraktom koprive

Uzorak	Brašno (g)	List	Ekvivalent ekstrakta
		[% u formulaciji (masa u g)]	[% u formulaciji (masa u g)]
1	350	0 (0 g)	0 g
2	350	2,5 % (8,75 g)	0 g
3	350	5,0 % (17,5 g)	0 g
4	350	0	2,5% (262,5 g)
5	350	2,5 % (8,75 g)	2,5% (262,5 g)
6	350	5,0 % (17,5 g)	2,5% (262,5 g)
7	350	0	5,0% (525 g)
8	350	2,5 % (8,75 g)	5% (525 g)
9	350	5,0 % (17,5 g)	5% (525 g)

Pripremljeno je devet uzoraka od kojih je jedan bio kontrolni (uzorak 1). Dva uzorka su sadržaja 2,5% i 5,0% lista koprive (uzorci 2 i 3), dok su dva sadržala samo ekvivalentne količine ekstrakta (uzorci 4 i 7). Četiri uzorka su predstavljala kombinaciju ekstrakta i lista koprive u različitim odnosima (uzorci 5,6,8 i 9).

4.5.1 Fizička, teksturna i senzorska svojstva hleba sa listom i ekstraktom koprive

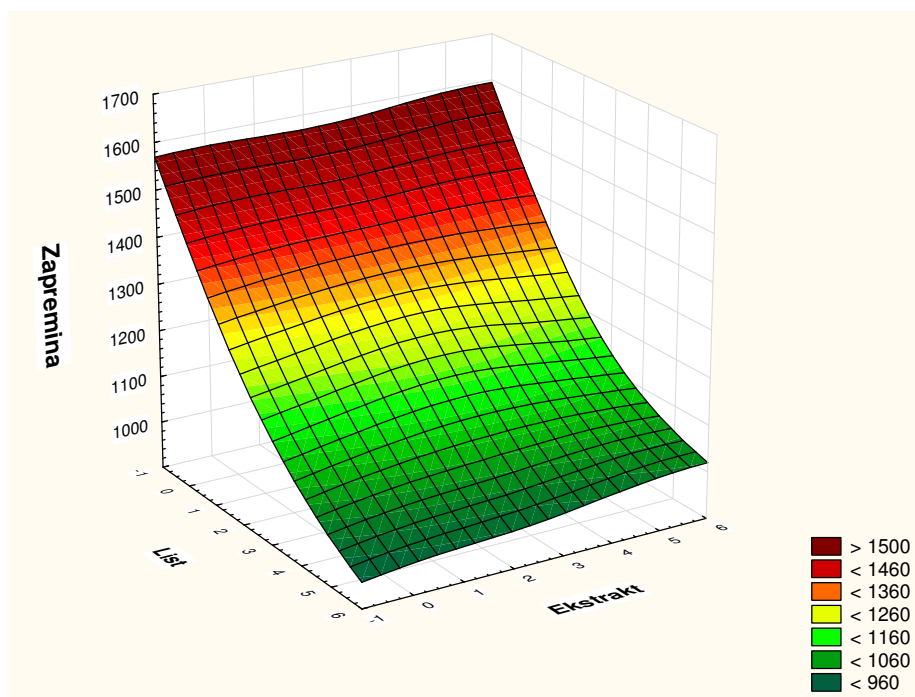
Zapremina hleba predstavlja jedan od ključnih parametara koji određuju kvalitet hleba. Ona je važna naročita sa stanovišta samih potrošača. Uticaj dodatka lista i ekstrakta koprive na ovaj parametar prikazan je u tabeli 35, gde je takođe dat i sadržaj vlage u uzorcima.

Tabela 35. Zapremina i sadržaj vlage u uzorcima hleba sa dodatkom lista i ekstrakta lista koprive

Uzorak*	Zapremina (mL)	Vlaga (%)
1	1446,63	61,2 ± 1,1
2	1183,61	63,6 ± 1,5
3	1014,33	63,1 ± 0,8
4	1448,25	61,3 ± 1,2
5	1217,68	64,6 ± 0,9
6	1030,72	64,6 ± 2,4
7	1459,52	64,6 ± 1,2
8	1187,57	62,8 ± 0,8
9	1047,58	60,2 ± 0,8

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.

Dodatkom suvog lista koprive zapremina se smanjuje (uzorci 2 i 3), dok se dodatkom ekstrakta postiže povećanje zapremine hleba (uzorci 4 i 7). Uticaj ovih parametara je prikazan grafički 3-D površinom (slika 53), gde se uticaji jasno vide. Kombinacija lista i ekstrakta utiču različito na zapreminu hleba, a sam uticaj zavisi od sadržaja obe komponente, odnosno od toga da li je list ili ekstrakt prisutan u većoj količini. Dodatak iste količine ekstrakta i lista smanjuje zapreminu hleba (uzorci 5 i 9). Poredeći zapremine uzoraka 2 i 5, kao i uzoraka 3 i 9 zapaža se da dodatak ekstrakta koprive delimično anulira negativan uticaj prisustva lista na zapreminu hleba. Uzorci gde je dodat samo ekstrakt koprive (uzorci 4 i 7) imaju veće zapremine od kontrolnog uzorka, a zapaža se i trend povećanja zapremine sa povećanjem sadržaja ekstrakta u hlebu. Kada je sadržaj vlage u pitanju, svi uzorci osim uzorka 9 imaju veći sadržaj vlage od kontrolnog uzorka.



Slika 53. 3-D grafički prikaz uticaja sadržaja lista i ekstrakta lista koprive na zapreminu hleba

U tabeli 36 prikazan je uticaj sastava hleba na njegovu čvrstoću i elastičnost. Rezultati pokazuju da dodatak lista koprive (uzorci 2 i 3) povećava čvrstoću hleba, dok se elastičnost smanjuje.

Tabela 36. Uticaj dodatka lista i ekstrakta koprive na čvrstoću i elastičnost hleba

Uzorak*	Čvrstoća (N)	Elastičnost (%)
1	2338,9 ± 279,1	36,6 ± 1,1
2	2465,3 ± 195,5	36,0 ± 1,8
3	4713,0 ± 299,4	31,7 ± 2,1
4	2378,4 ± 75,6	41,0 ± 1,6
5	2487,7 ± 280,4	35,6 ± 3,2
6	4086,9 ± 140,6	31,9 ± 1,3
7	2356,0 ± 240,39	37,7 ± 3,6
8	3083,2 ± 319,5	32,4 ± 1,5
9	3769,4 ± 160,4	32,0 ± 1,2

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.

Dodatak ekstrakta koprive u formulaciju hleba povećava čvrstoću, ali je taj uticaj znatno manji nego u slučaju lista (uzorci 4 i 7). Sa druge strane, ekstrakt povećava i elastičnost hleba za razliku

od lista koji je smanjuje. Kada je u pitanju kombinacija lista i ekstrakta, dodatak ekstrakta umanjuje negativan uticaj lista na ove parametre, kao što je to bilo i u slučaju zapremine hleba (tabela 35). Pored zapremine, vlage, čvrstoće i elastičnosti hleba praćen je i uticaj dodatka lista, odnosno ekstrakta koprive na boju gotovog proizvoda (tabela 37). Rezultati pokazuju da se sa dodatkom lista koprive (uzorci 2 i 3) svetloća hleba (L*) smanjuje. Ovo isto važi i za dodatak ekstrakta koprive (uzorci 4 i 7), sa tim što je taj uticaj znatno manji u odnosu na list. Dodatak lista koprive u početku pozitivno utiče na crveno-zelenu koordinatu (a*) i žuto-plavu koordinatu (b*), dok u uzorku 3 dolazi do opadanja vrednosti. Ovo važi i za razliku u obojenosti (C*).

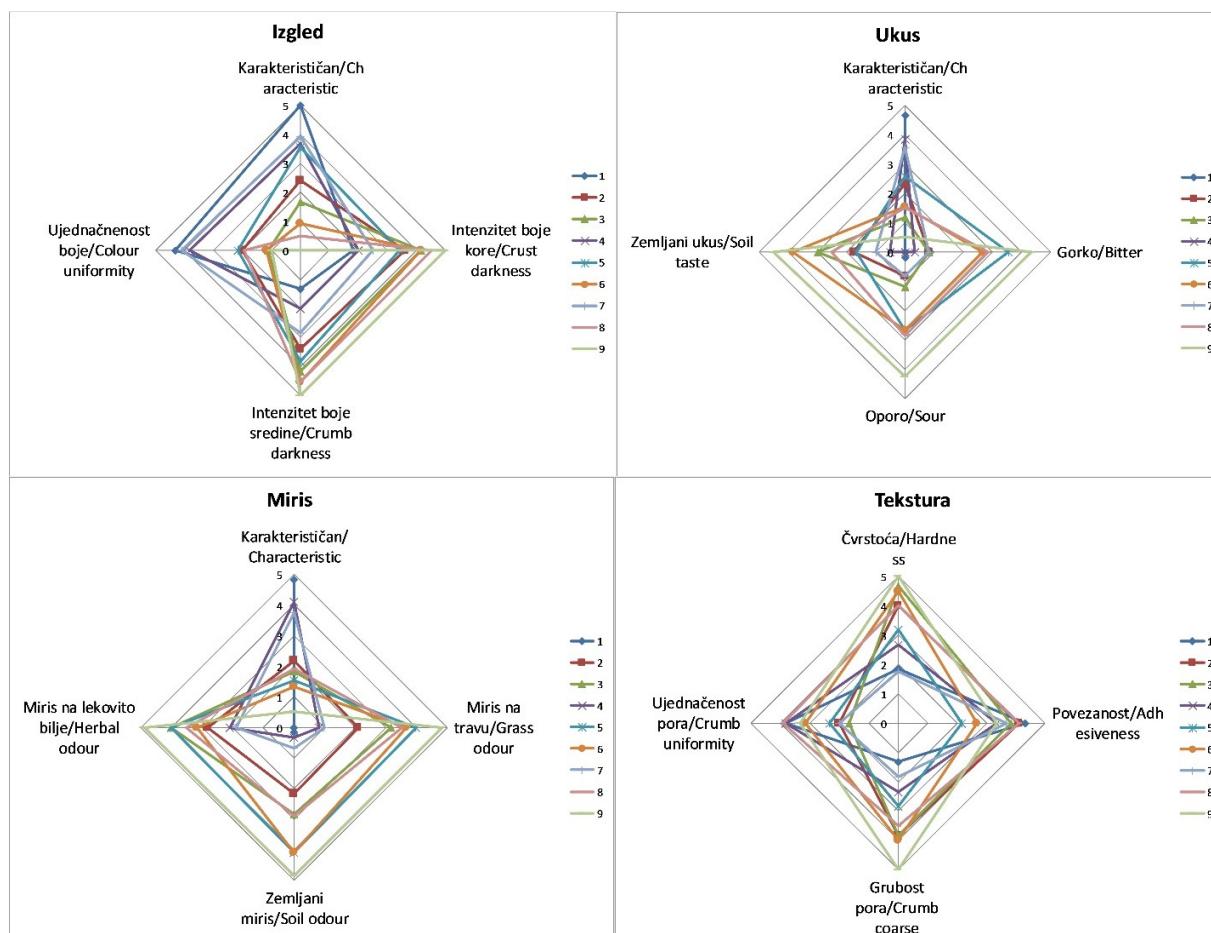
Tabela 37. Boja hleba sa dodatkom lista i ekstrakta koprive

Uzorak*	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	C* (D65)
1	75,66 ± 0,26	1,45 ± 0,20	20,83 ± 0,12	20,88 ± 0,12
2	59,29 ± 2,43	1,46 ± 0,34	21,22 ± 0,57	21,27 ± 0,59
3	55,71 ± 0,13	0,05 ± 0,19	18,31 ± 0,42	18,32 ± 0,42
4	60,77 ± 0,88	3,38 ± 0,06	21,71 ± 0,31	21,98 ± 0,30
5	56,41 ± 3,26	2,08 ± 0,42	20,27 ± 0,10	20,38 ± 0,14
6	52,12 ± 1,32	0,99 ± 0,18	19,43 ± 0,38	19,46 ± 0,80
7	59,51 ± 1,02	3,82 ± 0,07	23,25 ± 0,34	23,57 ± 0,33
8	53,71 ± 1,00	2,18 ± 0,12	19,32 ± 0,08	19,44 ± 0,07
9	48,19 ± 2,07	1,21 ± 0,14	17,69 ± 0,75	17,73 ± 0,74

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.

Dodatak ekstrakta (uzorci 4 i 7) takođe utiče negativno na svetloću, ali je taj uticaj opet manji u odnosu na uticaj lista. Za razliku od lista, ekstrakt pozitivno utiče na obe koordinate (a* i b*), kao i na razliku u obojenosti (C*). Kombinacija lista i ekstrakta pojačava uticaj na svetloću (L*) pri čemu uzorak 9 (5% koprive i ekstrakta) ima najmanju vrednost za ovu osobinu. Ovo važi i za sve ostale ispitivane osobine hleba.

Senzorska ocena kvaliteta hleba prikazana je na slici 54. Praćena su četiri parametra, odnosno miris, ukus, izgled i tekstura. Sama analiza je potvrdila i prethodno opisane rezultate vezane za tehnološki kvalitet hleba. Tako, sa povećanjem sadržaja lista dolazi do potamnjenja hleba, kao i izraženijeg ukusa lista koprive. Ekstrakt smanjuje taj uticaj lista, međutim najbolje rezultate pokazuje uzorak sa 5% ekstrakta, gde sam ekstrakt ne utiče negativno na tehnološki kvalitet hleba, kao što je to slučaj sa dodatkom 5% lista koprive u sastav hleba.



Slika 54. Senzorski profil hleba sa dodatkom lista i ekstrakta koprive

4.5.2 Ispitivanje hemijskog sastava hleba

Kako bi se utvrdio sastav dobijenih uzoraka hleba rađena su hemijska ispitivanja pri čemu je utvrđen sadržaj pepela, proteina, skroba, lipida, celuloze, šećera, mineralni sastav, kao i sadržaj ukupnih fenola (TPC) i flavonoida (TFC). Osnovni hemijski sastav hleba, odnosno sadržaj pepela, proteina, skroba, lipida, celuloze i šećera dat je u tabeli 38. Radi lakšeg uočavanja trendova, rezultati su prikazani i grafički na slici 55.

Najveći sadržaj pepela bio je u uzorku 3 (5% lista koprive), dok je najmanji bio u uzorku 4 (2,5% ekstrakta koprive). Najveći sadržaj proteina je zabeležen u uzorku 2 (2,5% lista), dok je najmanji bio u uzorku 3 (5% lista). Visok sadržaj proteina nađen je i u uzorcima 5 (2,5% lista i ekstrakta koprive), 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta koprive) i 7 (5% ekstrakta koprive). Može se zapaziti da svi

oni sadrže ekstrakt koprive u različitim količinama. Za razliku od sadržaja proteina, sadržaj skroba se veoma razlikuje među uzorcima. Najveći sadržaj se opet javlja u uzorku 2 (2,5% lista), dok je najmanji bio u uzorku 3 (5% lista). Visok sadržaj se zapaža i u uzorku 7 (5% ekstrakta), dok uzorci 4 (2,5% ekstrakta) i 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta) imaju vrednost blisku uzorku 3.

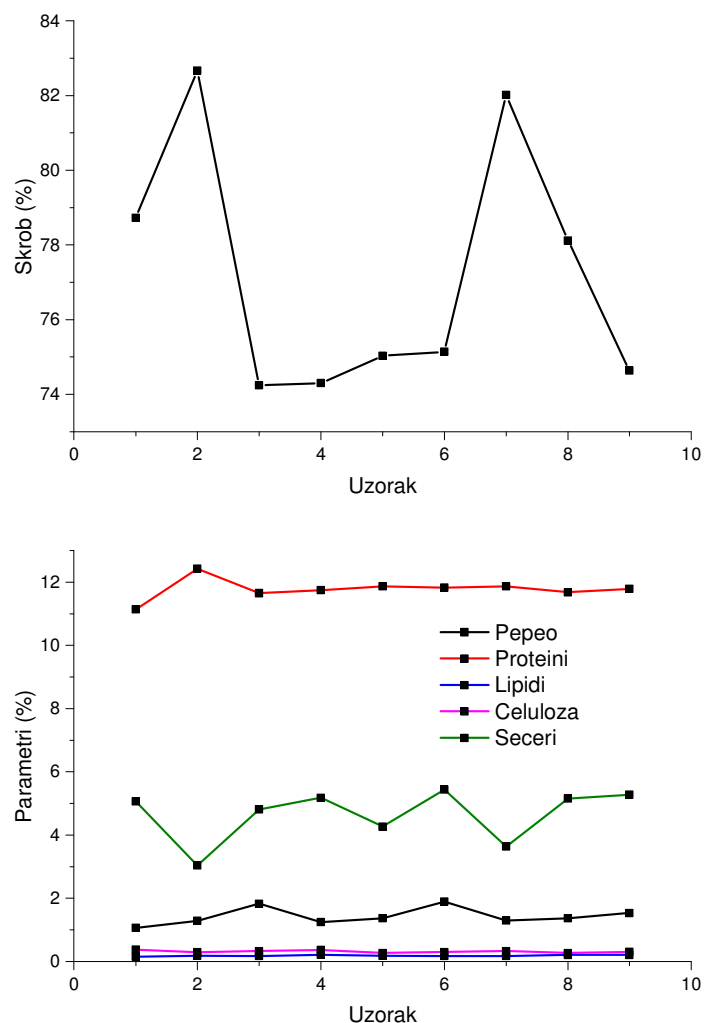
Tabela 38. Osnovni hemijski sastav hleba

Hleb*	Pepeo (%)	Proteini (%)	Skrob (%)	Lipidi (%)	Celuloza (%)	Šećer (%)
1	1,06 ± 0,04	11,14 ± 0,14	78,72 ± 0,07	0,16 ± 0,01	0,38 ± 0,03	5,07 ± 0,03
2	1,29 ± 0,07	12,43 ± 0,03	82,66 ± 1,01	0,19 ± 0,02	0,29 ± 0,08	3,04 ± 0,03
3	1,83 ± 0,06	11,65 ± 0,06	74,24 ± 0,11	0,17 ± 0,03	0,33 ± 0,03	4,81 ± 0,04
4	1,25 ± 0,13	11,75 ± 0,07	74,30 ± 0,19	0,22 ± 0,02	0,37 ± 0,07	5,18 ± 0,08
5	1,37 ± 0,08	11,87 ± 0,07	75,03 ± 0,47	0,19 ± 0,03	0,27 ± 0,05	4,27 ± 0,07
6	1,90 ± 0,07	11,83 ± 0,07	75,14 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,30 ± 0,05	5,44 ± 0,06
7	1,30 ± 0,08	11,87 ± 0,10	82,01 ± 0,12	0,17 ± 0,02	0,33 ± 0,02	3,64 ± 0,09
8	1,37 ± 0,12	11,68 ± 0,13	78,12 ± 0,13	0,21 ± 0,01	0,27 ± 0,07	5,16 ± 0,11
9	1,54 ± 0,05	11,79 ± 0,10	74,64 ± 0,08	0,21 ± 0,01	0,31 ± 0,06	5,28 ± 0,13

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.

Sadržaj lipida i celuloze imaju sličan trend (slika 55, dole). Najveći sadržaji zabeleženi su u uzorku 4 (2,5% ekstrakta), mada u slučaju celuloze svaki dodatak lista i/ili ekstrakta negativno je uticao na njen sadržaj. Sadržaj celuloze u uzorku 4 bio je najpribližniji sadržaju celuloze u kontrolnom uzorku (0,38%). Najmanji sadržaj lipida bio je u uzorcima 3 (5% lista), 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta) i 7 (5% ekstrakta), dok je najmanji sadržaj celuloze zabeležen u uzorcima 5 (2,5% lista i ekstrakta) i 8 (2,5% lista i 5% ekstrakta).

Sadržaj šećera je takođe dosta varirao u zavisnosti od sastava uzoraka (slika 55, dole). Najveći sadržaj zapažen je u uzorku 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta), dok je najmanji bio u uzorku 2 (2,5% lista). Vrednosti bliske najvećoj javljaju se u uzorcima 9 (5% lista i ekstrakta), 4 (2,5% ekstrakta) i 8 (2,5% lista i 5% ekstrakta).



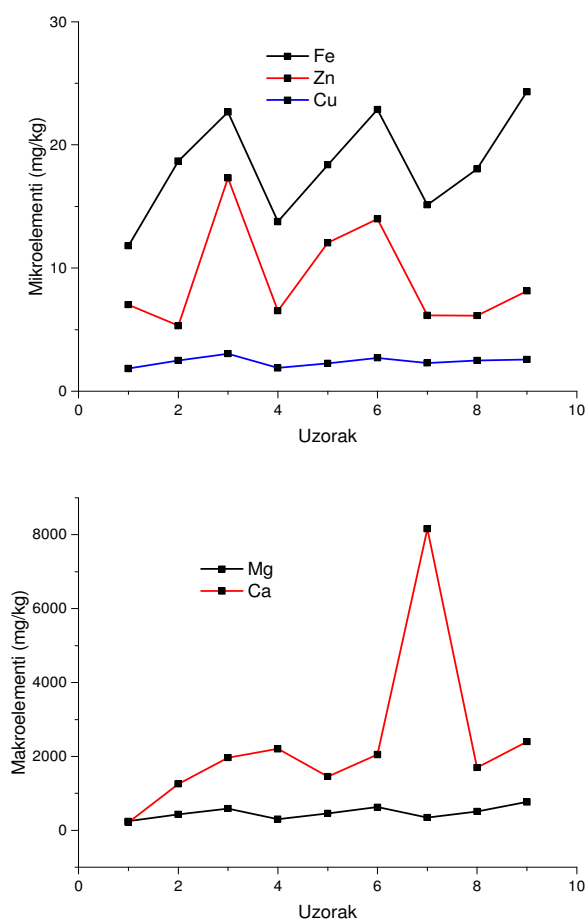
Slika 55. Sadržaji skroba (gore), pepela, proteina, lipida, celuloze i šećera (dole) u uzorcima hleba

Uzorci su takođe ispitani radi utvrđivanja sadržaja makroelemenata (magnezijuma i kalcijuma) kao i mikroelemenata (cinka, bakra, i gvožđa). Rezultati analize dati su u tabeli 39, dok je grafički prikaz (slika 56) dat radi lakšeg praćenja trendova. Sadržaj magnezijuma je dosta ujednačen za razliku od sadržaja kalcijuma u uzorcima. Najveći sadržaj magnezijuma bio je u uzorku 9 (5% lista i ekstrakta koprive) praćen uzorkom 6 (5% lista koprive i 2,5% ekstrakta koprive). Sa druge strane, najveći sadržaj kalcijuma bio je u uzorku 7 (5% ekstrakta koprive), dok je najmanji bio u uzorku 2 (2,5% lista koprive).

Tabela 39. Sadržaj minerala u hlebu sa dodatkom lista i ekstrakta koprive

Uzorak*	Sadržaj minerala (mg/kg)				
	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu
1	243,13 ± 7,39	220,71 ± 8,35	11,80 ± 0,05	7,02 ± 0,07	1,83 ± 0,04
2	431,72 ± 4,40	1256,00 ± 30,00	18,68 ± 0,23	5,32 ± 0,09	2,49 ± 0,09
3	587,29 ± 9,97	1966,00 ± 14,00	22,68 ± 0,16	17,31 ± 0,32	3,04 ± 0,09
4	303,49 ± 3,39	2203,00 ± 8,00	13,77 ± 0,15	6,52 ± 0,08	1,89 ± 0,10
5	462,32 ± 3,39	1451,00 ± 19,00	18,38 ± 0,09	12,04 ± 0,20	2,26 ± 0,06
6	627,00 ± 5,65	2049,00 ± 54,00	22,89 ± 0,22	13,98 ± 0,32	2,70 ± 0,05
7	347,75 ± 8,77	8160,00 ± 22,27	15,13 ± 0,12	6,15 ± 0,15	2,28 ± 0,08
8	505,85 ± 5,62	1700,00 ± 25,00	18,04 ± 0,09	6,13 ± 0,13	2,49 ± 0,10
9	767,77 ± 8,17	2400,00 ± 15,00	24,32 ± 0,04	8,14 ± 0,19	2,58 ± 0,08

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.



Slika 56. Grafički prikaz sadržaja mikroelemenata (gore) i makroelemenata (dole) u hlebu

Rezultati ukazuju na znatne varijacije u sadržaju mikroelemenata u uzorcima hleba (slika 56). Najveći sadržaj gvožđa je detektovan u uzorku 9 (5% lista i ekstrakta), koji je praćen uzorcima 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta) i 3 (5% lista). Najveći sadržaj cinka ubedljivo je bio u uzorku 3 (5% lista), a još se ističu i sadržaji u uzorcima 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta) i 5 (2,5% lista i ekstrakta). Najveći sadržaj bakra se zapaža u uzorku 3 (5% lista), a praćen je sadržajem u uzorku 6 (5% lista i 2,5% ekstrakta). Rezultati ukazuju da se najveći sadržaj makro i mikroelemenata najčešće javlja u uzorku sa visokim sadržajem lista. Kod makroelemenata dominiraju uzorci koji istovremeno sadrže i veliki udeo ekstrakta.

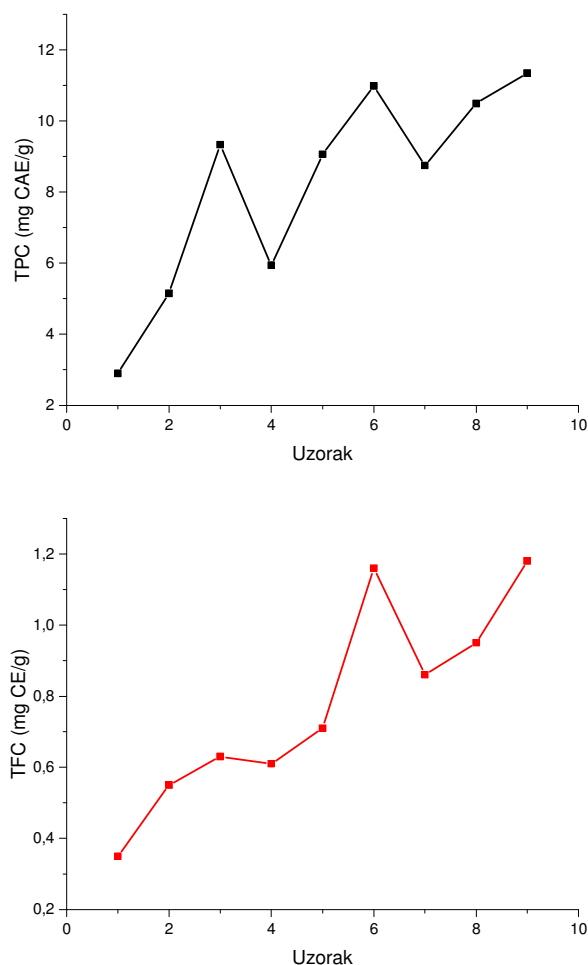
Ukupni sadržaji polifenola i flavonoida u uzorcima hleba dati su u tabeli 40, dok su grafički prikazani na slici 57. Rezultati su izraženi u miligramima hlorogenske kiseline (TPC), odnosno miligramima kathina (TFC) po gramu hleba. Odmah se može zapaziti da je sadržaj ovih jedinjenja dosta niži u odnosu na ekstrakt, ali je njihovo prisustvo od izuzetnog značaja usled velikog biološkog potencijala ovih jedinjenja. Najveći sadržaj TPC i TFC bio je u uzorku 9, za kojima slede uzorci 6 i 8.

Tabela 40. Ukupni sadržaj polifenola i flavonoida u uzorcima hleba

Uzorak*	Suva kopriiva (%)	Ekvivalent ekstrakta (%)	TPC (mg CAE/g)	TFC (mg CE/g)
1	0	0	2,90	0,35
2	2,5 %	0	5,15	0,55
3	5,0 %	0	9,33	0,63
4	0	2,5%	5,94	0,61
5	2,5 %	2,5%	9,06	0,71
6	5,0 %	2,5%	10,98	1,16
7	0	5,0%	8,74	0,86
8	2,5 %	5%	10,49	0,95
9	5,0 %	5%	11,34	1,18

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.

Grafički prikaz trendova TCP i TFC u uzorcima (slika 57) pokazuje da su trendovi promene sadržaja obe klase jedinjenja u uzorcima hleba međusobno veoma slični. U početku sadržaj ukupnih fenola i flavonoida raste, a zatim opada. Nakon pada opet dolazi do porasta sadržaja koji prati još jedan pad i skok kada se dostiže njihova maksimalna vrednost u uzorku 9.



Slika 57. Sadržaj ukupnih fenola (gore) i flavonoida (dole) u hlebu sa dodatkom lista i ekstrakta koprive

4.5.3 Ispitivanje biološke aktivnosti hleba

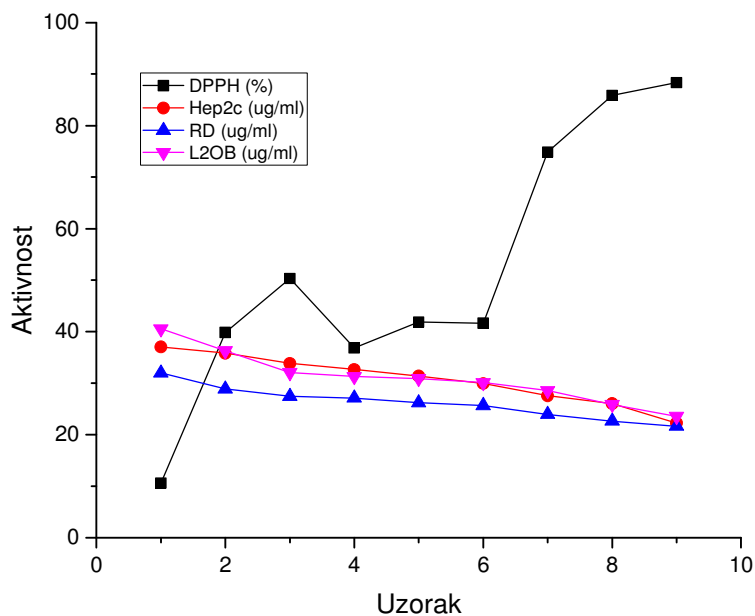
Biološka aktivnost hleba ispitana je pomoću DPPH testa (antioksidativna aktivnost) i MTT testa (citotoksična aktivnost). Rezultati analize dati su u tabeli 41. Radi lakšeg praćenja trendova, rezultati su prikazani i grafički (slika 58). Rezultati pokazuju da se u sva četiri slučaja najveća aktivnost ispoljava kod uzorka 9 (5% lista i ekstrakta koprive). Razmatranjem trenda antioksidativne aktivnosti, zapaža se njen porast, a zatim i pad u uzorku 4 (2,5% ekstrakta), nakon

čega opet beleži rast do uzorka 9 koji je najaktivniji. Sa druge strane, kod MTT testa zapaža se stalni porast aktivnosti, odnosno pad IC₅₀ vrednosti prema sve tri ćelijske linije.

Tabela 41. Antioksidativna i citotoksična aktivnost uzoraka hleba

Uzorak*	Biološka aktivnost			
	DPPH (%)	Ćelijske linije / IC ₅₀ (µg/mL)		
		Hep2c	RD	L2OB
1	10,60	37,05	31,98	40,55
2	39,83	35,82	28,87	36,28
3	50,32	33,84	27,45	32,06
4	36,83	32,66	27,10	31,29
5	41,86	31,37	26,20	30,91
6	41,65	29,95	25,67	30,12
7	74,84	27,56	23,95	28,56
8	85,85	26,02	22,65	25,87
9	88,33	22,26	21,65	23,55

*Za način pripreme uzorka videti tabelu 34.



Slika 58. Biološka aktivnost uzoraka hleba

Ovakvi trendovi potvrđeni su i korelacionom analizom između TPC, TFC, DPPH i citotoksične aktivnosti prema sve tri ćelijske linije (tabela 42). Kao i u prethodnom slučaju vrednosti

korelacionih koeficijenata se kreću u opsegu 0-1 gde vrednost 1 označava maksimalnu korelaciju, dok 0 ukazuje da korelacija ne postoji. Faktori u opsegu 0,50-0,70 ukazuju na slabu korelaciju, 0,70-0,90 umerenu korelaciju, dok se vrednosti $> 0,90$ smatraju visokom korelacijom. Test je rađen pri statističkoj značajnosti od $p < 0,05$.

Tabela 42. Korelaciona analiza između hemijskog sastava i biološke aktivnosti uzoraka hleba

Test	TPC	TFC	DPPH	Hep2c	RD	L2OB
TPC	1					
TFC	0,90	1				
DPPH	0,76	0,73	1			
Hep2c	-0,81	-0,88	-0,91	1		
RD	-0,87	-0,87	-0,94	0,97	1	
L2OB	-0,88	-0,86	-0,91	0,95	0,99	1

Rezultati testa ukazuju na visok stepen korelacije između TPC i TFC ($r = 0,90$), kao i među testovima biološke aktivnosti, odnosno DPPH, Hep2c, RD i L2OB gde je $r > 0,90$. Najniži stepen korelacije bio je između DPPH testa i TPC, odnosno TFC ($0,70 < r < 0,80$), dok je korelacija između TPC, odnosno TFC i hep2c, RD i L2OB bio veći od 0,80. Ovakvi rezultati se mogu tumačiti činjenicom da polifenolna jedinjenja nisu jedina odgovorna za biološku aktivnost ekstrakata, pa samim tim i hleba, dok iste klase jedinjenja reaguju i sa DPPH radikalima i inhibiraju rast i razvoj sve tri ćelijske linije raka.

5. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- List koprive je osušen, i ispitan kako bi se utvrdio njegov hemijski sastav. Nađeno je da list sadrži više različitih klasa jedinjenja među kojima su monoterpeni (linalool, karvakrol i eugneol), hlorofil, karotenoidi, masne kiseline [palmitinska (C16:0), linolna (C18:2) i α -linolenska (C18:3) kao dominantne kiseline], fenolna jedinjenja, minerali i vitamini B grupe, kao i vitamin C.
- Sadržaj masnih kiselina, hlorofila i karotenoida u ekstraktima zavisi od upotrebljene ekstrakcione tehnike i ekstragensa. Tako, u slučaju klasične ekstrakcije koja je rađena smešom rastvarača (formaldehid-etanol u odnosu 2:1) dominiraju palmitinska (C16:0), linolna (C18:2) i α -linolenska (C18:3) kiselina, dok u slučaju Soxhlet ekstrakcije (petrol-etar kao ekstragens) dominiraju laurinska (C12:0), palmitinska (C16:0) i oleinska (C18:1) kiselina. Prinos ukupnog hlorofila je bio najveći u etanolnom ekstraktu, dok je maksimalan sadržaj karotenoida ostvaren pomoću metilen-hlorida.
- Mineralni profil lista koprive pokazao je da od makroelemenata dominira kalijum (33,90 g/kg), dok je gvožđe bilo najzastupljeniji mikroelement sa sadržajem od 10,97 mg/kg. Od toksičnih elemenata detektovani su arsen, kadmijum i olovo u veoma niskim koncentracijama, dok živa nije detektovana.
- Urađene su preliminarne ekstrakcije lista koprive pomoću ultrazvučne ekstrakcije (UAE) upotrebom rastvarača različitih polarnosti. Dobijenim ekstraktima je određen prinos, a ispitana je njihova antioksidativna aktivnost. Rezultati su pokazali da je voda najpogodniji rastvarač.
- Nakon preliminarne ekstrakcije rađene su Soxhlet ekstrakcija (SE), maceracija (MAC), ultrazvučna (UAE) i mikrotalasna ekstrakcija (MAE). Dobijenim ekstraktima je određen prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenolnih (TPC) jedinjenja i flavonoida (TFC). Analiza fenolnih jedinjenja je urađena i pomoću HPLC tehnike, a određen je i mineralni sastav ekstrakata i sadržaj vitamina. Najveći prinos TPC i TFC imala je MAE, dok je najveći sadržaj fenolnih jedinjenja određen primenom HPLC tehnike ostvaren Soxhlet

ekstrakcionom tenikom (SE). Mineralni sastav je varirao u zavisnosti od primenjene ekstrakcione metode, gde su se nekonvencionalne (UAE i MAE) pokazale bolje od konvencionalnih. Ovaj zaključak važi i za sadržaj vitamina u ekstraktima koprive.

- Dobijeni ekstrakti su ispitani kako bi se utvrdio njihov biološki potencijal, tačnije antioksidativna, citotoksična i antimikrobna aktivnost. U sva tri slučaja MAE se pokazala kao najbolja metoda ekstrakcije, odnosno MAE ekstrakt je pokazao najveću aktivnost.
- Superkritična ekstrakcija (SFE) lista koprive rađena je na tri pritiska (100, 200 i 300 bar) i dve temperature (40 i 60 °C). Najveći prinos je dobijen na 300 bar i 60°C pri gustini CO₂ od 0,830 g/cm³. Rezultati su pokazali da je na obe ispitivane temperature prinos rastao sa povećanjem pritiska.
- U uzorcima superkritičnih ekstrakata su ispitani sadržaji hlorofila i karotenoida. Najveći sadržaj ukupnog hlorofila dobijen je na 300 bar i 60°C pri gustini CO₂ od 0,830 g/cm³, dok je najveći sadržaj karotenoida na 200 bar i 60°C pri gustini CO₂ od 0,724 g/cm³. Izolovanju karotenoida pogoduje niži pritisak, dok je slučaj kod hlorofila obrnut.
- Sadržaj masnih kiselina u SFE se pokazao zavisnim od uslova ekstrakcije. Najveći prinos zasićenih masnih kiselina (SFA) je ostvaren na 200 bar i 60°C pri gustini CO₂ od 0,724 g/cm³, dok su maksimalni sadržaji nezasićenih (UFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) primećeni na 100 bar i 40°C pri gustini CO₂ od 0,629 g/cm³. Za izdvajanje SFA bolji su se pokazali veći pritisak i temperatura, dok za izdvajanje UFA, MUFA i PUFA pogoduju niže vrednosti ovih parametara.
- Testovi antioksidativne i citotoksične aktivnosti SFE ekstrakata pokazali su da najveću aktivnost ima ekstrakt dobijen na 300 bar i 60°C pri gustini CO₂ od 0,830 g/cm³, dok najmanju pokazuje ekstrakt dobijen na 100 bar i 40°C pri gustini CO₂ od 0,629 g/cm³.
- Nakon SFE ekstrakcija, delimično iscrpljeni biljni materijal je sakupljen i ekstrahovan vodom pomoću UAE i MAE metoda. U svim slučajevima MAE ekstrakti su imali veći prinos od UAE ekstrakata. Najveći prinos zapažen je kod UAE-5 (25,20 g/100 g) i MAE-2 (32,37 g/100 g) uzoraka.
- UAE i MAE ekstrakti delimično iscrpljene droge su ispitani radi određivanja TPC, TFC, kao i fenolnog profila HPLC tehnikom. I u ovom slučaju, kao i kod prinosa, najveći TPC i TFC kod UAE bio je u uzorku UAE-5 (404,50 mg CAE/g SN i 8,41 mg CE/g SN), dok je kod MAE to bilo u uzorku MAE-2 (428,14 mg CAE/g SN i 12,36 mg CE/g SN). U slučaju

HPLC analize, najveći sadržaj fenolnih jedinjenja kod UAE bio je u uzorku UAE-2 (33,562 mg/L), dok je kod MAE najveći prinos bio u uzorku MAE-1 (89,942 mg/L).

- Ispitivanja antioksidativne aktivnosti pokazala su različite rezultate što ukazuje na to da su testovi podložni uticaju različitih jedinjenja i mehanizama dejstva. Kod testa citotoksične aktivnosti UAE-6 i MAE-6 ekstrakti su pokazali najveću aktivnost prema sve tri testirane ćelijske linije raka.
- Ispitana je i praktična primena ekstrakta koprive pravljenjem hleba koji je sadržao list (2,5% i 5,0%), MAE ekstrakt (2,5% i 5,0%) i njihovu kombinaciju. Ispitani su parametri tehnološkog kvaliteta, hemijski sastav hleba i njegova biološka aktivnost. Rezultati su pokazali da dodatak ekvivalentne količine ekstrakta koprive ne narušava tehnološki kvalitet hleba kao što je to u slučaju dodatka lista, a pri tome se dobija hleb sa značajnim sadržajem biološki aktivnih jedinjenja koji mogu preventivno da deluju na ljudsko zdravlje.
- Primenom savremenih metoda ekstrakcije koprive, ispitivanjem hemijskog sastava i utvršivanjem biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata može se zaključiti da kopriva predstavlja sirovinu sa visokim potencijalom za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

6. Literatura

- [1] B. Pekić, Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloidi i etarska ulja), Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1983.
- [2] S. Milošević, Ekstrakcija ginka (*Glnko biloga* L.) ugljenik(IV)-oksidom pod pritiskom, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2011.
- [3] J. Švarc-Gajić, Sampling and sample preparation in analytical chemistry, Nova Science Publishers, New York, 2012.
- [4] J. Pawliszyn, Sample preparation: Quo Vadis?, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2543–2558. doi:10.1021/ac034094h.
- [5] V. Camel, Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst.* 126 (2001) 1182–1193.
- [6] M. Waldebäck, Pressurized fluid extraction: A sustainable technique with added values, PhD dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, 2005.
- [7] A. Cvetanović, Optimizacija savremenih ekstrakcionih postupaka za izolovanje apigenina iz cveta kamilice (*Chamomilla reutita* L.) i karakterizacija biološke aktivnosti dobijenih ekstrakata, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2016.
- [8] L. Wang, C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 300–312.
- [9] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* 117 (2013) 426–436.
- [10] B. Pavlić, Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2017.
- [11] S. Mitra, Sample preparation techniques in analytical chemistry, John Wiley & Sons, New Jersey, 2003.
- [12] B.K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 100–109.

- [13] T.J. Mason, D. Peters, Practical sonochemistry: power ultrasound uses and applications, Woodhead Publishing, 2002.
- [14] C.-H. Chan, R. Yusoff, G.-C. Ngoh, F.W.-L. Kung, Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6213–6225.
- [15] C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A.* 902 (2000) 227–250.
- [16] A. Brachet, P. Christen, J.-L. Veuthey, Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, *Phytochem. Anal.* 13 (2002) 162–169.
- [17] J. Hao, W. Han, S. Huang, B. Xue, X. Deng, Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L, *Sep. Purif. Technol.* 28 (2002) 191–196.
- [18] E. Moreno, J. Reza, A. Trejo, Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions, *Polycycl. Aromat. Compd.* 27 (2007) 239–260.
- [19] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, *J. Chromatogr. A.* 1196–1197 (2008) 65–72.
- [20] A. Mustafa, C. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Anal. Chim. Acta.* 703 (2011) 8–18.
- [21] B. Nikolovski, Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis* L.) i semenki tikve (*Cucurbita pepo* L.) natkritičnim ugljendioksidom, doktorska disertacija Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2009.
- [22] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review, *Food Chem.* 98 (2006) 136–148.
- [23] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives, *Food Bioprocess Technol.* 3 (2010) 340–372.
- [24] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit. Fluids* 38 (2006) 146–166.

- [25] R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds, *TrAC Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 40–51.
- [26] G. Brunner, Supercritical fluids: technology and application to food processing, *J. Food Eng.* 67 (2005) 21–33.
- [27] M.M.R. de Melo, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *J. Supercrit. Fluids* 92 (2014) 115–176.
- [28] P.M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2009.
- [29] G.D. Lawrence, *The fats of life: essential fatty acids in health and disease*, Rutgers University Press, New Jersey, 2010.
- [30] A.P. Simopoulos, Essential fatty acids in health and chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 560S–569S.
- [31] H. Tapiero, G. Nguyen Ba, P. Couvreur, K.D. Tew, Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 215–222.
- [32] H. Iso, S. Sato, U. Umemura, M. Kudo, K. Koike, A. Kitamura, H. Imano, T. Okamura, Y. Naito, T. Shimamoto, Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke, *Stroke* 33 (2002) 2086–2093.
- [33] K. Baser, G. Buchbauer, *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, 1st ed., CRC press, Boca Raton, Florida, USA, 2009.
- [34] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6th ed., W. H. Freeman, New York, 2006.
- [35] M. Popović, *Biohemija biljaka*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2001.
- [36] D. Orčić, Vrste tribusa Scandiceae (*Apiaceae lindley* 1836, subfam. *apioideae*) potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, 2010.
- [37] R. Rodrigo, ed., *Oxidative Stress and Antioxidants-Their Role in Human Disease*, Nova Science Publishers Inc., New York, 2009.
- [38] Y. Li, ed., *Antioxidants in Biology and Medicine-Essentials, Advances and Clinical Applications*, Nova Science Publishers Inc., New York, 2011.

- [39] S.G. Rhee, Cell signaling: H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling, *Science* 312 (2006) 1882–1883.
- [40] B. D’Aur aux, M.B. Toledano, ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 813–824.
- [41] L. Pauling, The discovery of the superoxide radical, *Trends Biochem. Sci.* 4 (1979) N270–N271.
- [42] I. McCord, Joe M., Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049–6055.
- [43] J.M. McCord, I. Fridovich, The reduction of cytochrome c by hypoxanthine and xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5753–5760.
- [44] P.F. Knowles, J.F. Gibson, F.M. Pick, R.C. Bray, Electron-spin-resonance evidence for enzymic reduction of oxygen to a free radical, the superoxide ion, *Biochem. J.* 111 (1969) 53–58.
- [45] J.M. McCord, Free Radicals and Inflammation: Protection of Synovial Fluid by Superoxide Dismutase, *Science* 185 (1974) 529–531.
- [46] M.L. Salin, J.M. McCord, Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase., *J. Clin. Invest.* 56 (1975) 1319–1323.
- [47] R. Furchgott, J. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980) 373–376.
- [48] L.J. Ignarro, R.E. Byrns, G.M. Buga, K.S. Wood, Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical, *Circ. Res.* 61 (1987) 866–879.
- [49] R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327 (1987) 524–526.
- [50] D.N. Granger, G. Rutili, J.M. McCord, Superoxide radicals in feline intestinal ischemia, *Gastroenterology* 81 (1981) 22–29.
- [51] A. Dasgupta, K. Klein, *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements-Prevention and Treatment of Disease*, Elsevier Inc., San Diego; SAD, 2014.
- [52] B. Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1147–1150.

- [53] D.V. Ratnam, D.D. Ankola, V. Bhardwaj, D.K. Sahana, M.N.V.R. Kumar, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *J. Control. Release.* 113 (2006) 189–207.
- [54] Y. Steffen, C. Gruber, T. Schewe, H. Sies, Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 469 (2008) 209–219.
- [55] H.-Y. Kim, V.N. Gladyshev, Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals, *Biochem. J.* 407 (2007) 321–329.
- [56] V.C. Toreti, H.H. Sato, G.M. Pastore, Y.K. Park, Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2013 (2013) 1–13.
- [57] A.G. Hegazi, F.K. Abd El Hady, F.A.M. Abd Allah, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis, *Zeitschrift Für Naturforsch. C.* 55 (2000) 70–75.
- [58] K. Bosio, C. Avanzini, A. D'Avolio, O. Ozino, D. Savoia, In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes.*, *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (2000) 174–177.
- [59] J.M. Pezzuto, J.W. Kosmeder, E.-J. Park, S.K. Lee, M. Cuendet, J. Gills, K. Bhat, S. Grubjesic, H.-S. Park, E. Mata-Greenwood, Y. Tan, R. Yu, D.D. Lantvit, A.D. Kinghorn, Characterization of Natural Product Chemopreventive Agents, in: G.J. Kelloff, E.T. Hawk, C.C. Sigman (Eds.), *Cancer Chemoprevention*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005: pp. 3–37.
- [60] J. Yokota, Tumor progression and metastasis, *Carcinogenesis* 21 (2000) 497–503.
- [61] S. Yuspa, Overview of carcinogenesis: past, present and future, *Carcinogenesis* 21 (2000) 341–344.
- [62] Y. Zhang, B. Herman, Ageing and apoptosis, *Mech. Ageing Dev.* 123 (2002) 245–60.
- [63] P. Mehlen, D.E. Bredesen, Dependence Receptors: From Basic Research to Drug Development, *Sci. Signal.* 4 (2011) mr2.
- [64] S. Schütze, V. Tchikov, W. Schneider-Brachert, Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 655–662.
- [65] S. Ramos, Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways, *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 507–526.

- [66] N.J. Kang, S.H. Shin, H.J. Lee, K.W. Lee, Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis, *Pharmacol. Ther.* 130 (2011) 310–324.
- [67] M. Francišković, Fotohemijska karakterizacija i biološka aktivnost odabranih vrsta tribusa *Urticeae* i *Parietarieae*, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, 2015.
- [68] R. Upton, Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine, *J. Herb. Med.* 3 (2013) 9–38.
- [69] R. Kraus, G. Spiteller, Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*, *Phytochemistry*. 29 (1990) 1653–1659.
- [70] R. Kraus, G. Spiteller, Gas chromatography/mass spectrometry of trimethylsilylated phenolic glucosides from roots of *Urtica dioica*, *Biol. Mass Spectrom.* 20 (1991) 53–60.
- [71] A.R. Carvalho, G. Costa, A. Figueirinha, J. Liberal, J.A.V. Prior, M.C. Lopes, M.T. Cruz, M.T. Batista, *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities, *Food Res. Int.* 99 (2017) 485–494.
- [72] S. Otles, B. Yalcin, Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle, *Sci. World J.* 2012 (2012) 1–12.
- [73] D. Orčić, M. Francišković, K. Bekvalac, E. Svirčev, I. Beara, M. Lesjak, N. Mimica-Dukić, Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection, *Food Chem.* 143 (2014) 48–53.
- [74] J. Hudec, M. Burdová, L. Kobida, L. Komora, V. Macho, G. Kogan, I. Turianica, R. Kochanová, O. Ložek, M. Habán, P. Chlebo, Antioxidant Capacity Changes and Phenolic Profile of *Echinacea purpurea*, Nettle (*Urtica dioica* L.), and Dandelion (*Taraxacum officinale*) after Application of Polyamine and Phenolic Biosynthesis Regulators, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5689–5696.
- [75] K. Grevsen, X.C. Fretté, L.P. Christensen, Concentration and Composition of Flavonol Glycosides and Phenolic Acids in Aerial Parts of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) are Affected by Nitrogen Fertilization and by Harvest Time, *Eur. J. Hortic. Sci.* 73 (2008) 20–27.

- [76] M.A. Farag, M. Weigend, F. Luebert, G. Brokamp, L.A. Wessjohann, Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles, *Phytochemistry*. 96 (2013) 170–183.
- [77] J.L. Guil-Guerrero, M.M. Reboloso-Fuentes, M.E.T. Isasa, Fatty acids and carotenoids from stinging nettle (*Urtica dioica* L.), *J. Food Compos. Anal.* 16 (2003) 111–119.
- [78] E. Bağcı, Fatty acid composition of the aerial parts of *Urtica dioica* (Stinging nettle) L. (*Urticaceae*), in: B. Şener (Ed.), *Biodiversity*, Springer US, Boston, MA, 2002: pp. 323–327.
- [79] K. Olsen, Carotenoid Profiles of Dried Herbs, Water Infusions and Alcoholic Tinctures of Calendula Flower and Catnip, Dandelion, Stinging Nettle, and Violet Leaves, *Nat. Prod. Chem. Res.* 3 (2015).
- [80] M. Hojnik, M. Škerget, Ž. Knez, Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.), *Sep. Purif. Technol.* 57 (2007) 37–46.
- [81] Z. Kukric, L. Topalic-Trivunovic, B. Kukavica, S. Matos, S. Pavicic, M. Boroja, A. Savic, Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.), *Acta Period. Technol.* (2012) 257–272.
- [82] H. Sovová, M. Sajfrtová, M. Bártlová, L. Opletal, Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves, *J. Supercrit. Fluids.* 30 (2004) 213–224.
- [83] N.A. Yunuskhodzhaeva, V.N. Abdullabekova, K.S. Ibragimova, L.G. Mezhlumyan, Amino-Acid Composition of *Urtica dioica* Leaves and *Polygonum hydropiper* and *P. aviculare* Herbs, *Chem. Nat. Compd.* 50 (2014) 970–971.
- [84] F. Tack, M. Verloo, Metal contents in stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as affected by soil characteristics, *Sci. Total Environ.* 192 (1996) 31–39.
- [85] D. Kara, Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis, *Food Chem.* 114 (2009) 347–354.
- [86] J. Suliburska, K. Kaczmarek, Herbal infusions as a source of calcium, magnesium, iron, zinc and copper in human nutrition, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63 (2012) 194–198.
- [87] L.K. Rutto, Y. Xu, E. Ramirez, M. Brandt, Mineral Properties and Dietary Value of Raw and Processed Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.), *Int. J. Food Sci.* 2013 (2013) 1–9.

- [88] N.T. Mahlangeni, R. Moodley, S.B. Jonnalagadda, The distribution of macronutrients, anti-nutrients and essential elements in nettles, *Laportea peduncularis* susp. *peduncularis* (River nettle) and *Urtica dioica* (Stinging nettle), *J. Environ. Sci. Heal. Part B.* 51 (2016) 160–169.
- [89] N. Chaurasia, M. Wichtl, Sterols and steryl glycosides from *urtica dioica*, *J. Nat. Froa.* 50 (1987) 881–885.
- [90] S. Gül, B. Demirci, K.H.C. Başer, H.A. Akpulat, P. Aksu, Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88 (2012) 666–671.
- [91] E.S. Lapinskaya, Y.F. Kopyt'ko, Composition of the lipophilic fraction of stinging nettle (*Urtica dioica* L. and *U. urens* L.) homeopathic matrix tinctures, *Pharm. Chem. J.* 42 (2008) 699–702.
- [92] M.K. Akalin, S. Karagöz, M. Akyüz, Application of response surface methodology to extract yields from stinging nettle under supercritical ethanol conditions, *J. Supercrit. Fluids* 84 (2013) 164–172.
- [93] Z. Yener, I. Celik, F. Ilhan, R. Bal, Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 418–424.
- [94] R. Usman, A. Khan, S. Gul, A. Rauf, N. Muhammad, Preliminary Anti-Oxidant Profile of Selected Medicinal Plants of Pakistan, *Middle-East J. Med. Plants Res.* 1 (2012) 24–27.
- [95] K.K. Ghaima, N.M. Hashim, S.A. Ali, Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*), *J. Appl. Pharm. Sci.* 3 (2013) 96–99.
- [96] İ. Gülçin, Ö.İ. Küfrevioğlu, M. Oktay, M.E. Büyükokuroğlu, Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), *J. Ethnopharmacol.* 90 (2004) 205–215.
- [97] P. Akbay, A.A. Basaran, U. Undeger, N. Basaran, In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L., *Phyther. Res.* 17 (2003) 34–37.
- [98] M. Francišković, R. Gonzalez-Pérez, D. Orčić, F. Sánchez de Medina, O. Martínez-Augustin, E. Svirčev, N. Simin, N. Mimica-Dukić, Chemical Composition and Immunomodulatory Effects of *Urtica dioica* L. (Stinging Nettle) Extracts, *Phyther. Res.* 31 (2017) 1183–1191.

- [99] M.K. Turkdogan, H. Ozbek, Z. Yener, I. Tuncer, I. Uygan, E. Ceylan, The role of *Urtica dioica* and *Nigella sativa* in the prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *Phyther. Res.* 17 (2003) 942–946.
- [100] B.C. Joshi, A. Prakash, A.N. Kalia, Hepatoprotective potential of antioxidant potent fraction from *Urtica dioica* Linn. (whole plant) in CCl₄ challenged rats, *Toxicol. Reports.* 2 (2015) 1101–1110.
- [101] A. Legssyer, A. Ziyat, H. Mekhfi, M. Bnouham, A. Tahri, M. Serhrouchni, J. Hoerter, R. Fischmeister, Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. in isolated rat heart and aorta, *Phyther. Res.* 16 (2002) 503–507.
- [102] M. El Haouari, M. Bnouham, M. Bendahou, M. Aziz, A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, Inhibition of Rat Platelet Aggregation by *Urtica dioica* Leaves Extracts, *Phyther. Res.* 20 (2006) 568–572.
- [103] U.S. Harput, I. Saracoglu, Y. Ogihara, Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract, *Phyther. Res.* 19 (2005) 346–348.
- [104] B. Roschek, R.C. Fink, M. McMichael, R.S. Alberte, Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis, *Phyther. Res.* 23 (2009) 920–926.
- [105] S.S. Patel, M. Udayabanu, *Urtica dioica* extract attenuates depressive like behavior and associative memory dysfunction in dexamethasone induced diabetic mice, *Metab. Brain Dis.* 29 (2014) 121–130.
- [106] S.S. Patel, N. Mahindroo, M. Udayabanu, *Urtica dioica* leaves modulates hippocampal smoothed-glioma associated oncogene-1 pathway and cognitive dysfunction in chronically stressed mice, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 676–686.
- [107] R.E. Uncini Manganelli, L. Zaccaro, P.E. Tomei, Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L., *J. Ethnopharmacol.* 98 (2005) 323–327.
- [108] M. Bnouham, F.-Z. Merhfour, A. Ziyat, H. Mekhfi, M. Aziz, A. Legssyer, Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*, *Fitoterapia* 74 (2003) 677–681.

- [109] B. Farzami, D. Ahmadvand, S. Vardasbi, F. Majin, S. Khaghani, Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 89 (2003) 47–53.
- [110] C.F. Daher, K.G. Baroody, G.M. Baroody, Effect of *Urtica dioica* extract intake upon blood lipid profile in the rats, *Fitoterapia* 77 (2006) 183–188.
- [111] A. Mohammadi, B. Mansoori, M. Aghapour, S. Shirjang, S. Nami, B. Baradaran, The *Urtica dioica* extract enhances sensitivity of paclitaxel drug to MDA-MB-468 breast cancer cells, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 835–842.
- [112] A. Mohammadi, B. Mansoori, M. Aghapour, P.C. Baradaran, N. Shajari, S. Davudian, S. Salehi, B. Baradaran, The Herbal Medicine *Urtica dioica* Inhibits Proliferation of Colorectal Cancer Cell Line by Inducing Apoptosis and Arrest at the G2/M Phase, *J. Gastrointest. Cancer.* 47 (2016) 187–195.
- [113] A. Levy, D. Sivanesan, R. Murugan, J. Jornadal, Y. Quinonez, M. Jaffe, A. Rathinavelu, *Urtica dioica* Induces Cytotoxicity in Human Prostate Carcinoma LNCaP Cells: Involvement of Oxidative Stress, Mitochondrial Depolarization and Apoptosis, *Trop. J. Pharm. Res.* 13 (2014) 711.
- [114] Ph. Jug. IV, 4th ed., Savezni zavod za zaštitu zdravlja, Belgrade, 1984.
- [115] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents., *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144–158.
- [116] J.B. Harborne, *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant Phenolics*, Academic Press Ltd, London, 1989.
- [117] K.R. Markham, Flavones, flavonoids, and their glycosides, in: J.B. Harborne, P.M. Dey (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press Ltd, London, 1989: pp. 197–235.
- [118] A.R. Wellburn, The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.* 144 (1994) 307–313.
- [119] S. Dere, T. Günes, R. Sivaci, Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents, *Turk. J. Botany.* 22 (1998) 13–17.

- [120] B. Pavlić, A.V. Đurković, J. Vladić, A. Gavarić, Z. Zeković, A. Tepić, S. Vidović, Extraction of minor compounds (chlorophylls and carotenoids) from yarrow-rose hip mixtures by traditional versus green technique, *J. Food Process Eng.* 39 (2016) 418–424.
- [121] U.M. Gašić, M.M. Natić, D.M. Mišić, D. V. Lušić, D.M. Milojković-Opsenica, Ž.L. Tešić, D. Lušić, Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey, *J. Food Compos. Anal.* 44 (2015) 128–138.
- [122] J.C. Espín, C. Soler-Rivas, H.J. Wichers, Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 648–656.
- [123] I. Hinneburg, H.J. Damien Dorman, R. Hiltunen, Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices, *Food Chem.* 97 (2006) 122–129.
- [124] C. Delgado-Andrade, J.A. Rufián-Henares, F.J. Morales, Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 7832–7836.
- [125] M. Oyaizu, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese J. Nutr.* 44 (1986) 307–315.
- [126] P. Carter, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine), *Anal. Biochem.* 40 (1971) 450–458.
- [127] C.-K. Hsu, B.-H. Chiang, Y.-S. Chen, J.-H. Yang, C.-L. Liu, Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water, *Food Chem.* 108 (2008) 633–641.
- [128] S. Gorjanović, D. Komes, F.T. Pastor, A. Belščak-Cvitanović, L. Pezo, I. Hečimović, D. Sužnjević, Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 9573–9580.
- [129] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals, *Methods* 42 (2007) 321–324.
- [130] M.R. Baviskar, B.A.; Khadabadia, S.S.; Deore, S.L.; Shiradkar, Synthesis of clubbed triazolyl indeno [1,2-C] isoquinolines as a novel anticancer agent, *Der Pharm. Sin.* 3 (2012) 24–30.

- [131] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*. 65 (1983) 55–63.
- [132] G. Kaluderski, N. Filipović, Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda, Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, 1998.
- [133] J. Filipović, L. Pezo, V. Filipović, J. Brkljača, J. Krulj, The effects of ω -3 fatty acids and inulin addition to spelt pasta quality, *LWT - Food Sci. Technol.* 63 (2015) 43–51.
- [134] H.E. Miller, F. Rigelhof, L. Marquart, A. Prakash, M. Kanter, Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables, *J. Am. Coll. Nutr.* 19 (2000) 312S–319S.
- [135] S. Đurović, B. Pavlić, S. Šorgić, S. Popov, S. Savić, M. Pertonijević, M. Radojković, A. Cvetanović, Z. Zeković, Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches, *J. Funct. Foods*. 32 (2017) 18–26.
- [136] J. Fernández-López, A.J. Pérez-Alvarez, M. Viuda-Martos, Beneficial Health Effects of Bioactive Compounds Present in Spices and Aromatic Herbs, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry Bioactive Natural Products Vol. 37*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2012: pp. 115–134.
- [137] G. Buchbauer, Biological activities of essential oils, in: K. Baser, G. Buchbauer (Eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*, 1st ed., CRC press, Boca Raton, Florida, USA, 2009: pp. 235–280.
- [138] C.-B. Yoo, K.-T. Han, K.-S. Cho, J. Ha, H.-J. Park, J.-H. Nam, U.-H. Kil, K.-T. Lee, Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells, *Cancer Lett.* 225 (2005) 41–52.
- [139] N. Uedo, M. Tatsuta, H. Iishi, M. Baba, N. Sakai, H. Yano, T. Otani, Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats, *Cancer Lett.* 137 (1999) 131–136.
- [140] S.S. Kim, O.-J. Oh, H.-Y. Min, E.-J. Park, Y. Kim, H.J. Park, Y. Nam Han, S.K. Lee, Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells, *Life Sci.* 73 (2003) 337–348.

- [141] K.M. Arunasree, Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231, *Phytomedicine*. 17 (2010) 581–588.
- [142] A.T. Peana, P.S. D’Aquila, M.L. Chessa, M.D.L. Moretti, G. Serra, P. Pippia, (–)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain, *Eur. J. Pharmacol.* 460 (2003) 37–41.
- [143] A.T. Peana, P. Rubattu, G.G. Piga, S. Fumagalli, G. Boatto, P. Pippia, M.G. De Montis, Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (–)-linalool-induced antinociception, *Life Sci.* 78 (2006) 2471–2474.
- [144] A.T. Peana, S. Marzocco, A. Popolo, A. Pinto, (–)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound, *Life Sci.* 78 (2006) 719–723.
- [145] P.A. Batista, M.F. de P. Werner, E.C. Oliveira, L. Burgos, P. Pereira, L.F. da S. Brum, A.R.S. dos Santos, Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (–)-linalool in mice, *Neurosci. Lett.* 440 (2008) 299–303.
- [146] Y. Takahashi, N. Inaba, S. Kuwahara, W. Kuki, Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 195–7.
- [147] C.E. Elson, Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease, *J. Nutr.* 125 (1995) 1666S–1672S.
- [148] E.K. Akkol, G. Avcı, I. Küçük Kurt, H. Keleş, U. Tamer, S. Ince, E. Yesilada, Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, *J. Ethnopharmacol.* 126 (2009) 314–319.
- [149] D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Bisignano, Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2474–2478.
- [150] A.M. Ojeda-Sana, C.M. van Baren, M.A. Elechosa, M.A. Juárez, S. Moreno, New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components, *Food Control.* 31 (2013) 189–195.

- [151] H.R. Juliani, A.R. Koroch, J.E. Simon, Chemical diversity of essential oils of *Ocimum* species and their associated antioxidant and antimicrobial activity, in: F. Chemat, V.K. Varshney, K. Allaf (Eds.), *Essential Oils and Aromas: Green Extractions and Applications*, Har Krishan Bhalla & Sons, India, 2009.
- [152] H. Zengin, A. Baysal, Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy, *Molecules* 19 (2014) 17773–17798.
- [153] B.M. Adhikari, A. Bajracharya, A.K. Shrestha, Comparison of nutritional properties of stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours, *Food Sci. Nutr.* 4 (2016) 119–124.
- [154] L. Yunbo, Carotenoids, in: *Antioxidants in Biology and Medicine: Essentials, Advances and Clinical Applications*, Nova Science Publishers Inc., New York, 2011.
- [155] Y. Suzuki, K. Ohgami, K. Shiratori, X.-H. Jin, I. Ilieva, Y. Koyama, K. Yazawa, K. Yoshida, S. Kase, S. Ohno, Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, *Exp. Eye Res.* 82 (2006) 275–281.
- [156] G.-Y. Kim, J.-H. Kim, S.-C. Ahn, H.-J. Lee, D.-O. Moon, C.-M. Lee, Y.-M. Park, Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB, *Immunology.* 113 (2004) 203–211.
- [157] A. Ben-dor, M. Steiner, L. Gheber, M. Danilenko, N. Dubi, K. Linnewiel, A. Zick, Y. Sharoni, J. Levy, Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 177–186.
- [158] S. Đurović, Z. Zeković, S. Šorgić, S. Popov, M. Vujanović, M. Radojković, Fatty acid profile of stinging nettle leaves: application of modern analytical procedures for sample preparation and analysis, *Anal. Methods.* 10 (2018) 1080–1087.
- [159] V.F. Péres, J. Saffi, M.I.S. Melecchi, F.C. Abad, R. de Assis Jacques, M.M. Martinez, E.C. Oliveira, E.B. Caramão, Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth, *J. Chromatogr. A.* 1105 (2006) 115–118. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.113.

- [160] R.M. Roat-Malone, *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.
- [161] Z. Zeković, A. Cvetanović, J. Švarc-Gajić, S. Gorjanović, D. Sužnjević, P. Mašković, S. Savić, M. Radojković, S. Đurović, Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques, *Ind. Crops Prod.* 108 (2017) 423–430.
- [162] U.-J. Vajić, J. Grujić-Milanović, J. Živković, K. Šavikin, D. Gođevac, Z. Miloradović, B. Bugarski, N. Mihailović-Stanojević, Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology, *Ind. Crops Prod.* 74 (2015) 912–917.
- [163] P. Mandal, T.K. Misra, I.D. Singh, K.K. Das, M. Bhunia, Free-radical-scavenging activity in the inflorescence of European nettle/sisnu (*Urtica dioica* L.), *J. Young Pharm.* 1 (2009) 129–135.
- [164] A. Vallverdú-Queralt, O. Jáuregui, A. Medina-Remón, C. Andrés-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventós, Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2986–2992.
- [165] M.N. Clifford, K.L. Johnston, S. Knight, N. Kuhnert, Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2900–2911.
- [166] A. Plazonić, F. Bucar, Ž. Maleš, A. Mornar, B. Nigović, N. Kujundžić, Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Molecules.* 14 (2009) 2466–2490.
- [167] A. Brito, J. Ramirez, C. Areche, B. Sepúlveda, M. Simirgiotis, HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile, *Molecules.* 19 (2014) 17400–17421.
- [168] N. Fabre, I. Rustan, E. de Hoffmann, J. Quetin-Leclercq, Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 707–715.

- [169] M. Simirgiotis, Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile, *Molecules*. 18 (2013) 2061–2080.
- [170] W.M. Stöggli, C.W. Huck, G.K. Bonn, Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 524–528.
- [171] S.A. Dar, F.A. Ganai, A.R. Yousuf, M.-H. Balkhi, T.M. Bhat, P. Sharma, Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*, *Pharm. Biol.* 51 (2013) 170–180.
- [172] P. Pinelli, F. Ieri, P. Vignolini, L. Bacci, S. Baronti, A. Romani, Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L., *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9127–9132.
- [173] J.D. Everette, Q.M. Bryant, A.M. Green, Y.A. Abbey, G.W. Wangila, R.B. Walker, Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8139–8144.
- [174] A. Escarpa, M. González, Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods, *Anal. Chim. Acta.* 427 (2001) 119–127.
- [175] R. Amorati, L. Valgimigli, Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants, *Free Radic. Res.* 49 (2015) 633–649.
- [176] M. Ikawa, T.D. Schaper, C.A. Dollard, J.J. Sasner, Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1811–1815.
- [177] F.M.F. Roleira, E.J. Tavares-da-Silva, C.L. Varela, S.C. Costa, T. Silva, J. Garrido, F. Borges, Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties, *Food Chem.* 183 (2015) 235–258.
- [178] G. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso, Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sci.* 65 (1999) 337–353.
- [179] G.S. Četković, J.M. Čanadanović-Brunet, S.M. Djilas, V.T. Tumbas, S.L. Markov, D.D. Cvetković, Antioxidant potential, lipid peroxidation Inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 1013–1027.

- [180] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956.
- [181] A. Mori, C. Nishino, N. Enoki, S. Tawata, Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*. 26 (1987) 2231–2234.
- [182] M.G. Miguel, Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review., *Flavour Fragr. J.* 25 (2010) 291–312.
- [183] J.M. Čanadanović-Brunet, G.S. Četković, S.M. Djilas, V.T. Tumbas, S.S. Savatović, A.I. Mandić, S.L. Markov, D.D. Cvetković, Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts, *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 (2009) 269–278.
- [184] J.E. Jung, H.S. Kim, C.S. Lee, D.-H. Park, Y.-N. Kim, M.-J. Lee, J.W. Lee, J.-W. Park, M.-S. Kim, S.K. Ye, M.-H. Chung, Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells, *Carcinogenesis*. 28 (2007) 1780–1787.
- [185] A. Murakami, H. Ashida, J. Terao, Multitargeted cancer prevention by quercetin, *Cancer Lett.* 269 (2008) 315–325.
- [186] USDA - NAL, Dietary Reference Intakes (DRIs): Estimated Average Requirements, Food Nutr. Board Inf. Cent. (2011). <http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>.
- [187] M. de C. Sánchez-Mata, J. Tardío, eds., *Mediterranean Wild Edible Plants*, Springer New York, New York, NY, 2016.
- [188] A. Itharat, P.J. Houghton, E. Eno-Amooquaye, P.J. Burke, J.H. Sampson, A. Raman, In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer, *J. Ethnopharmacol.* 90 (2004) 33–38.
- [189] J. Ahmad, T.A.G. Langrish, Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction, *J. Food Eng.* 109 (2012) 162–174.
- [190] M. Plaza, M. Amigo-Benavent, M.D. del Castillo, E. Ibáñez, M. Herrero, Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction, *Food Res. Int.* 43 (2010) 2341–2348.

- [191] A. Modarresi-Chahardehi, D. Ibrahim, S. Fariza-Sulaiman, L. Mousavi, Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*, *Rev. Biol. Trop.* 60 (2012) 1567–76.
- [192] R. Mahmoudi, K. Amini, O. Fakhri, M. Alem, Aroma profile and antimicrobial properties of alcoholic and aqueous extracts from root, leaf and stalk of nettle (*Urtica dioica* L.), *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 4 (2015) 220–224.
- [193] S.A. Dar, A.R. Yousuf, F.A. Ganai, P. Sharma, N. Kumar, R. Singh, Bioassay guided isolation and identification of anti-inflammatory and anti-microbial compounds from *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) leaves, *African J. Biotechnol.* 11 (2012) 12910–12920.
- [194] S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *J. Chromatogr. A.* 1163 (2007) 2–24.
- [195] J.A. Paixao Coelho, A.M. Figueiredo Palavra, Supercritical fluid extraction of compounds from spices and herbs, in: T. Fornari, R.P. Stateva (Eds.), *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, Springer, New York, 2015: pp. 357–396.
- [196] S.P. Jesus, M.A.M. Meireles, Supercritical fluid extraction: A global perspective of the fundamental concepts of this eco-friendly extraction technique, in: F. Chemat, M.A. Vian (Eds.), *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*, Springer-Verlag, Berlin, 2014: pp. 39–72.
- [197] S. Đurović, S. Šorgić, S. Popov, M. Radojković, Z. Zeković, Isolation and GC Analysis of Fatty Acids: Study Case of Stinging Nettle Leaves, in: *Carboxylic Acid - Key Role Life Sci.*, InTech, 2018.
- [198] Z.-R. Yu, B. Singh, S.S.H. Rizvi, J.A. Zollweg, Solubilities of fatty acids, fatty acid esters, triglycerides, and fats and oils in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 7 (1994) 51–59.
- [199] O. Güçlü-Üstündağ, F. Temelli, Correlating the Solubility Behavior of Fatty Acids, Mono-, Di-, and Triglycerides, and Fatty Acid Esters in Supercritical Carbon Dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 4756–4766.