

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Dragana M. Stanisavljević

**Mogućnost primene ekstrakata
lekovitog i aromatičnog bilja u
proizvodnji bezalkoholnih pića**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dragana M. Stanisavljević

**The possibility of use of the extracts
of medicinal and aromatic herbs in the
production of soft drinks**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mentor:

Članovi komisije:

1.

2.

3.

4.

Datum odbrane: _____

Na ovom mestu želim da se zahvalim svima koji su mi na bilo koji način pomogli u toku izrade ovog rada:

Najveću zahvalnost dugujem profesoru dr Branislavu Zlatkoviću, dr Sofiji Đorđević i profesoru dr Draganu Veličkoviću, koji su me od početka usmeravali, davali dragocene savete i podstrek da ovaj rad dovedem do kraja. Takođe želim da se zahvalim profesoru Novici Randeloviću koji me je uveo u svet lekovitog bilja i sa kojim sam načinila svoje prve korake na terenu. Izrada ove disertacije ne bi bila moguća bez svesrdne pomoći mr Mihaila Ristića sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, profesora dr Miodraga Lazića, dr Ivane Karabegović, dr Saše Stojičevića, sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, profesorice dr Marine Milenković sa Katedre za Mikrobiologiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, te im se ovom prilikom od srca zahvaljujem.

Izrada ove disertacije ne bi bila moguća bez svesrdne pomoći porodice, te im se ovom prilikom zahvaljujem na podršci, strpljenju i razumevanju.

Želim da se zahvalim i kolegama, sa kojima sam delila dobro i zlo na terenskim i laboratorijskim ispitivanjima. Zahvaljujem se na podršci svojim prijateljima bez kojih život ne bi bio zanimljiv.

Hvala mojim roditeljima na bezgraničnoj ljubavi, podršci i strpljenju tokom celog života.

Ova disertacija je posvećena mojoj ćerki Katarini bez koje ništa ne bi imalo smisla.

Mogućnost primene ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja u proizvodnji bezalkoholnih pića

Rezime

U okviru doktorske disertacije analizirani su ekstrakti i etarska ulja sedam odabranih lekovitih i aromatičnih biljaka, u cilju odabira kvalitetnijih izolata za moguću primenu u izradi bezalkoholnih i alkoholnih pića (ledeni čaj, sirup, sok, liker).

Ispitivani su nadzemni delovi biljaka *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *Origanum vulgare* L., *Nepeta nuda* L., *Thymus serpyllum* L., *Mentha longifolia* (L.) Hudson, *Hyssopus officinalis* L. (familija Lamiaceae), kao i *Artemisia alba* Turra (familija Asteraceae), sakupljani u fenološkoj fazi cvetanja 2009. godine sa područja južne i jugoistočne Srbije. U cilju sprečavanja eventualne degradacije manje stabilnih jedinjenja, veći deo biljnog materijala je sušen na sobnoj temperaturi. Samo je herba *M. longifolia* sušena na tri različita načina i analiziran uticaj različitih tehnika sušenja na hemijski sastav i biološke aktivnosti njenih izolata. Na osnovu određenih parametara uočen je uticaj vrste sušenja na kvalitet biljnog materijala.

Etanolno vodeni ekstrakti pripremljeni su modifikovanim farmakopejskim postupkom perkolacije (ekstragens 70% etanol; odnos biljni materijal : dobijeni tečni ekstrakt 1:2), a etarska ulja su izolovana hidrodestilacijom po Klevendžeru. Za pripremu izolata korišćeni su rastvarači upotrebljivi u prehrambenoj industriji (etanol i voda).

Kako bi se odabrali biološki najkvalitetniji biljni izolati, istraživanja su obuhvatila ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata i etarskih ulja, a u ekstraktima je dodatno određen i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. Provera antioksidantne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja sprovedena je FRAP i DPPH testovima, a njihova antimikrobna aktivnost difuzionim i dilucionim testovima. Na osnovu dobijenih rezultata, formulisani su proizvodi iz grupe osvežavajućih bezalkoholnih i alkoholnih pića, koja su bila senzorno prihvatljiva.

Kontrola kvaliteta biljnih sirovina obuhvatila je osnovna hemijska ispitivanja (vlaga, pepeo), a rezultati su bili u farmakopejskim granicama, što ukazuje da su uzorci dobro pripremljeni, tj. dobro osušeni i očišćeni. Kako su isparljive komponente ekstrakata i etarskih ulja odgovorne i za aromu biljnog materijala, njihov sastav je

određen korišćenjem GC-FID i GC-MS tehnika. Analiza neisparljive frakcije ekstrakata sprovedena je HPLC tehnikom.

Antioksidantnim svojstvima hrane pridaje se veliki značaj, a uzevši u obzir činjenicu da antioksidantna aktivnost biljnih ekstrakata u velikoj meri zavisi od sadržaja fenolnih komponenata kao prirodnih proizvoda sa velikim antioksidantnim potencijalom, određen je njihov ukupni sadržaj, kao i posebno sadržaj flavonoida. Analizom ekstrakata utvrđeno je da oni mogu biti dobar izvor fenola (najveći sadržaj fenola i flavonoida prisutan je u ekstraktu biljne vrste *O. vulgare* (129,2±12,71 mg galne kis/g suvog ekstrakta, odnosno 110,7±2,47 mg rutina/g suvog ekstrakta), dok je najniži sadržaj ovih jedinjenja detektovan u ekstraktu biljne vrste *N. nuda* (40,9 mg galne kis/g suvog ekstrakta, odnosno 20,0±0,6 mg rutina/g suvog ekstrakta). Ustanovljeno je da način sušenja biljnog materijala utiče na hemijski sastav i biološke aktivnosti njihovih izolata. Tehnika sušenja ima značajan uticaj na sadržaj flavonoida u dobijenim ekstraktima, što je dokazano Takijevim testom na nivou poverenja od 95%. Najveću antioksidantnu aktivnost određenu FRAP i DPPH testom pokazali su ekstrakti herbe sušene prirodnim putem (2,76±0,15 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta, i EC₅₀=21,00±2,00 µg/ml), a najmanju ekstrakti herbe sušene u laboratorijskoj sušnici (1,13±0,21 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta i EC₅₀=36,00±4,00 µg/ml). Ekstrakt herbe sušene prirodnim putem ima najveći sadržaj ukupnih fenola (113,8±2,0 mg galne kiseline/g suvog ekstrakta) i flavonoida (106,7±0,3 mg rutina/g suvog ekstrakta).

Antimikrobna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja određena je difuzionom i mikrodilucionom metodom testiranjem na devet standardnih sojeva bakterija i dva standardna soja gljivica, poređenjem sa antibioticima (ampicilin, amikacin i nistatin). Etarsko ulje *S. kitaibelii* je u obe primenjene koncentracije (2 i 4%) bilo najaktivnije prema *B. subtilis* (190,0%, odnosno 213,3% aktivnosti ampicilina), *O. vulgare* prema *S. epidermidis* (175,0%, odnosno 220,8% aktivnosti ampicilina). Etarsko ulje *A. alba* je bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (283,3%, odnosno 300,0% aktivnosti ampicilina), dok je najveća aktivnost etarskog ulja *T. serpyllum* ispoljena prema Gram (+) bakteriji *S. aureus* (144,2%, odnosno 148,1% od aktivnosti ampicilina i od 150,0%, odnosno 154,0% aktivnosti amikacina).

Izolati herbe *M. longifolia* sušene na tri različita načina ispoljili su signifikantnu antimikrobnu aktivnost na sve testirane sojeve. Generalno, pokazuju sličnu

antimikrobnu aktivnost, što je i razumljivo zbog sličnosti u hemijskom sastavu. Najveću osetljivost na sva tri uzorka su pokazali *B. subtilis*, *M. luteus* i *E. faecalis*.

Bezalkoholna i alkoholna pića se proizvode na osnovu proizvođačkih specifikacija, a veća antioksidantna aktivnost može da poboljša kvalitet ovih proizvoda. Zahvaljujući utvrđenoj visokoj antioksidantnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata, formulisani su gotovi proizvodi koji imaju specifična ali optimalna senzorna svojstva. Ekstrakti su korišćeni u pripremi proizvoda tipa ledeni čaj, sirup, sok i liker, u količini koja zadovoljava senzorne karakteristike. Antioksidantna aktivnost krajnjeg proizvoda takođe je vrednovana, te je utvrđena najbolja receptura za dobijanje kvalitetnih proizvoda. Za pripremu ledenog čaja odabrani su ekstrakti herbe čubra *S. kitaibelii* i vranilove trave *O. vulgare*, koji su se zbog prijatnog i osvežavajućeg ukusa najbolje uklopili u senzorne karakteristike proizvoda. Zahvaljujući prijatnom mirisu, ekstrakt herbe majkine dušice *T. serpyllum* se koristio za izradu sirupa. Za proizvodnju osvežavajućeg pića korišćena je herba *M. longifolia* koja je prirodno sušena jer je ovakav način sušenja ispoljio najbolji antioksidantni kapacitet. Sastojci ekstrakta i seskviterpenska jedinjenja prisutna u herbi pelena *A. alba* su gorkog ukusa, zbog čega se proverila i pogodnost za dobijanje specifičnih pića za uživanje, kao što je liker.

Analizom gotovih proizvoda pokazano je da je najbogatiji fenolnim jedinjenjima ledeni čaj sa ekstraktom herbe *O. vulgare*, koji ujedno ima najveći sadržaj flavonoida i pokazuje najjaču antioksidantnu aktivnost. Ovaj zaključak potkrepljen je uporednim testom jednofaktorske analize varijanse. Ovakvi rezultati su očekivani, jer ekstrakt *O. vulgare* ima najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja i najveći antioksidantni kapacitet.

Ključne reči: bezalkoholna pića, sušenje, ekstrakt, etarsko ulje, ukupni fenoli, flavonoidi, antioksidantna aktivnost, antimikrobna aktivnost.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Prehrambena tehnologija

UDK: 633.88:615.451.1:678.048 (043.3)

The possibility of use of the extracts of medicinal and aromatic herbs in the production of soft drinks

Abstract

In the doctoral dissertation the extracts and essential oils of seven selected medicinal and aromatic herbs have been analyzed, in the aim of selecting high quality isolates for the possible use in the production of soft and alcoholic drinks (ice tea, syrup, juice, liqueur).

The aerial parts of the herb *Satureja kitaiibelli* Wierzb. Ex Heuff, *Origanum vulgare* L., *Nepeta nuda* L., *Thymus serpyllum* L., *Mentha longifolia* (L.) Hudson, *Hyssopus officinalis* L. (family Lamiaceae), as well as *Artemisia alba* Turra (family Asteraceae) have been analyzed and gathered in the phenol phase of blooming in 2009, from the area of the south and south east Serbia. In the aim of stopping the possible degradation of less stable compounds, the greater part of herb material was dried at room temperature. Only the herb *M. longifolia* was dried in three different ways and it was analyzed the influence of different techniques of drying on the chemical structure and biological activities of its isolates. On the basis of certain parameters the influence of the way of drying on the quality of herb material was noticed.

Ethanol water extracts were prepared by the modified pharmacopeia process of percolation (extra agent of 70% ethanol; obtained liquid extract 1:2), while the essential oils were isolated by hydro distillation according to Clevenger. The solutions used in food industry (ethanol and water) were also used for the preparation of isolates.

In order to select biologically high quality herb isolates, the research included the examination of chemical structure of extracts and essential oils, and in extracts was obtained additionally the content of total phenols and flavonoids. The check of the antioxidant activity of extracts and essential oils was conducted by FRAP and DPPH assays, and their antimicrobial activity by diffusion and delusional assays. According to the obtained results, the products from the group of fresh soft and alcoholic drinks, which were sensory accepted, were formulated.

The control of quality of herb raw materials included the basic chemical research (humidity, ashes), while the results were in the limits of pharmacopeia, which shows

that the samples were well prepared, that is to say, well dried and cleaned. Since the evaporable components of extracts and essential oils are responsible for the aroma of herb materials, their content was determined by the use of GC-FID and GC-MS techniques. The analysis of non-evaporable fraction of extracts was conducted by HPLC techniques.

Antioxidant characteristics of food have been given the great amount of importance, and taking into consideration the fact that the antioxidant activity of herb extracts greatly depends on the content of phenol components as natural products with high antioxidant potential, their total content was obtained, as well as the content of flavonoids. The analysis of extracts showed that they can be a good source of phenols (the highest content of phenols and flavonoids is presented in the extract of herb *O. vulgare* (129,2±12,71 mg of gallic acid/g of dry extract, i.e. 110,7±2,47 mg of rutin/g of dry extract) while the lowest content of these compounds was detected in the extract of herb *N. nuda* (40,9 mg of gallic acid/g of dry extract, i.e. 20,0±0,6 mg of rutin/g of dry extract). It was determined that the way of drying of herb materials has an influence on the chemical structure and biological activities of their isolates. The way of drying has a great influence on the content of flavonoids in the obtained extracts, which was proved by Taka's assay on the level of certainty of 95%. The highest antioxidant activity determined by FRAP and DPPH assays showed the extracts of the herb dried naturally (2,76± 0,15 mmol Fe/g of dry extract, and EC₅₀=21,00±2,00 µg/ml), and the lowest the extracts of herb dried in laboratory oven (1,13±0,21 mmol Fe/g of dry extract and EC₅₀=36,00 ±4,00 µg/ml). The extract of the herb dried naturally has the highest content of total phenols (113,8± 2,0 mg of gallic acid/g of dry extract) and flavonoids (106,7±0,3 mg of rutin/g of dry extract).

Antimicrobial activity of extracts and essential oils was determined by the diffusion and micro-dilution method of testing nine standard strains of bacteria and two standard strains of fungus, in comparison with antibiotics (ampicillin, amikacin and nystatin). The essential oil *S. kitaibelii* in both used concentrations (2 and 4%) was the most active towards *B. subtilis* (190,0%, i.e. 213,3% of ampicillin activity), *O. vulgare* towards *S. epidermidis* (175,0%, i.e. 220,8% of ampicillin activity). The essential oil *A. alba* was the most active towards (283,3%, i.e. 300,0% of ampicillin activity) while the highest activity of essential oil *T. serpyllum* was shown towards Gram + bacterium *S. aureus*

(144,2% i.e. 148,1 % of ampicillin activity and 150,5%, i.e. 154,0% of amikacin activity).

The isolates of herb *M. longifolia* dried in three different ways have shown the significant antimicrobial activity on the all assayed strains. Generally, they show the similar antimicrobial activity, which is considerable because of the similarity in the chemical structure. *B. subtilis*, *M. luteus* and *E. faecalis* have shown the highest sensitivity to all three samples.

Soft and alcoholic drinks are produced on the basis of productive specifications, and the higher antioxidant activity can improve the quality of these products. Thanks to the high obtained antioxidant activity of assayed extracts, the readymade products, which have specific but optimal sensory characteristics, have been formulated. Extracts have been used for obtaining products such as ice tea, syrup, juice and liqueur, in the quantity which satisfies sensory characteristics. The antioxidant activity of the final product has been valued too, thus the best recipe for obtaining high quality products has been determined. For the preparation of ice tea the extracts of herb savory *S. kitaibelii* and wild marjoram *O. vulgare* were chosen, which, because of the pleasant and fresh taste, matched the best in the sensory characteristics of the product. Thanks to the pleasant aroma, the extract of the herb thyme *T. serpyllum* was used for the preparation of syrup. For the production of fresh drinks was used herb *M. longifolia* which was dried naturally since this way of drying showed the best antioxidant capacity. The components of extracts and sesquiterpene compounds presented in herb absinthe (wormwood) *A. alba* are of bitter taste, because of which it was checked the availability for obtaining of specific drinks for pleasure , such as liqueur.

The analysis of readymade products has shown that ice tea with the extract of herb *O. vulgare* is the richest in phenol compounds, and it, at the same time, has the highest content of flavonoids and shows the strongest antioxidant activity. This conclusion has been supported by the comparative assay of one-factor analysis of variance. Such results have been expected, since the extract *O. vulgare* has the highest level of poly-phenol compounds and the highest antioxidant capacity.

Key words: soft drinks, drying, extract, essential oil, total phenols, flavonoids, antioxidant capacity, antimicrobial capacity.

Scientific field: biotechnical sciences

Narrower scientific field: food technology

UDK: 633.88:615.451.1:678.048 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cilj rada.....	4
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1. BIOLOŠKI AKTIVNA JEDINJENJA U HRANI	5
2.1.1. Antioksidantnost i antioksidanti.....	5
2.1.2. Biljni antimikrobni agensi i njihova primena u hrani i piću.....	11
2.2. LEKOVITE I AROMATIČNE BILJKE KAO IZVORI BIOLOŠKI AKTIVNIH SUPSTANCI	16
2.2.1. <i>Saturejakitaibelii</i> Wierzb. ex Heuff. – čubar	18
2.2.2. <i>Origanum vulgare</i> L. - vranilova trava	21
2.2.3. <i>Artemisia alba</i> Turra - rudinski pelen	23
2.2.4. <i>Nepeta nuda</i> L. - macina trava glatka	27
2.2.5. <i>Thymus serpyllum</i> L. - majkina dušica	29
2.2.6. <i>Mentha longifolia</i> Huds.- dugolisna nana	32
2.2.7. <i>Hyssopus officinalis</i> L. – izop	35
2.3. IZOLOVANJE BIOAKTIVNIH SUPSTANCI IZ BILJNOG MATERIJALA ..	38
2.3.1. Ekstrakti i bioaktivne supstance u ekstraktima lekovitih i aromatičnih biljaka.	40
2.3.2. Etarska ulja i bioaktivne supstance u etarskim uljima lekovitih i aromatičnih biljaka.....	46
2.3.3. Uticaj proizvodnog postupka na biološki aktivna jedinjenja	50
2.3.3.1. Uticaj načina sušenja na aktivnost biološki aktivnih supstanci	51
2.4. PREVENCIJA OKSIDATIVNOG STRESA ISHRANOM	52
2.4.1. Značaj funkcionalne hrane	54
2.4.2. Primena osvežavajućih pića.....	59
3. EKSPERIMENTALNI DEO	67
3.1. MATERIJAL	67
3.1.1. Biljni materijal	67
3.1.2. Hemikalije i reagensi	69
3.1.3. Opis eksperimenta (opšta šema)	70
3.2. METODE ISPITIVANJA	72
3.2.1. Sušenje biljnog materijala	72
3.2.2. Osnovna hemijska ispitivanja	72

3.2.3. Priprema ekstrakata	73
3.2.4. Izolovanje etarskih ulja	73
3.2.5. Hemijska analiza izolata	73
3.2.5.1. GC-FID analiza	74
3.2.5.2. GC-MS analiza	74
3.2.5.3. HPLC analiza	75
3.2.5.4. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja	76
3.2.5.4.1. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima (FC metoda)	76
3.2.5.4.2. Određivanje flavonoida u ekstraktima	77
3.2.6. Biološki testovi <i>in vitro</i>	77
3.2.6.1. Određivanje antioksidantne aktivnosti izolata	77
3.2.6.1.1. Određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP testom.....	78
3.2.6.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (DPPH test)....	79
3.2.6.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja	80
3.2.7. Priprema i analize gotovih proizvoda	82
3.2.7.1. Formulacija gotovih proizvoda	83
3.2.7.2. Ispitivanje kvaliteta, polifenolnih jedinjenja i antioksidantnih svojstava gotovih proizvoda	85
3.2.8. Statistička analiza	86
3.3. REZULTATI I DISKUSIJA	87
3.3.1. Osnovni hemijski sastav biljnog materijala	88
3.3.2. Prinos etanolno-vodenih ekstrakata.....	88
3.3.3. Sadržaj etarskih ulja u biljnom materijalu	89
3.3.4. Sastav isparljive frakcije ekstrakata i etarskih ulja	92
3.3.5. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima	112
3.3.6. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima.....	113
3.3.7. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja	116
3.3.8. Uticaj načina sušenja na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima.	125
3.3.9. Uticaj načina sušenja na antioksidantnu aktivnost ekstrakata i etarskih ulja.	126
3.3.10. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima <i>M. longifolia</i>	132
3.3.11. Antimikrobna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja	133
3.3.12. Karakterizacija formulisanih gotovih proizvoda	147

3.3.12.1. Senzorna ocena kvaliteta gotovih proizvoda.....	148
3.3.12.2. Hemijska analiza gotovih proizvoda.....	157
3.3.12.3. Ukupna fenolna jedinjenja i flavonoidi gotovih proizvoda.....	158
3.3.12.4. Antioksidantna aktivnost gotovih proizvoda.....	158
4. ZAKLJUČAK.....	169
5. LITERATURA.....	172

PRILOG

1. UVOD

Različiti nivoi civilizacijske svesti tokom istorije uslovljavaju i različite zahteve za vrstom i kvalitetom hrane kao egzistencijalnom potrebom ljudi. Za upotrebu u ljudskoj ishrani, zaštita kvaliteta i bezbednost hrane, kao i kvalitetan način ishrane, centralno je pitanje. Od njega zavisi ne samo život pojedinaca, već i opstanak vrsta i života na zemlji. Kontrola kvaliteta i upravljanje kvalitetom i bezbednošću hrane su zato podignuti na visok nivo kolektivne svesti i odgovornosti. Odgovarajuće međunarodne, nacionalne pa i lokalne institucije prihvataju saznanje o svojoj odgovornosti prema ljudima i životinjama. Zato se definišu procedure proizvodnje i kontrole hrane. Ipak, na osnovu saznanja o potrebama organizma i sastava pojedinih neprerađenih namirnica, razvijen je sistem piramide ishrane i piramide unosa tečnosti, ali i metoda za definisanje idealne telesne mase (građe organizma).

Regulisanju oblasti hrane i nadzoru nad tim sektorom okreću se detaljno politike, planovi, programi i zakonodavstvo društva. U ovim aktivnostima centralno mesto zauzima potrošač, koji ima pravo na kvalitetnu, zdravu i bezbednu hranu, kao i na sve neophodne informacije o njenom sastavu, načinu i posledicama upotrebe na njega i njegovo potomstvo. Osim navedenog postoje još dva ne manje bitna aspekta za potrošača: cena i zaštita od obmane. Uz više ili manje marketinških akcija, na tržištu se stalno, pojavljuju proizvodi različitih zvučnih naziva i oznaka: „zdrava hrana“, „eko hrana“, „zelena jabuka“, i dr. Ono što u osnovi treba znati je da hrana može da bude funkcionalna, nova i organski proizvedena. Sa stanovišta kvaliteta ishrane posebno se potencira primena tradicionalne ishrane za neki (za svaki) region na planeti. Ipak, danas je to veoma teško, jer tradicionalna ishrana iz raznih razloga je sve manje održiva. Zato se na tržištu javljaju i neki novi proizvodi.

Za funkcionalnu hranu ne može se reći da predstavlja samo novi trend u prehrambenoj industriji, već je to koncept koji uspostavlja novu vezu između ishrane i zdravlja. Biljni aktivni sastojci u funkcionalnim proizvodima su nosioci različitih aktivnosti (antioksidantna, antimikrobna, imunostimulirajuća, deluju povoljno na organe za varenje, disanje, izlučivanje itd.), ali utiču i na senzorna svojstva prehrambenog proizvoda. Prema službenoj definiciji EU, nova hrana („*novel food*“) predstavlja hranu ili ingredijente hrane koji se ranije nisu konzumirali u značajnom stepenu. Ovakav tip hrane treba posmatrati kao ispunjenje ostalih zahteva potrošača za sve boljim

kvalitetom, pogodnijim načinom konzumiranja, tj. za zadržavanjem kvaliteta u što dužem vremenskom periodu. Nova hrana zapravo poseduje osobine koje podsećaju na sveže i prirodno stanje hrane. Organska hrana je proizvedena, prerađena i/ili iznešena na tržište u saglasnosti sa odnosnim međunarodnim standardima, koja potiče iz organske poljoprivrede.

Poznato je da zdravlje organizma zavisi od kvaliteta ishrane i od unosa bitnih mikronutrijenata. Na žalost, danas sve manje unosimo ove supstance jer smo promenili način života i ishrane. Čovek je te mikronutrijente unosio u organizam korišćenjem biljne hrane koju je dobijao iz prirode. O tome najčešće govore zdravstveni radnici jer se zdravlje direktno dovodi u vezu sa kvalitetom hrane i ishrane. Često se citira stav oca medicine koji je uveo ekvivalenciju: „neka nam hrana bude kao lek, a lek kao hrana“. Ovakva identifikacija hrane i leka u njegovo vreme i nije bila pogrešna. Šta više, bila je logična jer se i hrana i lek zajedno uzimaju iz prirode. Danas, ovaj stav ne može da bude opravdan jer je upotrebna vrednost lekova sasvim definisana, a njihovo korišćenje potpuno ograničeno.

Selekcijom biljaka i životinja, od bioloških dobijene su poljoprivredne nauke. Mnoge biljne autohtone vrste modifikovane su u nove koje su sada sa boljim (prihvatljivijim) senzornim karakteristikama, ali na račun smanjenja prirodne nutritivne vrednosti. Voće i povrće danas nije tako trpkno, već slatko, nije čvrsto, već mekano i sočno. Od familije trava stvorili smo žitarice koje smo postavili u osnovu piramide ishrane. Iz svih tih razloga naša ishrana više nije toliko raznovrsna. Manje se koristi dobro poznato začinsko bilje, a sve značajnije mesto u proizvodnji hrane zauzimaju veštački dobijeni aditivi. Često govorimo o ekologiji kao nauci vezano za očuvanje životne sredine, a sve manje o ekologiji hrane i ishrane.

Iz navedenih razloga nam sve više nedostaju neki mikronutrijenti koje smo unosili kada smo koristili raznovrsnu biljnu ishranu. Sa druge strane, sada je hrana sve ujednačenija (siromašnija), što se i odražava na različite posledice nepravilne ishrane: gojaznost, hipertenziju, dijabetes i sl.

Posebno je važno, a sve češće se na tome insistira, da se uveća unos antioksidanata. Oni su neophodni da se spreči starenje ćelija tj. razaranje ćelijskih membrana usled nagomilanog prisustva slobodnih radikala koji nastaju nepotpunom oksidacijom različitih nutrijenata. Istraživanja pokazuju da su aromatične biljke značajni

antioksidanti, odnosno nepresušan izvor biološki aktivnih jedinjenja koja imaju sposobnost da inhibiraju štetne oksidacione procese kako u živoj ćeliji tako i u različitim neživim biološkim sistemima i supstratima.

Različiti delovi biljaka (koren, list, cvet, plod, stabljika, kora) svojim antioksidantnim delovanjem utiču na mnoge fiziološke procese u organizmu, te na taj način štite od slobodnih radikala i razvoja nepoželjnih mikroorganizama. Proizvodi koji se masovno konzumiraju, poput sokova i napitaka, mlečnih proizvoda, hleba, mesa, prerađenog povrća, znatno bi doprineli boljem zdravlju, ako bi se proizvodili kao funkcionalna hrana, uz dodatak antioksidanata prirodnog porekla. Antimikrobna svojstva etarskih ulja i biljnih ekstrakata od velike su važnosti za mnoge industrije (prehrambena, kozmetička, farmaceutska) kao moguća zamena sintetičkih konzervanasa prirodnim, zbog rezistentnosti bakterija na veliki broj antibiotika, ali i sposobnosti biljaka da sintetišu biološki aktivne materije.

Savremeni uslovi života i ishrane zahtevaju od proizvođača hrane da se na tržištu ponudi proizvod sa lakom pripremom tj. brzim korišćenjem – čak i kada se hrana koristi u kućnim uslovima. U tom cilju sve veću primenu imaju neki proizvodi, ali i pića za osveženje i uživanje. Primena ekstrakata aromatičnog i lekovitog bilja i etarskih ulja ovde nesumnjivo može da ima značajnu ulogu – pogotovu ako se prethodno dobro pripremi i optimizira njihov hemijski sastav.

1.1. CILJ RADA

Ovaj rad je osmišljen tako da se izvrši hemijska karakterizacija etanolno-vodenih ekstrakata i etarskih ulja herbi lekovitog i aromatičnog bilja sa područja južne i jugoistočne Srbije, a zatim, da se pomoću *in vitro* testova, odredi njihov antioksidantni kapacitet i antimikrobna aktivnost. Na osnovu takvih saznanja izvršiće se i optimizacija pripreme pića za osveženje i uživanje. Kvalitet dobivenih proizvoda će se proveriti (testirati) senzornom ocenom.

Polazeći od pretpostavke da bi biljni izolati ispitivanog lekovitog i aromatičnog bilja mogli da se iskoriste u formulaciji funkcionalnog napitka koji ispoljava prihvatljive senzorne karakteristike, a uzimajući u obzir sve napred navedene relevantne faktore, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći **zadaci**:

- dobijanje informacija o opštem kvalitetu biljnih vrsta (*Satureja kitaibelii*, *Origanum vulgare*, *Nepeta nuda*, *Thymus serpyllum*, *Mentha longifolia*, *Hyssopus officinalis* (familija Lamiaceae), kao i *Artemisia alba* iz familije Asteraceae) na osnovu sadržaja važnih parametara (vlaga, ukupni pepeo, pepeo nerastvoran u HCl).

- ispitivanje prinosa, hemijskog sastava ekstrakata i etarskih ulja herbi sedam vrsta sakupljenih sa različitih lokaliteta južne i jugoistočne Srbije, a u cilju procene kvaliteta pripremljenih uzoraka kao potencijalne sirovine za funkcionalna pića.

- identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja i isparljivih terpenoida u izolatima ispitivanih biljnih vrsta, kako bi se izvršila hemijska karakterizacija ispitivanih vrsta.

- ispitivanje potencijalne antioksidantne i antimikrobne aktivnosti ispitivanih izolata, radi utvrđivanja njihove moguće primene u industriji bezalkoholnih i alkoholnih pića.

- razmatranje uticaja različitih uslova sušenja herbe *M. longifolia* na hemijski sastav ekstrakata i etarskog ulja, njihove antioksidantne i antimikrobne aktivnosti.

- priprema gotovog proizvoda sa željenim biološkim svojstvima, tako što se osnovnim sirovinama u odgovarajućoj količini i obliku dodaju lekovite i aromatične biljne sirovine. Ovim obogaćivanjem sastava, gotov proizvod pored svoje nutritivne vrednosti pokazuje i jednu novu dimenziju pozitivne uloge na zdravlje ljudi.

- ispitivanje senzornih karakteristika i antioksidantne aktivnosti novih proizvoda, kako bi se odabrala najbolja formulacija za njihovo dobijanje.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. BIOLOŠKI AKTIVNA JEDINJENJA U HRANI

Zahvaljujući prisustvu jedne ili više komponenti (biološki aktivnih jedinjenja), veliki deo funkcionalne hrane poseduje osobine sa povoljnim fiziološkim efektima (Robertfroid, 2001). Biološki aktivno jedinjenje može biti makronutrijent (rezistentni škrob ili ω -3 masna kiselina), mikronutrijent (mineral ili vitamin), neesencijalni sastojak hrane koji poseduje određenu energetska vrednost (konjugovana linolna kiselina, oligosaharidi, likopen, biljni sterol). Kao funkcionalni sastojci pominju se i neke fitohemikalije (izoflavoni, fitoestrogeni, sulforafan) ili živi mikroorganizmi (probiotici). U digestivnom traktu se nakon konzumiranja funkcionalne namirnice oslobađa biološki aktivno jedinjenje, koje deluje na mestu oslobađanja (probiotik, dijetno vlakno) ili se resorbuje i distribuira do ciljnih tkiva, gde ispoljava povoljno dejstvo. U funkcionalnoj namirnici biološki aktivno jedinjenje mora biti prisutno u količini za koju je pokazan povoljni efekat.

Biljna hrana sadrži pored minerala i vitamina i veliki broj drugih organskih jedinjenja koja imaju svojstvo antioksidanata što je i naučno dokazano. Mišljenje mnogih stručnjaka je da upravo ta jedinjenja utiču pozitivno na zdravlje. Višestruko je istaknut značaj i funkcija antioksidanata u prevenciji mnogih bolesti. Zbog potvrđenih toksičnih efekata sintetskih antioksidanata opšti trend u svetu je iznalaženje prirodnih izvora za njihovo dobijanje. Novija istraživanja takođe ukazuju na visok sadržaj prirodnih antioksidanata u biljkama (Keli *et al.*, 1996; Croft, 1999).

2.1.1. Antioksidantnost i antioksidanti

Jedan od najznačajnijih procesa koji se odvija u hrani je oksidacija koja dovodi do pogoršanja njenog kvaliteta, odnosno kvarenja. Oksidacioni procesi koji se odvijaju u prehrambenim proizvodima su jedan od uzroka ograničenja njihovog roka trajanja. Slobodni radikali kao i ostali produkti oksidacije lako reaguju sa pigmentima, vitaminima, amino kiselinama i proteinima što utiče na promenu biološke i nutritivne vrednosti namirnice (Frankel, 1984).

Kako u biološkim sistemima, tako i u lipidima prehrambenih proizvoda procesi oksidacije su uvek prisutni i ne mogu se zaustaviti, već samo donekle usporiti. Reakcije

oksidacije se ubrzavaju porastom temperature, delovanjem svetlosti, tragova metala i pigmentata. U cilju sprečavanja i usporavanja oksidacionih procesa u mnogim prehrambenim proizvodima primenjuju se postupci smrzavanja, poboljšavanja higijenske obrade i metoda pakovanja. Često to nije dovoljno, tako da se u toku procesa proizvodnje prehrambenim proizvodima dodaju antioksidanti – specifični aditivi koji inhibiraju reakcije oksidacije. Antioksidanti koji su se prvi koristili za konzervisanje hrane su bili začini.

Sa aspekta prehrambene industrije supstance koje produžavaju rok trajanja hrane, sprečavanjem oksidacionih procesa koji pogoršavaju njen kvalitet su antioksidanti (Pokorny *et al.*, 2001). U prehrambenim proizvodima peroksidacija *in vitro* se prvenstveno usporava primenom antioksidanata. Međutim, primena antioksidanata, posebno prirodnog porekla, ima znatan uticaj i na usporavanje procesa oksidacije *in vivo* i sprečavanje pojava kardiovaskularnih oboljenja, kancerogenih oboljenja, alergija itd. (Halliwell i Gutteridge, 1989).

Američka uprava za hranu i lekove (US FDA) antioksidante definiše kao konzervanse, prehrambene aditive, koji sprečavaju proces kvarenja hrane, odnosno užeglost masti i diskoloracije izazvane oksidacijom. Uloga antioksidanata se ogleda u „vezivanju“ slobodnih radikala. Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji u svojoj strukturi imaju jedan ili više nesparenih elektrona i problem nastaje kada pri primopredaji elektrona u redoks reakcijama dođe do hiperprodukcije radikalskih vrsta koje nemaju potpuno sparene elektrone. Elektroni koji su nespareni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti (Halliwell i Gutteridge, 1999). Oni mogu nastati elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, termolizom, hemijskim procesima i enzimskim procesima (Acworth, 2003). Slobodni radikali mogu biti neutralni, ali i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani. Nespareni elektron može se nalaziti na C-atomu, kao kod alkil radikala ($\cdot\text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$), na O-atomu, kao kod alkoksil-, hidroksil-, peroksil- i superoksid anjon radikala ($\text{RO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$), na N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala ($\text{NO}\cdot$) ili na S-atomu, kao kod radikala ($n\text{-C}_6\text{H}_9\text{S}\cdot$) i dr. Nespareni elektron imaju i atom vodonika ($\text{H}\cdot$) i halogena ($\text{Cl}\cdot$), alkalni metali ($\text{Na}\cdot$) i neki joni metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}) (Piletić *et al.*, 1992). Na osnovu relativne stabilnosti, slobodni radikali se dele na nepostojane („kratkoživeće“) i postojane („dugoživeće“). Stabilnost slobodnih radikala predstavlja termodinamičku

karakteristiku koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron (Čanadanović-Brunet, 1998). Reaktivne vrste kiseonika (ROS) su opšti termin koji uključuje i kiseonikove radikale i određene neradikalske vrste koje su oksidativna sredstva i/ili se lako prevode u radikale (HOCl, HOBr, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂) (Halliwell i Whiteman, 2004).

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) i azota (RNS) su endogeni intermedijeri koji neprekidno nastaju u živim ćelijama i imaju esencijalnu ulogu u regulaciji fizioloških procesa. Oni su jedinjenja koja učestvuju u signalizaciji ćelijskih funkcija i narušavanje oksidoreduktivne ravnoteže dovodi do oksidativnog stresa i time do patoloških manifestacija (Vaya i Aviram, 2001). Savremena biomedicinska i biohemijska istraživanja su nedvosmisleno dokazala da je nekontrolisana produkcija slobodnih radikala u humanom organizmu uzrok brojnih patoloških stanja kao što su: starenje, kardiovaskularna, neurološka oboljenja, kancerogeneza itd. (Halliwell i Gutteridge, 1999). Smatra se da slobodni radikali izazivaju čitav niz poremećaja i patogeneza. Sa napretkom istraživanja ROS i RNS, otkriveno je da oni učestvuju u brojnim biološkim funkcijama. Oksidativni stres može izazvati oksidaciju lipida i proteina i time dovesti do promena njihove strukture i funkcije. ROS/RNS uzrokuju oštećenja DNK što je povezano sa razvojem malignih oboljenja, kardiovaskularnih bolesti, neuroloških poremećaja i bolesti pluća. Smatra se da je starenje organizma uzrokovano stalnom izlaganju organa negativnom uticaju ROS/RNS tokom života, istovremeno sa opadanjem antioksidantnog potencijala. Oksidacioni stres može kako je i poznato dovesti i do karakterističnih mutacija koje mogu inicirati različite patološke procese u organizmu (De Flora *et al.*, 2005). Kako su oksidativni procesi uzrok promene kvaliteta hrane kao i raznih prehrambenih i kozmetičkih proizvoda u industriji pomenutih proizvoda sve više se koriste antioksidanti - jedinjenja koja na različite načine sprečavaju ili usporavaju oksidacione procese.

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da (Čanadanović-Brunet, 1998):

- deluju kao „hvatači“ („skevindžeri“) slobodnih radikala
- doniraju elektrone
- kompleksiraju jone metala (čime je onemogućena kataliza reakcije stvaranja inicijatora oksidacije lipida) (Vaya i Aviram, 2001)

- razgrađuju hidro-perokside lipida koji su nastali u fazi propagacije
- eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika (Pokorny, 2001)
- inhibiraju neke enzime
- pokazuju sinergetske efekte
- redukuju neka jedinjenja (Halliwell, 1994).

Nutritivni antioksidanti doprinose uspostavljanju oksidoreduktivne ravnoteže u organizmu (Vaya i Aviram, 2001). Čelije se štite od toksičnog dejstva slobodnih radikala brojnim endogenim proteinima, enzimima i neproteinskim biomolekulima, koji zajedno čine antioksidantni sistem (Đorđević *et al.*, 2000). Usled nepotpune efikasnosti našeg endogenog odbrambenog sistema i pri postojanju nekih spoljnih agenasa i fiziopatoloških stanja (dim cigarete, zagađenje vazduha, pojačano UV zračenje, neki zapaljenski procesi, ishemija, stres, itd.) u kojima su reaktivne radikalske vrste proizvedene u višku i u pogrešno vreme na pogrešnom mestu, neophodni su dodatni antioksidanti (egzogeni antioksidanti tj. oni koje treba uneti hranom) da bi smanjili kumulativni efekat oksidativne štete za vrlo kratko vreme (Pietta, 2000). Ishrana bogata biljkama doprinosi smanjenju rizika od razvijanja ovih bolesti, zahvaljujući mnoštvu antioksidanata (askorbat, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi), koji su prisutni u njima (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Najčešće se u prehrambenoj industriji koriste sintetički antioksidanti, kao što su butilovani hidroksitoluen-BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol), butilovani hidroksianizol - BHA (smeša izomera 2-*terc*-butil-4-hidroksianizola i 3-*terc*-butil-4-hidroksianizola), propilgalat (PG) i *terc*-butilhidrohinon (TBHQ) zbog visoke efikasnosti, cene i stabilnosti. Njihova primena je danas strogo ograničena i definisana zakonskim regulativama (*Pravilnik o kvalitetu i uslovima upotrebe aditiva u namirnicama i o drugim zahtevima za aditive i njihove mešavine „Sl. list SCG“, br 56/2003, 4/2004 – dr. Pravilnik, 5/2004- ispr. I 16/2005* i Codex General Standard for Food Additives (GSFA, Codex STAN 192-1995)). Dokazano je da sintetski antioksidanti koji su prethodno navedeni u određenim uslovima i koncentracijama mogu delovati kao mutageni i dovesti do razvoja kancerogenih procesa (Namiki, 1990).

Zakonska ograničenja u pogledu primene sintetičkih antioksidanata koja su rigorozna sa jedne i sve veći zahtevi potrošača za zamenom sintetičkih aditiva

prirodnim sa druge strane, doveli su do porasta interesa za primenom antioksidanata biljnog porekla u prehrambenoj industriji, kao i do razvoja novih tehnologija za izolovanje biljnih ekstrakata u što čistijem stanju. Upotreba sintetskih antioksidanata u novije vreme iz toksikoloških razloga se napušta u prehrambenoj industriji, a interes za primenu prirodnih antioksidanata stalno raste te su sve veći zahtevi usmereni ka izolovanju, ispitivanju i korišćenju prirodnih antioksidanata (Velioglu *et al.*, 1998).

Danas su izučavanja antioksidantnih aktivnosti aromatičnih biljaka i njihovih ekstrakata veoma intenzivna. Konvencionalni postupci za dobijanje antioksidantnih ekstrakata iz začinskog bilja za primenu u prehrambenoj industriji, bazirani su na selektivnom izdvajanju jedinjenja sa antioksidantnom aktivnošću ekstrakcijom organskim rastvaračima, uljima, vodom, alkalijama u kombinaciji sa ostalim separacionim metodama kao što su filtracija, destilacija, adsorpcija, centrifugiranje i dr. Najnovija istraživanja usmerena su ka pronalaženju prirodnih antioksidanata, izolovanih iz biljnog materijala, koji mogu imati širok spektar dejstva *in vitro* i *in vivo*, a toksične efekte koji se mogu javiti kod sintetičkih supstanci ne ispoljavaju. Na veću efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih antioksidanata, izolovanih iz biljaka (fitonutrijenti), mikroorganizama, gljiva i životinjskog tkiva ukazuju mnoge naučno-istraživačke studije (Moyer *et al.*, 2002). Biljne vrste familije Lamiaceae, poput izopa, timijana, origana, žalfije, ruzmarina i dr. poznate su po svojim antioksidantnim svojstvima (Terens *et al.*, 1995). Ispitivanjima antioksidantne aktivnosti ekstrakata iz biljnih vrsta familije Lamiaceae pokazano je da su antioksidantna dejstva pomenutih biljnih vrsta ekvivalentna (Đarmati *et al.*, 1991) ili jača od sintetskih antioksidanata (Nguyen *et al.*, 1991).

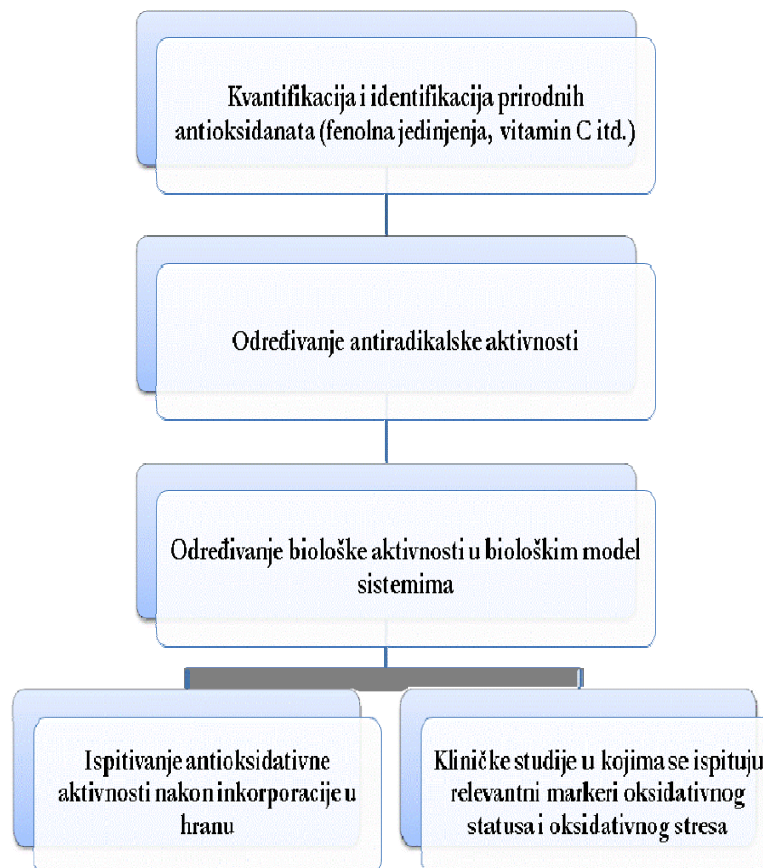
Prirodni antioksidanti mogu biti fenolne komponente (fenolne kiseline, flavonoidi, tokoferoli), azotne komponente (derivati hlorofila, alkaloidi, aminokiseline i amini), karotenoidi ili askorbinska kiselina (Velioglu *et al.*, 1998), steroli i fosfolipidi (Choe i Min, 2009). Značajnu grupu prirodnih antioksidanata čine biljni sekundarni metaboliti koje čine biljni fenoli (fenolne kiseline, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, antocijani, proantocijanidini, tanini itd.), glukozinolati, terpenoidi, tokoferoli, kao i jedinjenja koja sadrže sumpor, koji pored antioksidantnih poseduju i antikancerogena, antimutagena, anti-inflamatorna i antimikrobna svojstva, a takođe smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja.

Istraživanja su pokazala da su polifenoli dobri „hvatači“ slobodnih radikala, a time imaju važnu ulogu u prehranbenoj i farmaceutskoj industriji kao lekovi i antioksidanti. Pored veoma širokog spektra farmakološkog delovanja na ljudski organizam, flavonoidi i tanini ispoljavaju i značajnu antioksidantnu aktivnost. Polifenolna jedinjenja mogu da neutrališu kiseonikove radikale.

U prehranbenoj industriji prirodna polifenolna jedinjenja se koriste za poboljšanje senzornih osobina i za povećanje, odnosno očuvanje biološke vrednosti hrane, u toku tehnoloških postupaka proizvodnje i skladištenja (Čanadanović-Brunet, 1998). Polifenolna jedinjenja imaju višestruki uticaj na osobine hrane, i to na: *boju, ukus, antioksidantnu aktivnost, antimikrobnu aktivnost*.

Za efikasno suzbijanje štetnog delovanja slobodnih radikala veliki značaj imaju antioksidanti koji se unose putem ishrane, kao što su vitamin C, vitamin E, karotenoidi i polifenolna jedinjenja biljnog porekla (Dorman *et al.*, 2004). Uloga biljaka u prevenciji i lečenju bolesti pripisuje se delimično antioksidantnim svojstvima njenih sastojaka – liposolubilnim vitaminima A i E, hidrosolubilnom vitaminu C, ali i velikom broju polifenolnih jedinjenja. Voće, povrće, začinsko i lekovito bilje, žitarice i druge namirnice biljnog porekla, kao i njihovi ekstrakti, sadrže prirodne antioksidante: polifenolna jedinjenja, vitamine (vitamin C, vitamin E), terpene, što potvrđuju istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine.

Antioksidantne supstance prirodnog porekla sve više se koriste kao aditivi u formulisanju tzv. funkcionalne hrane zbog potvrđenih bioloških svojstava i stanovišta da treba upotrebu sintetičkih aditiva svesti na minimum. Pre upotrebe antioksidanata neophodno je izvršiti njihovo testiranje da bi se isti uspešno aplicirali kao prehranbeni aditivi. U hrani antioksidanti imaju dvojaki značaj: kao aditivi za očuvanje stabilnosti hrane i kao izvori esencijalnih antioksidanata *in vivo*. Protokol za testiranje antioksidanata pre upotrebe u hrani prikazan je na slici 1 (Becker *et al.*, 2004).



Slika 1. Protokol za testiranje antioksidanasa (Becker *et al.*, 2004)

2.1.2. Biljni antimikrobni agensi i njihova primena u hrani i piću

Prehrambene namirnice mogu da sadrže različite vrste mikroorganizama za koje je dokazano da su izazivači kvarenja hrane kao i različitih vrsta oboljenja. Proizvođači hrane iz tog razloga primenjuju različite tretmane obrade namirnica u cilju uništavanja mikroorganizama ili sprečavanja njihovog rasta. U tu svrhu upotreba veštačkih konzervanasa je vrlo zastupljena. Međutim, rezultati skorijih istraživanja govore o kontraverznosti upotrebe konzervanasa. U vezu sa pojavom pojačane hiperaktivnosti kod dece dovodi se natrijum benzoat, dok je u vezu sa pojavom oboljenja pluća dovedena upotreba natrijum nitrita.

Usled sve većeg broja naučnih radova koji ukazuju na štetnost korišćenja sintetičkih konzervanasa u procesima obrade hrane javila se tendencija pronalaska njihove alternative. Povećanje aktivnosti poznatih konzervanasa uz istovremeno smanjenje njihove koncentracije je svakako jedan od načina, ali i njihovo kombinovanje

sa biološki aktivnim prirodnim proizvodima. Ispitivanje i primena sekundarnih metabolita biljaka koje poseduju antimikrobnu i antioksidantnu aktivnost u vezi sa tim posebno je značajna. Ove biljke najčešće sadrže aktivne supstance iz grupa polifenola, fenola, esencijalnih ulja, terpenoida, alkaloida, a mogu da se koriste u ishrani kao dodaci aromi ili ukusu namirnica, kao i u tradicionalnoj medicini.

Interesovanje za primenu biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji posebno je naglašeno od trenutka kada je Evropska komisija za bezbednost hrane dozvolila upotrebu ekstrakta herbe ruzmarina kao antioksidanta u prehrambenoj industriji. Novija istraživanja su pokazala da se biljni ekstrakti mogu koristiti kao alternativa veštačkim konzervansima kao što je askorbinska kiselina i butilhidroksitoluen.

Poznavanje vrsta plesni, njihovih karakteristika, kao i odnosa prema faktorima koji im mogu stimulisati ili inhibirati razvoj, bitno je u cilju sprečavanja negativnog uticaja koje one mogu imati kao kontaminanti hrane. Najčešće se u cilju smanjenja rasta plesni, a samim tim i produkcije mikotoksina, primenjuju hemijska sredstva, sa ili bez kombinacije sa nekom od fizičkih metoda. Današnji potrošači međutim, imaju visoke zahteve u cilju dobijanja hrane minimalno tehnološki obrađene i bez sintetičkih konzervanasa i aditiva, zbog eventualnih neželjenih efekata na zdravlje. Iz tog razloga, industrija hrane je usmerena danas ka traženju rešenja kako da kriterijume potrošača u potpunosti zadovolji, a da hrana za upotrebu pri tome bude bezbedna. Mogućnost primene prirodnih antimikrobnih agenasa poput ekstrakata, etarskih ulja, komponenata začina i drugih aromatičnih biljaka, mogla bi da bude od velikog značaja u rešavanju ovih problema. Pomenuta jedinjenja mogu biti korisna u ograničavanju ili sprečavanju razvoja štetnih plesni kao dodaci u hrani, kao površinska zaštita, ili primena kod proizvoda koji su pakovani u modifikovanoj atmosferi. Ovo se pre svega odnosi na proizvode kratkog roka trajanja, zbog problema vezanih za njihovu distribuciju. Upotreba agenasa poreklom iz biljaka ima prednosti u odnosu na sintetičke konzervanse jer nije štetna po zdravlje ljudi, a istovremeno doprinosi poboljšanju senzornog kvaliteta proizvoda. Veliki broj metoda se koristi za antifungalnu i antimikotoksigenu zaštitu, ali svaka od njih ima određene nedostatke, a primenu u praksi neke čak i nemaju. U pojedinim slučajevima primena fizičkih metoda menja nutritivna i senzorna svojstva proizvoda, ili je tehnički neizvodljiva i/ili ekonomski neopravdana. Veliki procenat hranljivih materija gubi se ekstrakcijom mikotoksina organskim rastvaračima ili uljima

iz hrane, pa se zato dekontaminirana hrana može koristiti samo za ishranu životinja. Za nastanak rezidua koji su kancerogeni odgovorni su pesticidi. Reaktivni molekuli kiseonika koji izaziva oksidaciju proteina, nukleinskih kiselina, lipida i podstiče sintezu aflatoksina stvaraju sintetički konzervansi. Oksidacija lipida uzrokuje užeglost, promenu boje i teksture proizvoda (Prakash *et al.*, 2011). Na ukus proizvoda mogu uticati parabeni. Visoke koncentracije sumpor dioksida razgrađuju vitamin B₁ i stvaraju neprihvatljiv ukus hrane (FDA je zabranila njegovu upotrebu za zaštitu sirovog voća i povrća) (Taylor i Bush, 1986). Pretpostavlja se da pored kvalitativnih promena hrane mnogi sintetički konzervansi ispoljavaju toksične efekte na zdravlje ljudi (pojavu asmatičnih napada uzrokuje npr. sumpor dioksid) (Burt, 2004).

Zbog svega napred navedenog, tokom poslednjih godina vrše se opsežna ispitivanja na primeni etarskih ulja, ekstrakata i oleorizina ekstrahovanih iz začina i drugih aromatičnih biljaka, kao alternativnih konzervanasa za produženje održivosti hrane (Selvi *et al.*, 2003; Kocić-Tanacov *et al.*, 2011a, 2012a).

Za antibakterijsko i antifungalno delovanje aromatičnih biljaka i začina odgovorne su njihove aktivne komponente koje su sastavni deo ekstrakata ili etarskih ulja. Etarska ulja timijana (*Thymus vulgaris*), Lavandula vrsta (*L. latifolia*, *L. angustifolia*), Salvia vrsta (*S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. lavandulifolia*), izopa (*Hyssopus officinalis*), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i čubra (*Satureja montana*), u malim koncentracijama deluju na patogene u konzerviranim namirnicama, tako da bi ona mogla da se koriste kao zamena konvencionalnim aditivima (konzervansima) (Rota *et al.*, 2004).

Vekovima unazad poznat je antimikrobni efekat etarskih ulja, a poslednjih par decenija intenzivno se proučava. Od svog otkrića u dvadesetom veku sintetički antibiotici, streptomycin, penicilin, i drugi, su značajno uticali na smanjenje rizika od pojave zaraznih bolesti. Bakterijske infekcije poput infekcije respiratornog trakta, polnih bolesti, meningitisa sa druge strane poslednjih godina su sve češće, uzrokovane pre svega rezistentnošću bakterija na sintetičke antibiotike (Russell, 2003). Sve je to uslovalo potrebu neophodnog razvoja prirodnog i bezbednog načina kontrole i zaštite ljudi i životinja od bakterijskih infekcija. Za veliki broj etarskih ulja se zna da poseduju antimikrobna svojstva i da je ova aktivnost u mnogim slučajevima posledica prisustva različitih klasa monoterpena (Bakkali *et al.*, 2008). Intenzivno se proučava mehanizam

delovanja terpenoida, ali još uvek nije u potpunosti objašnjena veza između njihove antibiotske aktivnosti i hemijske strukture.

Mnoga hemijska jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja reaguju sa proteinima ćelijske membrane. Ciklični ugljovodonici kao što je i dokazano reaguju sa ATPazom, enzimom koji je smešten na ćelijskoj membrani i koji je okružen molekulima lipida. Na distorziju proteina u lipidnoj membrani takođe mogu uticati ugljovodonici što može dovesti do direktne interakcije lipofilne komponente sa hidrofobnim delom proteina (Sikkema *et al.*, 1995). Najjače inhibitorno dejstvo na rast bakterija, uglavnom ispoljavaju fenoli i alkoholi, potom slede ketoni i aldehidi, a inhibitorna aktivnost ugljovodoničnih monoterpena je vrlo mala. Uzrok njihove aktivnosti može biti slobodna hidroksilna grupa fenola i alkohola. Potvrđeno je takođe da terpenoidi zavisno od njihove rastvorljivosti u vodi imaju različitu antiseptičku moć. Uočene su međutim i neke anomalije u vezi timola i karvakrola koji i pored slabe rastvorljivosti u vodi pokazuju izrazito antiseptičko dejstvo (Griffin *et al.*, 1999). Gram-negativne bakterije se za razliku od Gram-pozitivnih bakterija, odlikuju većom rezistentnošću prema dezinfekcionim sredstvima i antisepticima upravo zbog spoljašnje membrane koja deluje kao barijera za ulazak antibakterijskih agenasa (Mcdonnell *et al.*, 1999). Od aktivnosti njenih pojedinačnih komponenata može se potpuno razlikovati antimikrobna aktivnost etarskog ulja (Delaquis *et al.*, 2002). Inhibitorna aktivnost etarskih ulja kako je i utvrđeno, zavisi od složenih interakcija među njenim komponentama, a to može imati aditivan, sinergistički ili antagonistički uticaj na antimikrobno dejstvo ulja (Xianfei *et al.*, 2007).

Važna karakteristika etarskih ulja i njenih komponenata, koja povećava permeabilnost ćelijske membrane bakterije i omogućava lakši prolazak komponenata kroz njen lipidni sloj je hidrofobnost. Promena propustljivosti ćelijske membrane je obično praćena gubitkom osmotske kontrole ćelije, a to se smatra osnovnim principom antibakterijskog delovanja etarskih ulja (Sikkema *et al.*, 1994). Poznati su brojni postupci za određivanje antimikrobne aktivnosti koji se razlikuju po mikroorganizmima, hranljivoj podlozi, temperaturi inkubacije. Zbog njihove nestabilnosti, složenosti i male rastvorljivosti u vodi teško je odrediti antimikrobnu aktivnost etarskih ulja. Usled male rastvorljivosti etarskih ulja u vodi upotrebljavaju se drugi rastvarači kao što su: alkohol, aceton, glicerol, hloroform, dioksan i drugi. Za nas je interesantna rastvorljivost etarskih

ulja u vodi i u alkoholu. Gorki sastojci, šećeri, tanini, organske kiseline, veći broj mineralnih materija, zatim sluzaste materije i belančevine rastvaraju se dobro u vodi i u alkoholno-vodnim mešavinama, sa malim procentom alkohola. Tada se malo rastvaraju i etarska ulja i glavni sastojci, jer se ona rastvaraju dobro tek u velikim koncentracijama alkohola. Zato, ako se kasnije procenat alkohola snizi piće će se zamutiti i izdvajaju se kapljice etarskog ulja.

Postoje brojne studije koje primenjuju različite metode ispitivanja antibakterijske aktivnosti zbog različite rastvorljivosti antimikrobnih komponenata u vodi (Cox *et al.*, 2000). Za određivanje antimikrobne aktivnosti koriste se različite metode ispitivanja: difuzione, dilucione i bioautografske metode (Rios *et al.*, 1988). Mogućnost primene navedenih metoda i metodološki pristup su objašnjeni u literaturi, ali se čini da ipak ne postoji standardni test za procenu antibakterijske aktivnosti potencijalnih antimikrobnih agenasa (Burt, 2004).

Često se antimikrobna aktivnost određuje i disk difuzionom metodom, koja u potpunosti zavisi od rastvorljivosti komponenata u vodi i njihove difuzije kroz agar. Ovom metodom bi trebalo očekivati da jedinjenja niže rastvorljivosti u vodi ispoljavaju manju baktericidnu aktivnost, pri čemu bi ispitivane ugljovodonične komponente etarskog ulja plutale na površini medijuma ili isparile (Griffin *et al.*, 1999). U poređenju sa disk difuzionom metodom, za metodu mikrodilucije koja se izvodi na mikrotitarskim pločama, potrebna je manja količina medijuma i etarskih ulja, a izvođenje postupka je znatno efikasnije i brže. MIC je definisana kao najniža koncentracija ispitivanih etarskih ulja pri kojoj nema vidljivog rasta bakterija.

Literaturni podaci govore o antimikrobnoj aktivnosti pojedinih komponenata, na primer, terpinen-4-ola, dok *p*-cimen nije pokazao aktivnost. Osim prema *Pseudomonas aeruginosa* α -terpineol i linalol su pokazali aktivnost protiv nekih mikroorganizama (Carson i Riley, 1995). Cineol, linalol, mentol, geraniol i citral imaju veliku moć bakterijske inhibicije (Pattnaik *et al.*, 1997). Takođe, farnezol, α -bisabolol, karvakrol, anetol, imaju antifugalno dejstvo (Pauli i Knobloch, 1987), a znatnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* poseduje salvin (Dobrynin *et al.*, 1976). Hinou i saradnici su 1989 godine ispitivali antimikrobnu aktivnost 32 konstituenta aromatičnih biljaka. Filipowicz i saradnici (2003) su došli do saznanja da monoterpenski ugljovodonicni α - i β -pinen, β -mircen, sabinen, limonen i *p*-cimen, pokazuju slab antibakterijski efekat na

Gram-negativne bakterije. U svom ispitivanju Mahboobi i saradnici (2006) su zaključili da etarska ulja lavande, karanfilića i geraniuma ispoljavaju snažno antibakterijsko delovanje na veoma rezistentan soj *P. aeruginosa* i ukazali na potencijalnu primenu testiranih ulja na jednu od najrezistentnijih Gram-negativnih bakterija. Ispitivanja Matasyoha i saradnika (2007) sa druge strane, su ukazala na snažno antimikrobno dejstvo linalola ali i na njegov slab efekat na *P. aeruginosa*. Pomenuta bakterijska vrsta je uzrok mnogih infekcija u organizmu, a zbog njene izuzetne otpornosti, uzrokovane strukturom spoljašnje membrane, lečenje ove bakterije predstavlja ozbiljan problem u medicini. Intenzitet antimikrobnog delovanja ulja zavisi od koncentracija glavnih komponenata iz razloga jer glavne komponente etarskih ulja prilično dobro reflektuju biofizičke i biološke karakteristike ulja (Ipek *et al.*, 2005). Iako se jaka antimikrobna aktivnost etarskog ulja protiv većine mikroorganizama pripisuje prisustvu monoterpena koji imaju antibakterijski i antifungalni efekat, u stvari, sinergistički efekti ovih manje i više prisutnih komponenti u etarskom ulju su odgovorni za njihovo biološko delovanje.

Takođe je utvrđeno, da su u nekim slučajevima komponente prisutne u ulju u manjoj količini odgovorne za njegovo antimikrobno delovanje (Hoet *et al.*, 2006). Uostalom, verovatnije je da nekoliko komponenata etarskog ulja određuju njegovu gustinu, boju, miris, a iznad svega penetraciju kroz ćeliju, fiksaciju za ćelijske zidove i membrane i distribuciju u ćeliji. Uzimajući u obzir sve napred navedeno, kao i koncept sinergističke aktivnosti, bitnije je proučavati etarsko ulje, nego njegove pojedinačne komponente (Cal *et al.*, 2006).

2.2. LEKOVITE I AROMATIČNE BILJKE KAO IZVORI BIOLOŠKI AKTIVNIH SUPSTANCI

Kroz istoriju čovečanstva, najznačajniji izvor biološki aktivnih supstanci i lekova bile su biljke. Naučne discipline, poput fitohemije i farmakognozije, bile su tesno povezane sa razvojem moderne organske hemije koja doživljava procvat u devetnaestom i dvadesetom veku, kada je veliki broj biljnih vrsta hemijski i biohemijski okarakterisan, a iz njih izolovano i identifikovano blizu 20000 bioaktivnih sekundarnih biomolekula. Uzimajući u obzir i to da broj cvetnica (angiosperme) koje su hemijski ispitane čini samo 10%, od približno 250000 vrsta na planeti, može se zaključiti da i

dalje biljni svet predstavlja nepresušan i još nedovoljno istražen resurs biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja (Lesjak, 2011). Prirodni proizvodi biljaka pored neospornog značaja za farmaceutsku industriju, nalaze široku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava ispoljava i određene farmakološke i fiziološke efekte na zdravlje ljudi, što je od izuzetnog značaja u prevenciji nastanka bolesti savremenog čoveka. Iz tog razloga su hemijska karakterizacija i ispitivanja bioloških aktivnosti do sad neispitanih biljnih vrsta od izuzetnog naučnog i praktičnog interesa, jer vode ka novim izvorima potentnih, biološki aktivnih prirodnih proizvoda.

Međutim i pored opsežnih ispitivanja sprovedenih u svim krajevima sveta, broj droga koje se tradicionalno koriste, a koje su samo delimično hemijski i farmakološki ispitane je veliki. Posebno mesto među njima zauzimaju aromatične biljke čija je primena u fitoterapiji i prehrambenoj industriji opravdana u velikoj meri zahvaljujući biološkim funkcijama sekundarnih metabolita kao što su terpenoidi (Božin, 2009).

Jedno od najinteresantnijih područja, u florističkom i vegetacijskom pogledu u Srbiji je područje jugoistočne Srbije, posebno okolina Niša. Još od vremena Josifa Pančića (1874, 1884) i Save Petrovića (1882, 1885), koji su floru Niša intenzivno izučavali, ovo područje privlačilo je mnoge botaničare, pa je i danas izuzetno interesantno za dalja floristička i vegetacijska istraživanja. Na području jugoistočne Srbije nalaze se značajni botanički lokaliteti.

Zahvaljujući publikovanim florističkim podacima botaničara koji su radili na ovom području, kao i pregledom obimne herbarijumske građe, taksonomska analiza pokazuje da su u flori ovih područja zastupljene biljne vrste porodice Asteraceae i Lamiaceae, pa je biljni materijal koji pripada navedenim porodici ušao u predmet naših proučavanja. Veliki broj vrsta koje pripadaju navedenim porodici, kao i biljke koje su odabrane za naša istraživanja pripadaju mediteransko-submediteranskoj areal grupi, a posledica značajnog upliva (sub)mediterana na teritoriju južne i jugoistočne Srbije pogoduje njihovom razvoju i kvalitetu. Mnoge vrste iz porodice Asteraceae i Lamiaceae su i aromatične, a karakteriše ih pored zapaženog prisustva ostalih bioaktivnih komponenata i visok sadržaj etarskog ulja. *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., *Origanum vulgare* L., *Nepeta nuda* L., *Mentha longifolia* Huds., *Thymus serpyllum* L., *Hysopus officinalis* L. pripadaju porodici Lamiaceae, a *Artemisia alba* Turra porodici Asteraceae i svrstavaju

se u lekovite i aromatične biljke. Kako je poznato da je kvalitet aromatičnih droga definisan sadržajem etarskog ulja skoro sve od pobrojanih imaju veliku primenu u mnogim granama industrije, a takođe i u prehrambenoj industriji kao aromatične biljke. Na području istraživanja izabrane biljke su količinski dosta zastupljene, tako da mogu da se eksploatišu za dalju primenu u industriji.

Polazeći od saznanja da bi obzirom na prisustvo fenolnih i terpenskih jedinjenja navedene biljke mogle biti značajan prirodni resurs biološki aktivnih jedinjenja, a koje imaju primenu u zvaničnoj ali i našoj tradicionalnoj medicini, u ovom radu odabrane su biljne vrste: *Satureja kitaibelii*, *Origanum vulgare*, *Nepeta nuda*, *Mentha longifolia*, *Thymus serpyllum*, *Hyssopus officinalis* i *Artemisia alba*.

2.2.1. *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. – čubar

Rod: *SATUREIA*

Familija: Lamiaceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije (Diklić, 1974) naziv roda potiče od latinske reči *saturare*, što znači zasititi, jer se kod Rimljana *S. hortensis* uzimala kao začin.

Narodni nazivi: rtanjski čaj, planinski čaj, čubrica ili čubar.



Slika 2. *S. kitaibelii* - čubar

Opis vrste: *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. (po Šilić-u vrsta, po Flori Evrope podvrsta *S. montana* L. subsp. *kitaibelii* (Wierzb.) P.W.Ball, a po Flori Srbije varijetet *S. montana* var. *kitaibelii* Wierzb.) (Šilić, 1979), je višegodišnja biljka koja izrasta kao polugrm visine 30-50 cm sa dobro razvijenim korenovim sistemom. Izdanci su brojni, odrveneli, naročito pri dnu, uspravni, jednostavni ili razgranati. Obično je četvorougaoanog poprečnog preseka, sjajna na dvema suprotnim stranama sa dosta markantnim, pravim ili prema dole kukasto savijenim, belim, višecelijskim dlačicama. Kora izdanka pri dnu je smeđa – mrka, mat, prema vrhu svetlija, sjajna. Pri samom vrhu je zelena. Listovi su izduženo lancetasti, sedeći, kruti i kožasti, a završavaju se najčešće kratkom mekanom bodljom. Cvetovi su dosta zbijeni, smešteni u više cvetnih račvica, koje su na kraćoj ili dužoj uspravnoj peteljci. Čašica je do 7 mm duga, valjkasto izdužena, spolja sitno dlakava, iznutra gola, dok je krunica ružičasto-purpurna, duplo duža od čašice.

Rasprostranjenje i stanište: Familija usnatica (Lamiaceae, Labiatae) obuhvata, 7200 vrsta koje su grupisane u 263 roda. U našoj zemlji je zastupljeno 30 rodova ove familije, od kojih se po značaju i rasprostranjenju izdvaja rod *Satureja* L.

Na području Srbije, najzastupljenija vrsta je *S. kitaibelii*, koja je rasprostranjena u čitavoj istočnoj i jugoistočnoj Srbiji. Bitno je pomenuti da je ova biljna vrsta endemična i da njen areal pokriva samo centralni deo Balkanskog poluostrva (Diklić, 1974).

Deo biljke koji se koristi: Koristi se nadzemni deo biljke (*Herba Saturejæ*), mada je kao lekovita droga čisti list traženiji (*Folia Saturejæ*). Etarsko ulje (*Oleum Saturejæ*) se dobija destilacijom od nadzemnih delova biljke (Willford, 1989).

Hemijski sastav: Veliki broj vrsta ove familije su poznate po visokom sadržaju etarskih ulja. Komponente koje ulaze u sastav etarskog ulja *S. kitaibelii* su prema literaturnim podacima: geraniol, geranilacetat, kariofilen, *p*-cimen, α -pinen, β - pinen, limonen, 1,8-cineol, γ -terpinen (Živanović *et al.*, 1987). Kao najznačajniji izvori fenolnih jedinjenja navode se biljke i začini, među kojima čubar zauzima značajno mesto koji prema literaturnim podacima sadrži rozmarinsku kiselinu i karnozol (Yanishlieva-Maslarova, Heinonen, 2001).

Upotreba: U narodnoj medicini čubar se najčešće upotrebljava u obliku čajeva. Sve vrste čubra imaju jako antiseptično dejstvo zbog fenolnih jedinjenja prisutnih u etarskom ulju (Tucakov, 1990). Etarska ulja vrste *S. kitaibelii* pokazuju znatnu

fitoncidnu aktivnost, odnosno mikrobicidno i mikrobistatično delovanje (Milosavljević *et al.*, 1997, 1998). Nauka takođe daje podršku upotrebi čubra za buđenje i izazivanje seksualne želje (Stanić, Samardžija, 1993). Veruje se da, kada se redovno konzumira, povoljno utiče na potenciju zbog čega ga zovu i „muški čaj“ (Mességué, 1988). Koristi se u narodnoj medicini još u lečenju bolesti jetre, bronhitisa, žučnih puteva, astme dok smanjuje osećaj žeđi kod šećerne bolesti (Willford, 1989). Korišćen je u srednjem veku protiv reumatizma, paralize, belog pranja i prekida menstruacija (Mességué, 1988). Kontinuirana upotreba čubra preventiva je za mnoge bolesti, a u narodu se veruje i za kancerogene. Verovanje potvrđuje i nauka, jer su mnogi autori (Ćetković *et al.*, 2007; Ćavar *et al.*, 2008) dokazali antioksidantna i antimikrobna svojstva biljaka roda *Satureja*. Sveži sok biljke koji se koristi u narodnoj medicini aplikuje se direktno utrljavanjem na kožu kod dermatita, bolova, svrabeža i otoka izazvanog ujedom pčela i drugih insekata (Asenov *et al.*, 1998). Postoje podaci u literaturi o antimikrobnom delovanju *S. thymbra* (Shimoni *et al.*, 1993), *S. montana* (Panizzi *et al.*, 1993) i *S. kitaibelii* (Milosavljević *et al.*, 2000). Osim u Evropi vrste ovog roda su popularne i u SAD (Tyler, 1993). Veruje se da tanini u biljci smanjuju upalu creva. Istraživanja pokazuju da ulje čubra ima antispazmolitički efekat kod pojedinih glatkih mišića te se upotrebom mogu smiriti bolovi u digestivnom traktu (Leung i Foster, 1996). Veliku vrednost čubru za tretman akutnog enterokolitisa i kao karminativno sredstvo pripisuju nemački medicinski udžbenici (Weiss, 1988). Navodi se takođe, da čubar ublažava kašalj i nadražaj na kašalj, a olakšava i izbacivanje sluzi. Etarsko ulje pokazuje diuretska svojstva (u SAD je registrovan preparat „Waterpill“ proizveden na bazi čubra), dokazan na eksperimentalnim životinjama (Tyler, 1993). Etarska ulja predstavnika roda *Satureja* koriste se i u aromoterapiji (Allegrini *et al.*, 1974). Istraživanja etarskih ulja nekoliko predstavnika roda *Satureja* L., u Bugarskoj, ukazuju na vrstu *S. montana* var. *kitaibelii* = *S. kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. kao naročito pogodnu za upotrebu u parfimeriji. (Genova i Jankulov, 1983).

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: Čubar se upotrebljavao kao začinska biljka (Šilić, 1979) konzervans i korigens jer se dodaje jelima od ribe i mesa. Navodi se takođe da se etarsko ulje, ili sama biljka (herba), mogu koristiti u pripremi ribljih, mesnih konzervi, trajnih i polutrajnih kobasica (Genova i Jankulov, 1983). Analizirana je antioksidantna aktivnost ekstrakata iz odabranih vrsta familije Lamiaceae na

suncokretovo ulje. Kao najaktivniji pokazao se etanolni ekstrakt čubra, pa ga autori preporučuju kao najadekvatniji antioksidant za stabilizaciju ulja suncokreta (Mimica - Đukić, Jančić, 1998). Američka uprava za hranu i lekove – „FDA“ uvrstila je čubar na listu za hranu pod kategorijom „Generally Recognized As Safe“ – GRAS („generalno priznata kao zdrava“) (Leung i Foster, 1996).

2.2.2. *Origanum vulgare* L. - vranilova trava

Rod: *ORIGANUM*

Familija: Lamiaceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije VI (Diklić, 1974) potiče od grčkih reči *oros*, što znači breg i *ganos* što znači ukras.

Narodni nazivi: vranilova trava, mirišijavac, bolja dušica.



Slika 3. *O. vulgare* – vranilova trava

Opis vrste: Vranilovka je višegodišnja zeljasta biljka prijatnog mirisa sa horizontalnim rizomom i podzemnim stolonima. Ima uspravne čvrste stabljike, visoke oko pola metra, skoro gole ili pokrivene dugačkim dlakama, tamno-zelene boje, često obojene crvenkasto i obrasle dosta krupnim tamno-zelenim ovalnim listovima. Listovi sa lisnom drškom, liska jajasta, po obodu nenazubljena. Cveta od jula do oktobra.

Cvetovi su na vrhu stabljika udruženi u kompaktne okruglaste cvasti, prijatnog mirisa i izvanredno lepog izgleda. Ukusa je gorkog i oporog.

Rasprostranjenje i stanište: Postojbina ove biljne vrste je Evropa, sada je kultivisana svuda u svetu, uključujući SAD, Indiju i Južnu Ameriku. Ulje se uglavnom proizvodi u Rusiji, Bugarskoj i Italiji. Veoma je rasprostranjena, a kao najznačajnija staništa navode se sušni obronci, siromašne livade, svetle listopadne šume, šikare, do 2000 m nadmorske visine.

Deo biljke koji se koristi: Kao lekoviti deo koriste se vrhovi grančica u cvetu (*Origani herba*) i etarsko ulje (*O. aetheroleum*).

Hemijski sastav: U herbi ima 0,3-1,2% etarskog ulja, tanina i dr., a u etarskom ulju i do 40% fenola (timola i karvakrola). Etarsko ulje je bledo-žuta tečnost (tamni godinama), prijatnog, specifičnog biljnog mirisa. Glavni sastojci ulja su karvakrol, timol, cimen, kariofilen, pinen, bisabolen, linalol, borneol, geranil acetat, linalil acetat, terpinen. Etarsko ulje origana se uglavnom sastoji od karvakrola, timola, kao i njihovih prekursora γ -terpinena i *p*-cimena. Sastojci veoma variraju u skladu sa izvorom, ali ulja klasifikovana kao oregano ili oreganum imaju timol i/ili karvakrol kao svoje većinske komponente. Kada su u pitanju vrste roda *Origanum* literatura kao glavne predstavnike fenolnih jedinjenja navodi derivate fenolnih kiselina i flavonoide (Yanishlieva-Maslarova, Heinonen, 2001). Flavonoidi identifikovani iz vrste *O. vulgare* su: od flavona, krisin, negletein, mosloflavon, diosmetin, od flavonola, kemferol, kvercetin, galangin, retusin, od flavanona, naringenin, i od dihidroflavonola, taksifolin/dihidrokvercetin (Skoula *et al.*, 2008). Flavoni, flavonoli, flavanoni i dihidroflavonoli su identifikovani kod mnogih vrsta roda *Origanum*.

Upotreba: Spada u grupu aromatičnih, oporih, gorkih, neotrovnih droga koje se kod nas mnogo cene. Hemijski sastav i dejstvo vranilovke je vrlo blisko i slično majkinoj dušici pa se na isti način može upotrebiti. Biološka aktivnost njenog etarskog ulja i ekstrakta je i naučno potvrđena (Sahin *et al.*, 2004). Nazivaju je vranilovkom jer je ista do otkrića sintetskih boja upotrebljavana za crno bojenje vune. Vranilova trava ima veoma staru lekovitu reputaciju. Omiljena je u narodu kao čaj i lek za jačanje, za lečenje bolesti organa za varenje (osobito proлива) i disanje, a spolja se upotrebljava protiv raznih zapaljenja kože i sluznica. Deluje kao analgetik, antihelminetik, antireumatik, antiseptik, antivirotik, baktericid, karminativ, diaforetik, diuretik,

fungicid, parazitocid, rubefacijens, stimulans, holeretik... Majkina dušica i vranilova trava su mnogo cenjene i u narodu često upotrebljavane biljke. Uspešno se primenjuju kod nazeba, kašlja i upale disajnih puteva, kao spazmolitik, stomahik itd. Etarsko ulje *O. vulgare* poseduje jako antimikrobno (Dorman i Deans, 2000), antifungalno (Daouk *et al.*, 1995) i antioksidantno svojstvo (Cervato *et al.*, 2000). Etarsko ulje sadrži znatne količine fenola zbog čega deluje antibakterijski (Muravjova *et al.*, 2002). Etarsko ulje vranilovke sadrži oko 50% timola, zbog čega ima veoma izražena antibakterijska svojstva pa se na taj način i objašnjava vekovna upotreba i ogromno poverenje u lekovitu moć ove biljke u nekim našim krajevima. Koristi se kao mirisni sastojak za sapune, kolonjske vode i parfeme, a posebno kod muških mirisa.

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: U proizvodnji mesa i pića se koristi kao začim. Kao začim veoma je zastupljen u oblasti prehrambene industrije, uglavnom zbog svojih aromatičnih svojstava pa mu je i primarna uloga da pojača ukus i aromu hrane. Veliki broj „italijanskih“ soseva su aromatizovani uljem majorana i/ili uljem origana. Rezultati ispitivanja uticaja ekstrakta origana *O. vulgare* na rast *Fusarium* i *Penicillium* vrsta izolovanih iz kolača i salata od svežeg povrća pokazuju da bi ispitivani ekstrakt origana mogao imati zaštitni efekat u kontroli rasta plesni u hrani tokom čuvanja ili čak produžiti rok trajnosti hrane (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012a). Origano je takođe više puta korišćen u nameri da poboljša kvalitet i kvantitet proizvoda životinjskog porekla. Utiče na poboljšanje performansi rasta kod svinja (Namkung *et al.*, 2004), ali su rezultati kod živine kontraverzni.

2.2.3. *Artemisia alba* Turra - rudinski pelen

Rod: *ARTEMISIA*

Familija: Asteraceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije antički naziv potiče od reči *artemis* = zdrav, što označava lekovitost biljaka ovoga roda. Otuda je i tumačenje da je naziv dat po boginji Artemis, zaštitnici žena, pošto se jedna od vrsta ovoga roda upotrebljavala za olakšavanje porođaja (Gajić, 1975).

Narodni nazivi: rutvica, rudinski pelen, pelinak.



Slika 4. *A. alba* - rudinski pelen

Opis vrste: Vrste roda *Artemisia* su zeljaste ili polužbunaste aromatične biljke. Po Flori Srbije *A. lobelii* All. (*A. camphorata* Vill., *A. alba* Turra), a po Flori Evrope *A. alba* Turra, je veoma promenljiva u indumentumu, maljavosti lista i mirisu (Gajić, 1975; Tutin *et al.*, 1976). Rudinski pelen je višegodišnja, polužbunasta biljka, 30-100 cm visoka. Pri osnovi stabljike su odrvenele, slabo dlakave, uspravne. Listovi su više puta deljeni perasto na linearne režnjeve. Glavice su loptaste (4-5 mm), sa drškama, viseće. Cveta od VII-IX meseca i cvetovi su žuti. Miriše na kamfor.

Rasprostranjenje i stanište: Familija *Asteraceae* sa oko 25000 vrsta u oko 1500 rodova, jedna od najvećih porodica. Rod obuhvata preko 200 vrsta od kojih se veliki broj javlja u stepskim oblastima Evrope i Azije, severne i srednje Amerike. U flori Srbije ustanovljeno je 9 vrsta (Gajić, 1975). Naseljava stenovita mesta, zidine, travna mesta (npr. u as. *Myrsiniteto-Ischaemetum*, *Artemisio-Salvietumofficinalis*, *Humileto - stipetum grafianae* i *Stipetum grafianae* - na krečnjaku, *Potentil – leto - Caricetum humilis*), kserofitne šume (napr. u as. *Carpinetum orientalis* - na krečnjaku). Rasprostire se u mediteranskoj oblasti, submediteranski florni elemenat (Gajić, 1975; Stamenković, 2005). Od reliktnih zajednica koje ne pripadaju šumskim zajednicama u Belopalanačkoj kotlini, dve su najznačajnije: Zajednica rudinskog pelina i žalfije (*Artemisio – Salvietum officinalis – Artemisia lobelii*). Pored prisustva u simbiozi, rudinski pelin se nalazi i van ovakvih areala. Familije *Asteraceae* (*Artemisia alba* Turra), *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae* su familije sa najvećim brojem vrsta u flori klisure Svrliškog

Timoka što je u skladu sa najbogatijim familijama flore Srbije (Bogosavljević *et al.*, 2007).

Deo biljke koji se koristi: Koristi se nadzemni deo biljke u cvetu (*Artemisia lobelii herba*).

Hemijski sastav: Hemijska kompozicija etarskog ulja herbe *Artemisia alba* Turra veoma je varijabilna u zavisnosti od staništa i klime gde vrsta raste. Zajedno sa geografskim poreklom, temperatura, način i trajanje sušenja, takođe utiče na sastav etarskog ulja (Khangholi i Rezaeinodehi, 2008). Hemijski sastav etarskog ulja navedene herbe čine sledeće komponente: kamfen, 1,8-cineol, artemisia keton, α -tujon, kamfor, α -pinen, β -pinen, sabinen, α -terpinen, *p*-cimen, linalol, bornilacetat, terpinen-4-ol, *trans*-pinokarveol, *trans*-karveol, borneol i dr (Gorunović *et al.*, 1992). Monoterpeni su isparljiva jedinjenja i glavni su konstituenti esencijalnih ulja. (Muller, 1966) ističe da etarsko ulje žalfije sadrži terpene, kamfor i 1,8-cineol, poznate inhibitore klijanja i rasta klijanaca različitih vrsta zeljastih biljaka i upravo te komponente su detektovane u blizini žbunova žalfije, u atmosferi i zemljištu. Inhibitorni efekat terpena ispoljava se ne samo protiv jedinki drugih vrsta nego i prema biljkama koje proizvode terpene kao inhibitore (autopatija, autoalelopatija). Takvi primeri su poznati za *Coridothymus capitatis* (Lamiaceae) i *Artemisia alba* (Asteraceae) (Janjić *et al.*, 2008). Ispoljavaju alelopatsko delovanje, a naročito kod aromatičnih biljaka u aridnim i semi-aridnim zonama (Angelini *et al.*, 2003). Prema podacima iz literature listovi *Artemisia* vrsta sadrže značajne količine fenola i flavonoida, a identifikacijom i kvantifikacijom fenolnih jedinjenja šest različitih *Artemisia* vrsta utvrđeno je prisustvo hidroksibenzoeve kiseline, cinamične kiseline, flavonola i katehina (Carvalho *et al.*, 2011). Heterozidi flavonoida su takođe sastojci herbe pelena (Kovačević, 2004).

Upotreba: *Artemisia* vrste imaju široku primenu u tradicionalnoj medicini širom sveta za različite i dobro poznate terapijske primene (bol u stomaku, proliv, parazitizam, crevne i bronhijalne infekcije, angina, rane, bubuljice, prehlada i kašalj (Benli *et al.*, 2007). One pokazuju antiinflamatornu, antitumorsku, antioksidantnu, antimikrobnu, insekticidnu, antimalarnu i antifungalnu aktivnost (Tan *et al.*, 1998). Biljke iz roda *Artemisia* se tradicionalno koriste kao antihelmintici i cela biljka i biljni ekstrakti su pokazali aktivnost protiv gastrointestinalnih nematoda u nekoliko studija (Squiresa *et al.*, 2011). Nekoliko monoterpena, kao što su kamfor, pinen, cineol u

čistom obliku ili kao esencijalne uljne mešavine inhibiraju klijanje ili ispoljavaju neko drugo fiziološko delovanje (Angelini *et al.*, 2003). Seskviterpen laktoni imaju široku biološku aktivnost uključujući insekticidno (Datta i Saxena, 2001), antibakterijsko (Saroglou, 2005) i fungicidno delovanje (Ahmed, 2005). U mnogim slučajevima oni se pojavljuju kao alelopatske supstance sa visokim nivoom aktivnosti (Batish *et al.*, 2001). Oni su prisutni naročito u biljkama iz familije *Asteraceae* (Fraga, 2005).

Mnogi autori su dokazali antioksidantna i antimikrobna svojstva biljaka roda *Artemisia* (Vajs *et al.*, 2004; Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Brojna *in vitro* ispitivanja ekstrakata i etarskih ulja pelena kao i preparata na njegovoj bazi potvrdila su njegov izuzetan antimikrobni potencijal.

Ekstrakti i etarska ulja od mnogih *Artemisia* sp. kao što su *A. Mexicana* (Navarro *et al.*, 1996), *A. princeps* (Yun *et al.*, 2008), *A. diffusa*, *A. oliveriana*, *A. scoparia*, *A. turanica* (Ramezani *et al.*, 2004), *A. dracuncululus*, *A. annua*, *A. gypsacea*, *A. afra* and *A. khorassanica* (Benli *et al.*, 2007) su pokazali da poseduju antimikrobnu aktivnost. Etarska ulja vrsta *A. scoparia* i *A. capillaries* ispoljila su antibakterijsku aktivnost na 15 različitih vrsta bakterija, uzročnika infekcija usne duplje (Chia *et al.*, 2005). Mnogi začini roda *Artemisia* su poznati kao aromatično bilje i imaju karakterističan miris ili ukus, izazvan prisustvom monoterpena i seskviterpena, koji su u mnogim slučajevima razlog za njihovu primenu u narodnoj medicini, imaju druge fitotoksične aktivnosti, a koriste se i kao prirodni herbicid (El-Massry *et al.*, 2002; Kordali *et al.*, 2005a).

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: Posедуje vrlo prijatan kamforast miris i gorak ukus. Izvanredan je za spravljanje vermuta i likera (Spasić, 2002). Prisustvo žalfije (*Salvia officinalis*), vrlo cenjene medonosne biljke, karakteristično je za područje Sićevačke klisure. Sa aspekta medonosnosti, najznačajnije vrste ove asocijacije, su pored spomenute žalfije i rudinski pelin (*A. alba*), rtanjski čaj (*Satureja montana*), miloduh (*Hysopus officinalis*), majkina dušica (*Thymus serpyllum*), jagorčevina (*Primula officinalis*), kantarion (*Hipericum perforatum*) i druge (Spasić, 2002).

2.2.4. *Nepeta nuda* L. - macina trava glatka

Rod: *NEPETA*

Familija: Lamiaceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije (Diklić, 1974) po antičkom nazivu za grad Nepi u Italiji.

Narodni naziv: macina trava glatka.



Slika 5. *Nepeta nuda* - macina trava glatka

Opis vrste: *Nepeta nuda* je višegodišnja biljka. Ima uspravnu stabljiku, do 100 cm visoku, u gornjem delu metličasto razgranatu, a u donjem potpuno голу. Listovi su izduženo jajasti ili izduženo lancetasti, sedeći i skoro goli. Krunica je svetloljubičasta ili ružičasta. Cveti od juna do avgusta.

Rasprostranjenje i stanište: Rasprostranjena je, a kao najvažnija staništa se navode: sušne livade, pustare, ima je na kamenjarima u svetlim listopadnim i četinarskim šumama. Rod *Nepeta* (mačja trava) obuhvata oko 300 vrsta, ima ga u Aziji i Evropi. Najveća raznovrsnost i bogatstvo vrsta se nalazi u dve oblasti jugozapadne Azije, naročito Iran i zapadni Himalaji uključujući Hindukosh (Pojarkova, 1954). Rod *Nepeta* je jedan od najvećih rodova familije Lamiaceae u Iranu, gde se nalaze čak 75 vrsta od kojih su 54% endemične.

Deo biljke koji se koristi: Kao lekoviti deo koristi se nadzemni deo biljke u cvetu (*Nepetae nudaе herba*) i bere se tako što se odrezuju gornje polovine stabljike u cvetu.

Hemijski sastav: Ima sličan hemijski sastav i upotrebu kao i *Nepeta cataria* L. Sastojci ove biljne vrste su etarsko ulje, gorke materije, glikozidi, tanini, saponini. U sastav etarskog ulja pomenute herbe ulaze sledeće komponente: 4a β ,7 α ,7 $\alpha\alpha$ -nepetalakton, 1,8-cineol, germakren D, β -bisabolen, δ -kadinen, β -elemen, sabinen, β -pinen, 3-oktanon, α -pinen, α -terpineol i dr. (De Pooter *et al.*, 1987).

Upotreba: U medicini biljka se koristi kod gastrointestinalnih i respiratornih poremećaja kao što su proliv, kašalj, astma i bronhitis (Baranauskiene *et al.*, 2003). Etarskom ulju se pripisuje blago sedativno delovanje što opravdava njegovu upotrebu u narodnoj medicini, protiv histerije, melanholije i grčeva u materici. Neke od vrsta se koriste kao lekovito bilje u Iranu (*N. isphahanica*, *N. binaloudensis*, *N. bracteata*, *N. pogonosperma* i *N. pungens*) dok se *N. crispa* koristi kao kulinarski začin. *Nepeta* vrste imaju veliku primenu u narodnoj medicini zbog svojih lekovitih svojstava. Lekovita svojstva *Nepete* se obično pripisuju njenim etarskim uljima i flavonoidima. Etarsko ulje od *N. rtanjensis* poseduje jaku antibakterijsko dejstvo protiv različitih sojeva *Staphylococcus aureus*, čak jače nego većina sintetičkih antibiotika (Stojanović *et al.*, 2005). Mikrodilucionom metodom testirana je inhibicija micelijalnog rasta pet mikromiceta, dve vrste roda *Alternaria*, izolovane sa *N. rtanjensis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride* i *Bipolaris spicifera*. Etarsko ulje *N. rtanjensis*, čija je glavna komponenta 4 $\alpha\alpha$,7 α ,7 $\alpha\beta$ -nepetalakton pokazalo je jaku antifungalnu aktivnost u odnosu na sve testirane mikromicete (Ljaljević-Grbić *et al.*, 2008).

Sprovedenom fitohemijskom analizom *N. sibthorpii* metanolni ekstrakti su pokazali izuzetnu antioksidantnu i anti-inflamatornu aktivnost (Miceli *et al.*, 2005). Lekovita svojstva *Nepete* se obično pripisuju etarskim uljima i flavonoidima. Literatura navodi prisustvo identifikovanih 14 flavona i dva flavonola u ekstraktima nadzemnih delova vrste *Nepeta* sa područja Irana (Jamzad *et al.*, 2003).

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: Zbog ukusa limuna i mente *Nepeta* se koristi u pripremi biljnih čajeva, kao i u kuvanju.

2.2.5. *Thymus serpyllum* L. - majkina dušica

Rod: *THYMUS*

Familija: Lamiaceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije (Diklić, 1974) od reči *thymon*, što znači tamnjan, zbog mirisavosti.

Narodni nazivi: majkina dušica, bakina dušica.



Slika 6. *T. serpyllum* - majkina dušica

Opis vrste: To je višegodišnji mali žbun prijatnog mirisa (Sarić, 1989). Stabljika dugačka, puzi u vidu izduženih stolona, na vrhu se završava sterilnom rozetom listova. Cvetne grane visoke 4-7 cm. Listovi mali, čvrsti, uzano jajasto eliptični, i na licu i na naličju goli (Jančić, 2001).

Rasprostranjenje i stanište: Raste u severnoj i centralnoj Evropi, rasprostranjena je u Srbiji, a u Vojvodini na Fruškoj gori i Sremu (Diklić, 1974).

Deo biljke koji se koristi: Odsecaju se prilikom berbe gornje polovine grančica čim biljka počne da cveta. Kao lekoviti deo koristi se nadzemni deo biljke u cvetu.

Hemijski sastav: Majkina dušica sadrži 44,0% ugljenih hidrata, 24,3% celuloze, 13,2% ukupnog pepela, 6,8% proteina, 4,6% lipida i dr. (Savić *et al.*, 2008). Sadrži 0,2-0,6% etarskog ulja, tanine, gorka jedinjenja, flavonoide i dr. Prema PDR (Thomson, 2004) dominantna komponenta u etarskom ulju je obično karvakrol, a u većim koncentracijama su zastupljeni i borneol, izobutil acetat, kariofilen, 1,8-cineol, citral,

citronelal, citronelol, *p*-cimen, geraniol, linalol, α -pinen, γ -terpinen, α -terpineol, terpinil acetat i timol. Herba timijana oficinalna je po mnogim nacionalnim farmakopejama. Prema zahtevu Evropske farmakopeje, ova herba mora da sadrži najmanje 1,2% etarskog ulja u kome je ukupan sadržaj timola i karvakrola najmanje 40% (Ph Eur 7).

T. herba sadrži do 3,0% etarskog ulja, a pored glavnih sastojaka (timol i karvakrol), u ulju ima i drugih monoterpena cineola, linalola. Ova droga pored etarskog ulja sadrži flavonoide, fenol karbonske kiseline i njihove derivate, triterpene i tanine (Wichtl 2001; PDR, Thomson 2004). Hemijski sastav etarskog ulja herbe *T. serpyllum* veoma je varijabilan i zajedno sa geografskim poreklom, faza razvoja biljke i vreme berbe, takođe utiče na sastav etarskog ulja (Senatore, 1996). U etarskom ulju osam populacija *T. serpyllum* poreklom iz Rusije (planine Altaj), prinosi etarskih ulja su se kretali u granicama tipičnim za ovu vrstu (0,5-1%). Međutim, hemijski sastav ulja se značajno razlikovao. U etarskom ulju *T. serpyllum* (Kolivan, 150 m.n.v.) glavni sastojci ulja su β -mircen (4,0%), *p*-cimol (3,8%), 1,8-cineol (14,0%), *cis*- β -terpineol (8,2%), kamfor (4,0%), *trans*-nerolidol (29,8%). Analizom etarskog ulja pomenute vrste iz istog regiona (Mendur-Sokkon, 500-750 m.n.v.) identifikovne su sledeće komponente: *p*-cimol (14,5%), 1,8-cineol (5,6%), γ -terpinen (17,2%), karvakrol (29,6%) (Banaeva *et al.*, 1998). Oba ulja su sadržala ne više od 2% timola, koji se obično smatra glavnom komponentom *T. serpyllum*. Hemijski polimorfizam je karakterističan za biljke koje pripadaju rodu *Thymus* (Ložiene *et al.*, 2003). Hemijskim ispitivanjima timusa u svetu je potvrđeno postojanje šest hemotipova: geraniol, linalol, γ -terpineol, karvakrol, timol i *trans*-tujon-4-ol/terpinen-4-ol (Stanković *et al.*, 2011). Analizom etarskog ulja samonikle vrste *T. serpyllum* poreklom iz Litvanije, nije utvrđeno prisustvo timola i karvakrola (Ložiene *et al.*, 1998), a takođe pomenute komponente nisu glavne komponente etarskog ulja majkine dušice poreklom iz Estonije (Paaver *et al.*, 2008). Istraživanja sprovedena u nekim regionima južne Italije, pokazala su da etarska ulja herbe majkine dušice sadrže male količine timola i karvakrola, često ispod 1% (Miceli *et al.*, 2006). Analizirajući sastav etarskih ulja različitih posmatranih ekotipova prikupljenih iz oblasti na jugu Italije uočen je različit sastav *T. serpyllum* među biotipovima (De Lisi *et al.*, 2011). Uzorci etarskih ulja *T. serpyllum* iz Rusije, Letonije i Jermenije, pokazali su velike razlike, kako u prinosu, tako i u hemijskom sastavu. Na karakterizaciji hemijskog profila etarskog ulja i etanolno-vodenih ekstrakata različitih

Thymus vrsta sprovedena su brojna istraživanja. Pored etarskog ulja ova droga sadrži značajnu količinu heterozida flavonoida, fenolkarbonske kiseline i njihove derivate. Studije koje su se fokusirale na izučavanju polifenolnih jedinjenja, korišćenjem HPLC-ESI-MS analiza, potvrdile su prisustvo fenolnih kiselina (npr. ferulne kiseline, kafene kiseline i njenih derivata *p*-kumarne, ruzmarinske, hlorogene kiseline), flavonola (rutin, kvercetin), flavanola (katehin, epikatehin, dihidrokvercetin), flavanona (eriodiktiol, naringenin, hesperidin), flavona (apigenin i njene glukozide, luteolin i njegove glukozide) (Marin *et al.*, 2003; Boros *et al.*, 2010).

Upotreba: Karvakrol i timol su izomeri i pripadaju grupi monoterpenskih fenola sa jakim antiseptičkim dejstvom. Herba timjana (*Thymi herba*) i majkine dušice (*Thymi serpylli herba*), koriste se kao osnovne biljne sirovine za dobijanje timola i karvakrola, koji imaju sve veću primenu kako u tradicionalnoj tako i u naučnoj medicini, zbog svog višestrukog dejstva i veoma malo neželjenih efekata. Oni su predmet istraživanja poslednjih godina i mnoge kliničke studije su dokazale njihovu upotrebu kod lečenja raznih oboljenja kao i primenu u profilaksi i svakodnevnom životu. Timol i karvakrol se vrlo brzo apsorbuju sa mesta aplikacije, brzo se metabolišu jer ne podležu prvoj fazi biotransformacije, već se direktno vrši njihova konjugacija sa sumpornom i glukuronskom kiselinom.

Izlučuju se urinom za 24h, najvećim delom u obliku konjugata a manjim delom u nepromenjenom obliku (www.liu.edu/Brooklyn/About/News/Press-Releases). Preparati na bazi herbe timijana prema pozitivnoj monografiji Komisiji E, koriste se kod bronhitisa, kašlja, infekcija gornjih disajnih puteva i urinarnog trakta, a ispoljavaju još i antimikrobno i antioksidantno delovanje. Majkina dušica je omiljeni narodni lek. Koristi se kao antiseptik, ekspektorans, stomahik. U nemačkoj tradicionalnoj medicini se upotrebljava za bolje varenje, kod oboljenja mokraćne bešike i bubrega, kao aromatik i antiseptik (Sarić, 1989).

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: Ima karakterističan intenzivan, aromatičan miris i žarko aromatičan i gorak ukus. Bila je poznata još kod starih Egipćana koji su je koristili kao komponentu u sredstvu za balzamovanje zbog njenih svojstava konzervansa. U prehrambenoj industriji se koristi u proizvodnji pića (likeri), a vrlo često i u kulinarstvu za pripremu jela od divljači i živinskog mesa dinstanog u vinu, za pripremu marinada, marmelade, kobasica, svežeg sira, salata (Savić *et al.*, 2008).

2.2.6. *Mentha longifolia* (L.) Huds.- dugolisna nana

Rod: *MENTHA*

Familija: Lamiaceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije (Janković, 1974), prema imenu mitološke nimfe Menthe, koju je Prozerpina pretvorila u ovu biljku.

Narodni nazivi: konjski bosiljak, divlja nana, nana dugolisna.



Slika 7. *M. longifolia* - dugolisna nana

Opis vrste: Vrste roda *Mentha* su veoma polimorfne pri čemu polimorfizam obuhvata oblik lista, stepen dlakavosti, karakter cveta, veličinu i odnos čašice i krunice, dužinu prašnika i stubića itd. Veoma često vrste ovog roda obrazuju hibride. Sve to čini njihovu sistematiku izvanredno složenom, a determinaciju vrsta vrlo teškom. Ustvari, sistematika roda *Mentha* do danas još nije završena tako da između autora postoji neslaganje u pogledu broja vrsta. Nužna je revizija ovog roda koja će biti uspešna jedino ako se primene svi principi i metodi moderne sistematike. *M. longifolia* je višegodišnja zeljasta biljka sa snažno razvijenim rizomima. Stabljika je uspravna, u donjem delu nekada odrvenela, visoka i do 150 cm, razgranata. Listovi su sedeći izduženo jajasti, gušće dlakavi na naličju lista, dok su cvetovi sitni, sakupljeni u guste dihajizijume na vrhovima izdanaka zbijene u klasolike agregate. Cveta od VI-X meseca.

Rasprostranjenje i stanište: U flori Srbije zastupljeno je 11 vrsta (Flora SR Srbije VI, 1974). Naseljava vlažna staništa, obale reka, jezera, bara i kanala, vlažne livade,

pošumljene terene, a i suvlja mesta duž puteva i obradivih površina. U Srbiji je široko rasprostranjena, osim u Vojvodini, gde se češće nalazi samo na Fruškoj gori. U jugoistočnoj Srbiji je rasprostranjena od nizijskih predela, gde se javlja pored puteva i na obalama reka, do brdskih, planinskih i visoko planinskih predela, kraj potoka u zajednici *Junco-Menthetum longifolia*. Rasprostire se po čitavom Sredozemlju, srednjem i severnom delu Evrope, Maloj Aziji, Africi (Janković, 1974; Stamenković, 2005).

Deo biljke koji se koristi: Za dobijanje biljnih izolata koristi se vršni zeljasti deo biljke u cvetu (*Menthae longifoliae summitas*).

Hemijski sastav: Hemijska kompozicija etarskog ulja herbe divlje nane veoma je varijabilna u zavisnosti od staništa i klime gde vrsta raste. U etarskom ulju *M. longifolia* poreklom iz Turske, identifikovano je 45 komponenata, sa *cis*-piperiton epoksidom, pulegonom i piperitenon oksidom kao glavnim komponentama, a ispitivano ulje ispoljava i snažnu antimikrobnu aktivnost (Gulluce *et al.*, 2007). Analiza etarskog ulja marokanske *M. longifolia* pokazala je interesantne relativne količine piperitenon oksida i piperiton oksida (Ghoulami *et al.*, 2001). U etarskom ulju divlje nane poreklom iz Južne Afrike, identifikovana je 31 komponenta. Menton (50,9%), pulegon (19,3%) i 1,8-cineol (11,9%) su glavni sastojci ulja (Oyedeki and Afolayan, 2006). Analiza ulja *M. longifolia* iz Italije i Izraela otkrila je piperitenon oksid kao glavnu komponentu, dok etarsko ulje vrste sa Sinaja sadrži 1,8-cineol (28,8%), piperiton oksid (15,4%) i piperiton (13,8%) (Fleisher and Fleisher, 1998). Pulegona ima više od 70% u ulju vrste koja raste u pustinji Jordana (Fleisher and Fleisher, 1991). Dominantne komponente etarskog ulja herbe divlje nane sa područja Vojvodine su menton, isomenton i 1,8-cineol, a ulje ispoljava jak antimikrobni i signifikantni fungicidni efekat (Mimica *et al.*, 2003). Divlja nana sa područja Hrvatske sadrži karvon, piperitenon oksid, limonen i β -kariofilen kao glavne sastojke (Mastelić i Jerković, 2002). Kao glavni sastojci ulja ispitivane vrste prikupljene na Zlataru su *cis*- i *trans*- izomeri dihidrokarvona (15,9% i 30,6%) (Matović i Lavadinović, 1999). Veliki broj literaturnih podataka ukazuje na jedinstvene antioksidantne osobine mente. Veliku sposobnost deaktivacije DPPH* radikala korišćenjem ekstrakata mente naučnici dovode u vezu sa visokim sadržajem fenolnih kiselina i flavonoida. Značajnim sadržajem ruzmarinske kiseline odlikuju se sve biljke iz familije Lamiaceae (Mimica-Đukić i Božin, 2008).

U etarskim uljima devet populacija *M. longifolia* iz Grčke konstatovan je oksid piperiton kao glavna komponenta (Kokkini and Papageorgiou, 1988). Vrste roda *Mentha*, kao što je poznato sadrže širok spektar fenolnih jedinjenja npr., fenil propanoide (Areias *et al.*, 2001), kao i flavonoide u formi glikozida i acilovanih derivata, aglikona (Voirin *et al.*, 1994). Veliki sadržaj kafene kiseline i njenih derivata, kao što su ruzmarinska, litospermična, hlorogenska kiselina i metil rozmarinat, čiji sadržaj dostiže vrednost i do 7% ustanovili su analizom fenolnih jedinjenja lista pitome nane Fecka i Turek (2007). Flavonoidi pitome nane su zastupljeni u obliku lipofilnih polisupstituisanih flavon glikozida (*O*-metilovani apigenin i luteolin) i kao flavon i flavanon glikozida, čija koncentracija doseže i do 17% (Mimica-Đukić i Božin, 2008). U svojoj studiji Dorman i saradnici su 2003 godine ustanovili da su kod pitome nane najzastupljenija fenolna jedinjenja eriocitrin (eriodiktol-7-*O*-rutinozid), luteolin-7-*O*-glikozid i ruzmarinska kiselina, ali su utvrdili i prisustvo kafene kiseline i naringenin-7-*O*-glikozida, dok su slobodne aglikone luteolin, apigenin dokazali tek u tragu.

Upotreba: Etarsko ulje konjskog bosiljka je karakterističnog prijatnog i osvežavajućeg mirisa. Prema PDR ispoljava karminativna i stimulativna svojstva prema gastrointestinalnom traktu. Ublažava prehlade, upale disajnih organa, glavobolje, bolove u mišićima i zglobovima. Interno se koristi u obliku infuza, a eksterno za kupke (PDR, 2004). Postoje i fitopreparati na bazi aktivnih sastojaka etarskog ulja nane (mentol, menton, pinen, cineol) u obliku masti, rastvora za utrljavanje (etanolni, uljani), sirupa, kapsula, dražeja. Mentol pokazuje različita delovanja, zavisno od primenjene koncentracije. Primenjen lokalno u niskim koncentracijama dovodi do selektivne stimulacije osetljivih nervnih završetaka za hladnoću i izaziva osećaj hlađenja i blag anestetički efekat. U koncentraciji od 0,08% do 1,2% nalazi se u tabletama za sisanje. Multikomponentni fitopreparati sa holagognim delovanjem sadrže mentol u dozi od 0,021 g u kombinaciji sa mentonom (0,003 g), pinenom (0,008 g) i cineolom (0,0014 g), u obliku dražeja, kapsula i uljanih rastvora (Stanisavljević *et al.*, 2010). Mentol, derivati mentola, limonen i cineol koriste se za poboljšanje penetracije u dermalnim preparatima, a peritone ima povoljan efekat u lečenju urinarnih infekcija.

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: Divlja nana je aromatična i medonosna biljka. Koristi se u farmaceutskoj, duvanskoj, prehrambenoj industriji (u izradi likera, bombona i raznih poslastica). Ako se neposredno pre posluživanja posipaju salate, supe,

variva, prženo meso ili riba sitno iseckanom nanom jela postaju ukusnija a takođe i zdravija. Nana poboljšava ukus mekanim sirevima. Suvi listovi nane se manje koriste, ponekad uz neka jela od riba, čime se dobija jedan novi ukus. Ako se kod kuće pravi sirće od povrća, poželjno je staviti u njega nekoliko svežih ili suvih listova nane (Pahlow, 1989).

2.2.7. *Hyssopus officinalis* L. - izop

Rod: *HYSSOPUS*

Familija: Lamiaceae

Poreklo latinskog naziva: prema Flori SR Srbije (Diklić, 1974), potiče od antičkog naziva kod Grka.

Narodni nazivi: blagovanj, isop, miloduh.



Slika 8. *H. officinalis* – izop

Opis vrste: Biljke roda *Hyssopus* L. su višegodišnje, zeljaste, žbunastog izgleda (Diklić, 1974). Vrat korena je drvenast, jako razgranat. Grane mnogobrojne, leže na zemlji ili se izdižu, stabljike uspravne ili se izdižu, visoke i do 80 cm. Listovi skoro sedeći, lancetasti do linearno lancetasti, na vrhu većinom šiljati. Cvetovi dugački 8-12 mm. Čašica im je cevasto zvonasta, sa 15 nerava, iznutra gola sa 5 zubaca, koji su jednaki ili skoro jednaki po dužini sa čašičnom cevi. Krunica je dvousna sa pravom kruničnom cevi; gornja usna krunice je ravna, na vrhu usečena, donja trorežnjevita,

srednji režanj je podeljen na dva mala režnja. Sve vrste roda imaju po četiri prašnika koji vire izvan krunice. Plodovi su jajasto - četvorouglasti.

Rasprostranjenje i stanište: Rasprostranjen je od Altaja i Urala, pored Kaspijskog jezera i Crnog mora, u Bugarskoj, Italiji, Južnoj Francuskoj, Španiji. To je mediteranska biljna vrsta, a njena staništa su uglavnom sušne stene, osuline, pre svega raste na krečnjaku. Za izop se kaže da je to severnoamerička biljka kultivisana u Sredozemlju (Nikolova, Manolov, 1990). U Srbiji je zastupljen subsp. *pilifer*. U Srbiji autohtono najviše uspeva u jugoistočnim predelima, a kao značajno nalazište pominju se planine jugoistočne Srbije. Takođe uspeva i na krečnjacima Karpatsko – Balkanskog sistema (Tupižnica (vrh)), Tresibaba (Golemi kamen), Stara planina (oko Pirota), Svrljiške planine. Raste na sušnim, jako osunčanim stenama, na siromašnim pašnjacima, pre svega na krečnjačkoj podlozi (Diklić, 1974).

Deo biljke koji se koristi: Kao lekoviti deo koriste se izdanci sa listovima ili cvetovima (*Hyssopi herba* ili *H. summitas*) i etarsko ulje (*H. aetheroleum*). *H. officinalis* L. bere se preko leta kada biljka cveta.

Hemijski sastav: Sastojci herbe *H. officinalis* su etarsko ulje, flavonoidi, tanini. U etarskom ulju izopa ima raznih terpena (pinen, kamfen, cineol i dr.). Među prvim podacima koji govore o količini i sastavu etarskog ulja izopa su oni koje navode Nikolova i Manolov (Nikolova, Manolov, 1990). Ispitali su količinu etarskog ulja u raznim biljnim organima *H. officinalis* (cvetu, listu, nadzemnom delu u fazi cvetanja i stabljici). Ustanovili su da je najveća količina etarskog ulja u cvetu (0,9%), zatim u listu (0,66%), nadzemnom delu u fazi cvetanja (0,51%), a najmanje ulja je sadržano u stabljici (svega 0,03%). Sličnim ispitivanjima su se bavili Schultz i Stahl-Biskup (Schultz i Stahl, 1991). Oni su vršili komparativna ispitivanja sadržaja etarskog ulja izopa u cvetu, listu, stabljici i korenu. Rezultati do kojih su došli su pokazali da je pinokamfon najzastupljeniji u listu i to u fazi precvetavanja, izopinokamfona ima takođe najviše u listu ali pre cvetanja, kao i β pinena. Germakren D je najzastupljeniji u listu i to u fazi punog cveta, dok kamfora ima najviše u cvetu. Za sve njih je zajedničko da im je sadržaj najmanji u korenu.

Ispitivanja Sharpe (Sharma *et al.*, 1963) pokazuju da etarsko ulje izopa gajenog u Indiji sadrži kao najzastupljeniju komponentu pinokamfon (46,7%), α -pinen (7,3%), β -pinen (5,3%). Hemijski sastav etarskog ulja izopa gajenog u Severnoj Americi izučavao

je Lawrence (Lawrence, 1992). Najzastupljenije komponente u etarskom ulju ovog izopa su pinokamfon (42,66%), izopinokamfon (30,88%), β -pinen (8,8%) i sabinen (1,2%).

Joulain i Ragault (Joulain i Ragault, 1976) su takođe ustanovili da su najzastupljenije komponente etarskog ulja izopa izopinokamfon (32,6%), β -pinen (22,9%) i pinokamfon (12,2%). U ovom slučaju karakterističan je visok sadržaj β -pinena što nije slučaj kod ranijih ispitivanja.

Kerrola (Kerrola *et al.*, 1994) se bavio ispitivanjem sadržaja etarskog ulja različitih fenotipova izopa pri čemu su korišćene metode ekstrakcije superkričnim CO₂ i ekstrakcije smešom pentana i dietiletra. Uočeno je da postoji razlika u količini zastupljenosti pojedinih komponentata u zavisnosti od fenotipa kao i od primenjene metode izolacije. Ispitivanjem ekstrakcije izopa (*H. officinalis*) primenom postupka destilacije pomoću vodene pare i ekstrakcije maceracijom različitim rastvaračima (voda, etanol, n-butanol, etilacetat) najbolja selektivnost ekstrakcije fenola dobijena je korišćenjem 96 % etanola (Lepojević *et al.*, 2008). Etarsko ulje samoniklog izopa sa područja Crne Gore ispitivao je Gorunović sa saradnicima (Gorunović *et al.*, 1995). Koristeći kombinaciju GC i GC-MS analize, utvrdio je sledeće najzastupljenije komponente ovog ulja: β -pinen (9,6%), limonen (37,40%), pinokamfon (0,05%), izopinokamfon (1,28%) i metil eugenol (38,30%).

Proučavanjem hemijskog sastava izopa bavio se i Grlić (1986). Po njemu glavni sastojci etarskog ulja izopa su pinokamfon i β -pinen. Kao bioaktivni sadržaj izopa, otkrio je flavonske glikozide, saponizid (marubin) i različite soli (naročito KNO₃). U izopu ima saponizida marubina, 0,2% holina, pektina, sluzi, fitosterola, tanina, šećera, raznih soli, naročito KNO₃, a sadržaj etarskog ulja je bio u granicama od 0,5-1% (Tucakov, 1990). Ispitivanjem preko trista vrsta porodice Lamiaceae kojoj pripada i izop utvrđeno je da su one bogate prisustvom flavona i 6-OH-flavon-glikozida.

Upotreba: Izop zauzima izuzetno mesto u narodnoj medicini i kao lek pominje se još od davnina. Koristi se u obliku čajeva, uljanih preparata ili u smeši sa drugim lekovitim biljkama (Tucakov, 1990). Etarsko ulje izopa se upotrebljava u farmaciji, medicini i kozmetici. U medicini se upotrebljava za lečenje plućnih bolesti (Grlić, 1986). Takođe izop je poznat kao: ekspektorans, stomahik, antidijaforetik, sedativ, karminativ, antiseptik. I pored ovoga, primena izopa je još uvek neznatna u medicinskoj

praksi, pa zato njegovo izučavanje ima za cilj bolji uvid u njegov sastav i predstavlja doprinos razvoju domaćoj farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Upotreba u prehrambenoj tehnologiji: Sveži ili osušeni, sitno naseckani listovi, upotrebljavaju se kao začin, za salate, umake, supe, za jela od ribe i mesa. S' obzirom da je miris lista vrlo jak, a ukus nagorak i ljut, dodaje se samo u malim količinama. Kao začin mogu da posluže i cvetovi (Stamenković, 2005). Ekstrakt ove biljke je sastavni deo nekih biljnih likera i rakija. Po Tucakovu (1990) izop je jedna od najvažnijih medonosnih biljaka jer daje ogroman broj cvetova u busenu, cveta preko celog leta i u prvoj polovini jeseni, često do mrazeva i snega, što je od ogromnog značaja za naše krajeve u kojima vlada kontinentalna klima i koji često zbog redovnih sušnih godina imaju izgled pustinje, tako da od druge polovine leta pčele skoro redovno nemaju nikakvu pašu. Med od izopa je prijatan i aromatičan.

2.3. IZOLOVANJE BIOAKTIVNIH SUPSTANCI IZ BILJNOG MATERIJALA

Poslednjih decenija interes svetske industrije, uslovljen velikim ekonomskim pritiskom sa jedne i zaštitom prirode sa druge strane, ponovo je usmeren ka biljnim sirovinama, čega smo i sami svedoci. Danas je poznato oko 18000 aromatičnih i 60000 lekovitih biljaka (Kitić, 2010).

U fitofarmaciji sekundarni metaboliti predstavljaju aktivne supstance biljnog porekla sa snažnim biološkim efektima, dok su u dijetetici i industriji hrane važni fitonutrijenti, konzervansi, začini i aromatične supstance. Terpenoidi, predstavljaju najbrojniju grupu sekundarnih metabolita biljaka. To su sekundarni biljni metaboliti definisani kao mešavina lipofilnih, tečnih, mirisnih i isparljivih komponenti prisutnim u višim biljkama.

Zbog saznanja da moderna medicina ne može pružiti „lek za sve“, ali i zbog činjenice da je prisustvo neželjenih dejstava gotovo neizbežno, poslednjih godina došlo je do porasta interesa za prirodnim, odnosno biljnim lekovima u svetu. Proizvodnja kvalitetnih biljnih ekstrakata predstavlja osnov za proizvodnju biljnih preparata i izolaciju bioaktivnih komponenti koje nalaze široku primenu u farmaceutskoj,

kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji. Određene monografije opisuju postupak pripreme biljnih ekstrakata (infuz, tinktura). U industriji priprema ekstrakata biljnih materijala može biti vršena klasičnim tehnikama kao što su maceracija, perkolacija i destilacija vodom, ili modernim tehnikama koje uključuju natkritičnu ekstrakciju (ekstrakcija gasovima pod visokim pritiskom), ekstrakciju u električnom polju, mikrotalasnu ekstrakciju i ultrazvučnu ekstrakciju. Sa proizvodno-tehnološkog i farmakološkog aspekta u novije vreme je od izuzetne važnosti da biljni ekstrakti za medicinsku, kozmetičku i prehrambenu upotrebu budu standardizovani, tj. da imaju ujednačen sastav sa minimalnim odstupanjem između pojedinačnih serija proizvoda, što se može postići standardizacijom postupaka ekstrakcije ili standardizacijom ekstrakta (Shan *et al.*, 2007).

Kao kriterijum efikasnosti ekstrakcije uzima se prinos suvog ekstrakta ili prinos željene supstance (Vinatoru, 2001). Izbor rastvarača od presudnog je uticaja na stepen i prinos ekstrakcije, ali i na ekonomičnost procesa. Najčešće korišćeni rastvarači su: etanol, etilacetat, glicerol, petrol etar i propilenglikol, dok se drugi organski rastvarači zbog svoje toksičnosti ređe koriste (Vinatoru *et al.*, 1999). Najveću primenu u prehrambenoj industriji i farmaciji našli su vodeno-etanolni rastvori. Pri izboru rastvarača treba posebno obratiti pažnju na dielektričnu konstantu, hidrofilnost, viskoznost i površinski napon rastvarača (Milenović, 2002). Pri mešanju etanola i vode dielektrična konstanta može biti izmenjena u širem opsegu, pa se mogu ekstrahovati mnoge supstance. Rastvarači ne pokazuju uticaj samo na ekstrahovanje određene grupe supstanci, već i na njihovu količinu, tako da optimalni rastvarač ekstrahuje najveću količinu supstanci (Ponomarev, 1976).

Perkolacija je kontinuirana ekstrakcija propisano usitnjene droge pri sobnoj temperaturi koja se izvodi kontinuiranim i ravnomernim proticanjem propisanog rastvarača kroz stub droge u perkolatoru po pravilu odozgo prema dole. Stub droge se priprema u cilindričnoj cevi od stakla ili drugog indiferentnog materijala (perkolator). Perkolira se dok se dobije propisana količina perkolata, odnosno do racionalnog stepena iskorišćenja, što se po pravilu postiže hvatanjem 5 perkolata. Jednim perkolatom smatra se količina perkolata koja po masi odgovara masi droge koja se ekstrahuje. Završetak ekstrakcije može se, osim specifičnim hemijskim reakcijama, ustanoviti ovim načinom: poslednjih 10 ml perkolata mora dati suvi ostatak manji od 25 mg. Za dobijanje biološki

aktivnih komponenti hrane primenjuju se različiti postupci koji su identični postupcima koji se primenjuju za dobijanje fitohemikalija i lekovitih supstanci (ekstrakcija, sinteza, enzimaska hidroliza, frakcionisanje, identifikacija...) (Ph. Jug. IV, 1984).

Etarska ulja dobijaju se korišćenjem klasičnih metoda, kao što su: hidrodestilacija, hladno presovanje i ekstrakcija rastvaračem (Sovilj i Spasojević, 2001). Hidrodestilacija je opšti pojam postupka za dobijanje etarskih ulja iz biljnog materijala koja se može izvesti na tri različita načina: destilacija vodom, destilacija vodom i vodenom parom i destilacija vodenom parom (Smith *et al.*, 2005).

2.3.1. Ekstrakti i bioaktivne supstance u ekstraktima lekovitih i aromatičnih biljaka

Ekstrakti su, koncentrovani izolati tečne, polučvrste ili čvrste konzistencije, dobijeni rastvaranjem aktivnih sastojaka iz uglavnom suvog, biljnog ili životinjskog materijala. Tečni ekstrakti su bistre, obojene tečnosti, mirisa i ukusa na biljne sirovine iz kojih su dobijeni, dok su suvi ekstrakti obojeni praškovi ili rastresiti materijali, po pravilu vrlo higroskopni (Ph. Jug. IV, 1984; Ph. Jug. V, 2000; Ph. Eur., 2010).

Iz razloga velike biološke i fiziološke aktivnosti, kompleksnosti hemijskog sastava, složenosti biosintetskog puta i metabolizma kao i sve veće mogućnosti primene u raznim oblastima industrije, biljni ekstrakti, posebno njihova fenolna i flavonoidna jedinjenja, nalaze se već dugi niz godina na vrhu aktuelnosti fundamentalnih i primenjenih istraživanja.

Biljni polifenoli

Biljna polifenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti karakteristične aromatične strukture, koji se mogu klasifikovati u petnaest grupa prema osnovnom delu svog molekula, od kojih su fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, antocijanidi, hinoni, katehini i tanini samo neki od njih (Đilas *et al.*, 2002). Polifenolna jedinjenja su različitih strukturnih karakteristika, sa fenolnim jezgrom kao osnovnim konstituentom. Prema broju fenolnih subjedinica mogu se podeliti na proste fenole (sa jednim fenolnim prstenom) i polifenole (sa dva i više fenolna prstena). Do sada je identifikovano oko

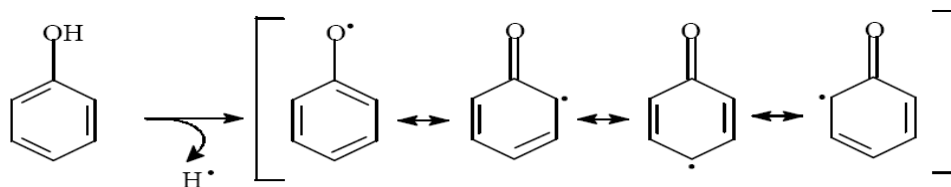
8000 jedinjenja koja pripadaju ovoj kategoriji (Robbins, 2003). Izvestan broj polifenolnih jedinjenja zastupljen je i u životinjskom svetu, ali većina ih je biljnog porekla. U jestivim biljkama je identifikovano nekoliko hiljada prirodnih polifenolnih jedinjenja (Shahidi i Naczk, 1995). Biosinteza fenolnih jedinjenja u biljnom svetu vezana je za transformaciju šikimata, preko biosintetskog puta šikimske kiseline ili za transformaciju β -poliketo lanaca, dobijenog acil-polimalonatnim putem.

Najnovija istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da ekstrakti biljaka sadrže fenolne kiseline, flavone, izoflavone, flavanole, katehine, tokoferole, tanine, terpene, te da pokazuju antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska, antibakterijska i antioksidantna svojstva (Capasso *et al.*, 2005). Zbog svojih pomenutih aktivnosti, kao i njihove sposobnosti da menjaju funkciju nekih ključnih ćelijskih enzima mnoga polifenolna jedinjenja su poslednjih godina privukla pažnju naučnika koji se bave medicinom i hemijom hrane (Chi-Tang *et al.*, 1992; Mattila *et al.*, 2006). Kao prirodni izvori polifenolnih jedinjenja u literaturi se najčešće spominju začinsko i lekovito bilje. Poznato je da su divlje vrste biljaka od gajenih vrsta vitaminski daleko bogatije, a po količinama divljeg lekovitog bilja naša zemlja spada u one koje su bogatije ovom sirovinom.

Smatra se da polifenolna jedinjenja ispoljavaju antioksidantnu aktivnost na sledeće načine: predajom H-atoma, direktnim vezivanjem („hvatanjem“) slobodnih kiseonikovih i azotovih radikala, heliranjem prooksidativnih metalnih jona (Fe, Cu) i inhibicijom prooksidativnih enzima (lipoksigenaza, mijeloperoksidaza, ksantinoksidaza, NAD(P)H oksidaza, enzimi citohroma P-450) (Robbins *et al.*, 2003).

I pored široke rasprostranjenosti kao i dokazanih lekovitih svojstava polifenolnih jedinjenja, ozbiljnije proučavanje njihovih antioksidantnih dejstava počinje prošlog veka tek sredinom devedesetih godina (Scalbert *et al.*, 2005). Konstatovano je da polifenolna, kao i mnoga druga bioaktivna jedinjenja koja ulaze u sastav prirodnih bioaktivnih proizvoda, pokazuju antioksidantnu aktivnost, tj. da njihovi molekuli, prisutni u malim količinama u velikoj meri inhibiraju ili u potpunosti sprečavaju oksidaciju lipida, proteina, ugljenih hidrata i DNK (Halliwell i Whiteman, 2004). Od velike važnosti za biljke su polifenolna jedinjenja jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri (lignini) koji kao mehanička barijera u odbrani od mikroorganizama imaju veliki značaj.

Antioksidantna aktivnost polifenolnih jedinjenja se zasniva uglavnom na njihovim oksido-redukcionim osobinama, sposobnošću neutralisanja slobodnih radikala doniranjem vodonikovog atoma ili elektrona, heliranja metalnih jona u vodenim rastvorima, kao i u gušenju procesa formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Petti i Scully, 2009). Smatra se da je antioksidantna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i kao takvi neutrališu slobodne radikale, uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala (slika 9). Povećana stabilnost fenoksil radikala objašnjava se delokalizacijom elektrona uz postojanje više rezonantnih formi. Sa povećanjem stabilnosti formiranog fenoksil radikala povećava se mogućnost nastajanja rekombinantnih reakcija koje dovode do terminacije slobodno-radikalskih procesa (Ohshima *et al.*, 1998).



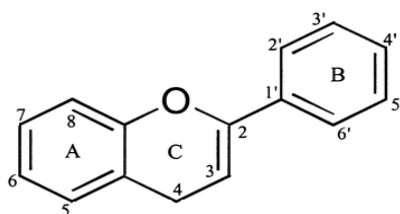
Slika 9. Rezonantna stabilizacija radikala koji nastaje iz fenola (Ohshima *et al.*, 1998)

Flavonoidi

Najveću grupu biljnih polifenola čine flavonoidi (Rice-Evans *et al.*, 1996) koji su prisutni u biljnim plodovima, u listovima, semenu, kori i cvetovima biljaka, povrću, voću, cveću, čaju, crvenom vinu, (Rice-Evans *et al.*, 1996; Merken i Beecher, 2000). Oko 10000 različitih flavonoida je poznato do sada (Tahara, 2007). Ova grupa jedinjenja obuhvata flavonole (kemferol i kvercetin, najprisutniji u hrani), flavone, izoflavone, flavanone, antocijanine, (pigmenti bilja od kojih potiče miris i boja većine biljaka) i flavanole (katehini – monomeri i proantocijanidini – polimeri, poznati kao kondenzovani tanini) halkone i aurone, pri čemu se u prirodi najčešće javljaju u obliku glikozida (Cook i Samman, 1996). U biljnom materijalu fenolna i polifenolna jedinjenja javljaju se u slobodnom obliku, ali se mnogo češće javljaju u obliku svojih derivata. Najčešći su O-glikozidi flavonoida, posebno antocijanidini, O-metil i metilen-dioksi derivati polifenola, kao i sulfati flavonoida (Čanadanović-Brunet, 1998). Kada je u

pitanju biosinteza flavonoida ista se odvija kroz deo fenilpropanoidnog biosintetskog puta kroz koji nastaju i drugi sekundarni metaboliti, kao što su fenolne kiseline, lignini, lignani i stilbeni, pri čemu su ključni prekursori fenilalanin (dobijen iz šikimatnog i arogenatnog biosintetskog puta) i malonil-CoA (izveden iz citrata u Krebsovom ciklusu dobijenog).

Termin „flavonoid“ predložili su 1952. godine Geisman i Hinseinner za determinaciju svih biljnih pigmenata, koji imaju C₆-C₃-C₆ skelet, u kojima su dva benzenova prstena povezana preko C-3 jedinice (Janićijević *et al.*, 2008). Središnji heterociklični prsten se označava kao prsten C dok se fenil grupe označavaju se kao prstenovi A i B (slika 10) (Marais *et al.*, 2006).



Slika 10. Strukturna formula flavonoidnih jedinjenja (Janićijević *et al.*, 2008)

Flavonoidi su u vodi rastvorni žuti, crveni ili ljubičasti pigmenti rasprostranjeni u svim biljnim organima. Iz biljaka je izolovano i proučeno preko 3000 flavonoida koji su, s obzirom na stepen oksidacije centralnog piranskog prstena, podeljeni u dvanaest klasa: *flavoni*, *izoflavoni*, *flavanoni*, *flavonoli*, *flavanoli*, *flavani*, *katehini*, *antocijanidini*, *leukoantocijanidin*, *halkoni*, *dihidrohalkoni* i *auroni*.

Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture koje su uslovljene reakcijama hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanja neorganskog sulfata i glikolizacijom hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidnog jezgra (C-glikozidi).

U svim zelenim biljkama rasprostranjeni su flavonoidi, a njihovo prisustvo je identifikovano i u nižim organizmima. Najrasprostranjeniji su flavonoli i flavoni. Kvercetin, kempferol i miricetin su najzastupljeniji flavonoli, a od flavona najpoznatiji su luteolin i apigenin. Mestimično i u manjem broju biljnih vrsta pojavljuju se halkoni, auron, flavanoni, dihidrohalkoni i izoflavoni. Od pomenutih flavanoni i izoflavoni su bezbojni, dok halkoni i auron predstavljaju žute cvetne pigmente.

Činjenice da flavonoidi imaju pozitivan efekat na zdravlje doprineli su naglom porastu upotrebe biljnih flavonoida kao konstituenta funkcionalne hrane. Treba imati u vidu da povećan i nekontrolisan unos flavonoida može da ima prooksidativnu aktivnost, prouzrokuje mutagene procese i inhibira ključne enzime u metabolizmu hormona (Skibola i Smith, 2000). Otpuštanje vodonika, „hvatanje“ radikala i heliranje metala su antioksidantni mehanizmi koji su karakteristični za flavonoide. Broj i položaj hidroksilnih grupa kao i kod ostalih polifenolnih antioksidanata utiče na antioksidantnu aktivnost. Tako je miricetin (tri hidroksilne grupe) aktivniji od kvercetina (dve hidroksilne grupe) i hesperitina (jedna hidroksilna grupa).

Prisustvom dve hidroksilne grupe u *orto* položaju u B prstenu uslovljeno je efektivno otpuštanje vodonika. Sposobnost otpuštanja vodonikovog atoma dodatno povećava hidroksilna grupa u položaju 5' B prstena i položaju 3 C prstena. Na povećanje sposobnosti otpuštanja vodonikovog atoma takođe imaju uticaj hidroksilne grupe u položajima 5, 8 ili 7, 8, ali ne i 5, 7 u A prstenu. Karbonilna grupa u položaju 4 i 2, 3 dvostruka veza u C prstenu nema uticaja na ovaj mehanizam antioksidantne aktivnosti.

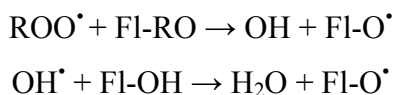
Na antioksidantnu aktivnost flavonoida utiču: prisustvo dve hidroksilne grupe u *orto* položaju u B prstenu, karbonilna grupa u položaju 4 C prstena. Hidroksilna grupa u položaju 3 C prstena nema uticaja, dok je uticaj 2, 3 dvostruke veze u C prstenu još uvek nejasan. Husain i sar. (1987) smatraju da ova strukturna karakteristika nema uticaja na antioksidantnu aktivnost flavonoida, dok Foti i sar. (1996) ukazuju da je ova dvostruka veza u konjugaciji sa karbonilnom grupom u položaju 4 C prstena i učestvuje u stabilizaciji radikala flavonoida delokalizacijom elektrona.

Zbog svoje specifične strukture koja se može povezati sa brojem i pozicijom hidroksilnih grupa u molekulu, flavonoidi su izuzetni prirodni antioksidanti tako da se može reći da je antioksidantna aktivnost flavonoida posebno značajna (Toda i Shirataki, 2001). Prisustvo flavonoida dovodi do suzbijanja nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta inhibicijom enzima ili helatizacijom metala u tragovima koji učestvuju u stvaranju slobodnih radikala. Ova polifenolna jedinjenja inhibiraju oksidaciju lipida, inhibiraju neke enzimske sisteme, utiču na nastajanje i transformaciju peroksil radikala i dr. (Ćetković, 2008). Flavonoidi su poznati „hvatači“ superoksid anjon i hidroksil radikala

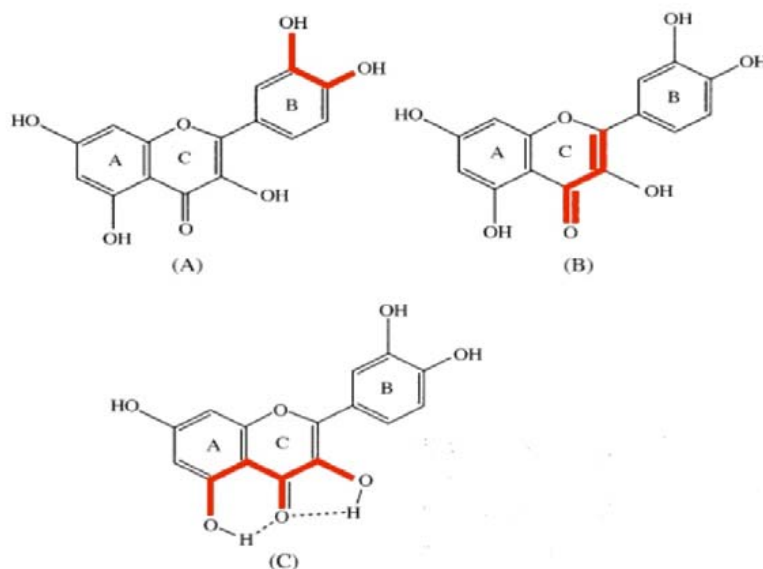
(Halliwell, 2008) i sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u vodenom rastvoru uporediva je ili nekoliko puta bolja od askorbinske kiseline i tokoferola (Boik, 2001).

Zaštitni efekat flavonoida je dokazan *in vitro* (Madhujith i Shahidi, 2006). Nekoliko novijih studija hemijske analize izolata iz biljnih vrsta porodice Lamiaceae govori o njihovom flavonoidnom profilu. Glavne komponente su flavoni i njihovi 6-metoksi derivati, dok su flavonoli ređe prisutni (Tomás-Barberán *et al.*, 1992). Tradicionalna upotreba mnogih lekovitih biljaka može se pripisati prisustvu flavonoida koji ispoljavaju širok spektar profilaktičkog i terapijskog delovanja (Barros *et al.*, 2010). Oni poseduju antibakterijsku, antifungalnu, antiviralnu, antiinflamatornu aktivnost, deluju povoljno na kardiovaskularni sistem i dr. (Al-Bayati, 2009). Pored uloge koju imaju kao biljni pigmenti, flavonoidna jedinjenja u biljnim sistemima imaju ulogu i u zaštiti od UV zračenja i slobodnih radikala, modulaciji aktivnosti enzima, alelopatiji, privlačenju i odbijanju insekata, zaštiti od virusa, bakterija i gljiva, klijanja polena i drugo (Pourcel *et al.*, 2006). Dokazana je visoka antioksidantna aktivnost u razlicitim *in vitro* sistemima za mnoge flavonoide (Ohshima *et al.*, 1998; Mimica-Đukic i Božin, 2008).

Kao antioksidanti flavonoidi deluju mehanizmom hvatanja slobodnih radikala (Cotelle *et al.*, 1992) zbog čega nastaje flavonoidni fenoksidni radikal koji je manje reaktivan:



Za sposobnost hvatanja radikala važne su glavne strukturne funkcije flavonoida: o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja radikalima daje stabilnost i omogućava delokalizaciju elektrona; 2,3-dvostruka veza u konjugaciji sa 4-keto grupom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena; hidroksilne grupe na položajima 3- i 5- koje vodonikovu vezu sa keto grupom osiguravaju (slika 11) (Pokorny *et al.*, 2001).



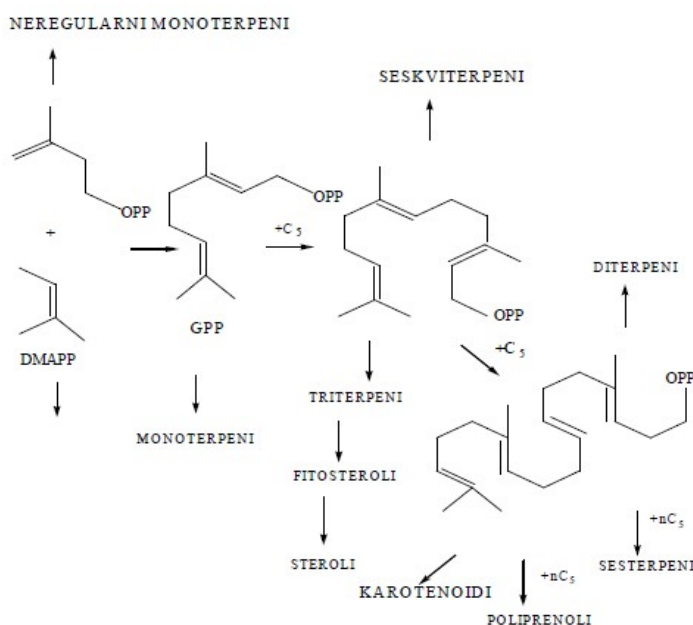
Slika 11. Strukturne grupe važne za hvatanje slobodnih radikala

2.3.2. Etarska ulja i bioaktivne supstance u etarskim uljima lekovitih i aromatičnih biljaka

Za proizvodnju ili pripremu ekstraktivnih preparata iz biljnih sirovina koriste se različite tehnike separacije, a najčešće ekstrakcija rastvaračima (ekstrakcije čvrsto-tečno) i hidrodestilacija. Ekstrakcijom rastvaračem dobija se ekstrakt, a hidrodestilacijom etarsko ulje. Aromatične biljke su izvor etarskih ulja i ona biljkama daju karakterističan miris i aromu. Predstavljaju specifične, najčešće tečne produkte biljnog tkiva. Etarska ulja su kompleksne smeše različitih hemijskih jedinjenja (u jednom etarskom ulju može se naći i do 800 jedinjenja). Etarska ulja su sekundarni metaboliti biljaka i definišu se kao kompleksne smeše aromatičnih, isparljivih komponenti koje se sintetišu i skladište u specijalnim sekretornim strukturama biljaka (Bakkali *et al.*, 2008). Pripadaju velikoj porodici prirodnih jedinjenja-lipidima. Dominantna grupa jedinjenja etarskog ulja su terpeni (mono-, seskvi- i diterpeni, kao i njihovi oksidovani produkti). Pored terpena, u etarskim uljima mogu se naći i druga isparljiva jedinjenja: alifatična (tipa dodekana, tridekana, tetradekana, dekanola, metildodekanala, metiloleata i dr.), aromatična (derivati benzoeve kiseline, fenilpropanoidi, kumarini, eugenol, safrol, miristicin,

koniferilalkohol i apiol) i specifična jedinjenja koja sadrže sumpor (najčešće izosulfocijanati i organski disulfidi) i azot (derivati indola ili alifatični amini).

Biosinteza osnovnih klasa terpenoida odvija se prema tzv. „biogenetskom pravilu“ koje je ustanovio Ružička (1953. god.), što sugerise da se sve klase izoprenoida sintetizuju iz biohemijski „aktivnog izoprena“ (slika 12). Biohemijski aktivne izoprenske jedinice se identifikuju kao piro-fosfatni (difosfatni) estri i to kao dimetilalil pirofosfat (DMAPP) i izopentenil pirofosfat (IPP).



Slika 12. Biogenetsko izoprensko pravilo (Ružička i sar., 1953)

Etarska ulja su prirodni antioksidanti i nemaju dug vek trajanja. Moraju se čuvati na hladnom mestu, u tamnim staklenim ili porculanskim bocama, sa brušenim staklenim ili silikonskim poklopcima. Iz biljnih organa se etarska ulja mogu izolovati na više načina. Koji će se postupak primeniti, zavisi od primene ulja, biljne sirovine, kvalitativnog i kvantitativnog efekta, ekonomije postupka i od same biljke. Cilj je da se dobije maksimalna količina kvalitetnog etarskog ulja.

Na kvalitet etarskog ulja utiču karakteristike droge. Etarska ulja se u biljci nalaze u žlezdama i sekretornim organima, pa ne postoji direktan kontakt ulja sa vodom ili vodenom parom. Posledica toga je povećana potrošnja pare i duže vreme trajanja destilacije, zbog čega je priprema biljnog materijala od velikog značaja. Da bi se eliminisala molekulska difuzija, biljni materijal se usitnjava. Ukoliko je mlevenje finije,

kontakt biljnog materijala i vodene pare je bolji, ali tom prilikom može doći do gubitaka lakše isparljivih komponenata, oksidacije, osmoljavanja i formiranja kompaktne mase kroz koju para teško prodire. Nasuprot tome, grubo sitnjenje produžava vreme destilacije i dovodi do gubitka komponenata lakše rastvornih u vodi.

Dobijanje i korišćenje etarskih ulja potiče još iz starog Egipta, Persije, Grčke i Rima, kada su upotrebljavana u balsamovanju i konzerviranju hrane zbog svog antimikrobnog dejstva (Burt, 2004), dok se od srednjeg veka koriste i kao lekovi za smirenje, protiv upalnih procesa, kao spazmolitici, antiparazitici ili lokalni anestetici. Do današnjih dana, ove karakteristike se nisu bitno izmenile samo što je proučen njihov sastav i razjašnjen mehanizam delovanja, pogotovo na mikroorganizmima (Bakkali *et al.*, 2008). Od oko 3000 poznatih etarskih ulja, trenutno oko 300 ima komercijalni značaj, bilo u farmaciji, bilo u kozmetici, prehrambenoj industriji, industriji parfema, konzervanasa i aditiva u prehrambenoj industriji, industriji alkoholnih i bezalkoholnih pića (Kišgeci, 2008; Bakkali *et al.*, 2008; Chemat *et al.*, 2007).

Retko je primećeno da etarska ulja ispoljavaju hroničnu toksičnost. Malo je podataka o eventualnom mutagenom i kancerogenom delovanju etarskih ulja, odnosno pojedinih komponenti etarskih ulja. Međutim, pojedine komponente u većim količinama mogu ispoljiti toksično dejstvo. Sve ovo ukazuje na potrebu da se izolovana etarska ulja moraju pažljivo primenjivati, naročito u prehrambenoj industriji, aromoterapiji, danas veoma popularnom načinu lečenja, ali i prilikom drugih primena.

Tujon ($C_{10}H_{16}O$) je bezbojna tečnost sa aromom mentola. To je keton i monoterpen, i javlja se u dva oblika: α -tujon i β -tujon. Tujon je monoterpenoid poreklom iz biljaka roda *Artemisia* i *Thuja*. Ove biljne vrste se koriste pri izradi brojnih alkoholnih pića kao aromatici i sredstva koja poboljšavaju ukus. Codex Alimentarius (2003), postavlja sledeće maksimalno dozvoljene količine tujona: 0,5 mg/kg u hrani i piću sa izuzetkom od 5 mg/kg u alkoholnim pićima sa ne više od 25% zapremine alkohola; 10 mg/kg u alkoholnim pićima sa više od 25% zapremine alkohola; 25 mg/kg u namirnicama koje sadrže preparate na bazi žalfije; 35 mg/kg u gorkim pićima. Tujon nije dozvoljen za upotrebu kao začim u SAD.

Korišćenje čistog etarskog ulja i alkoholnog ekstrakta *S. officinalis* ne preporučuje se u trudnoći. Tradicionalno se zna da služi kao abortifacientno sredstvo i da stimuliše menstrualni ciklus. Ulje sadrži veliku količinu *cis*- i *trans*-tujona (30-60 %), koji su

poznati kao abortifacijenti i emenagogici, a spadaju u red toksičnih jedinjenja. Takođe se smatra da porfirija, bolest koja se karakteriše poremećajima metabolizma porfirina i njihovog krajnjeg proizvoda hema, može biti posledica dugotrajne upotrebe pelina ili likera ove biljke (Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone; Scientific Committee on Food, 2003).

U komponente slične tujonu spadaju i timol i karkavol. Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol) i timol (2-izopropil-5-metilfenol) su izomeri i predstavljaju monoterpenske fenole sa jakim antiseptičkim dejstvom. Zbog svog dejstva imaju višestruku primenu. Prisutni su u eteričnim uljima mnogih biljaka iz porodice Lamiaceae: *Thymus vulgaris*, *T. serpyllum*, *Origanum vulgare*, *Satureja thymbra*, *Thymbra capitata*.

Kao osnovne sirovine biljnih droga za dobijanje karvakrola i timola koriste se timijan i majkina dušica. Karvakrol i timol imaju sve veću primenu kako u narodnoj tako i u naučnoj medicini, zbog svog višestrukog dejstva i veoma malo neželjenih efekata. Oni su predmet istraživanja poslednjih godina i mnoge kliničke studije su dokazale njihovu upotrebu kod lečenja raznih oboljenja kao i primenu u profilaksi i svakodnevnom životu. Druga komponenta koja se u literaturi navodi kao rizična jeste kamfor. Dostupni toksikološki podaci za estragol ukazuju na njegovo moguće štetno dejstvo slično safrolu (Public Statement on the Use of Herbal Medicinal Products Containing Estragole; Committee on Herbal Medicinal Products, EMEA). Estragol je komponenta mnogih biljaka i njihovih ulja: pelin (*Artemisia dranunculus* L.), jasenak (*Dictamnus albus* L.), morač (*Foeniculum vulgare* Mill.), izop (*Hyssopus officinalis* L.), bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), anis (*Pimpinella anisum* L.) i dr.

Prema dokumentu koji je izdala EFSA – European Food Safety Authority, Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substances of concern (2009), za mnoge biljke je poznato koje supstance imaju toksičan efekat.

Nasuprot tome uobičajene biljke kao što su cimet, beli luk, crni luk, korijander, origano, kardamom i mint su jestivi, i samim tim i njihova ulja. To ne znači da ova jestiva ulja treba koristiti do neprijatnosti. Baš nasuprot, samo male do srednjih doza takvih biljnih ulja su dokazano bezbedna i samo ona koja su postavljena na FDA-ovu GRAS listu (Generalno vodi se kao bezbedno), možemo koristiti. Ulje origana je jedno takvo ulje.

2.3.3. Uticaj proizvodnog postupka na biološki aktivna jedinjenja

Mnoge biološki aktivne supstance su tokom prerade i stajanja nestabilne. Iste podležu mnogim poznatim reakcijama, kao što su oksidacija, termička degradacija i Maillard-ova reakcija, hidroliza, koje dovode do smanjenja njihove bioaktivnosti. Prerada sa druge strane može takođe dovesti do nastanka novih bioaktivnih jedinjenja. Neka od novonastalih jedinjenja, posebno iz belog luka, soje, čaja i mlečnih proizvoda su se pokazala efikasnim u prevenciji i tretmanu različitih oboljenja.

Povoljan efekat bioaktivnih jedinjenja u svakom slučaju, direktno zavisi od primenjenog postupka prerade u proizvodnji namirnica. Boljim razumevanjem mehanizama i kinetike reakcija bioaktivnih jedinjenja tokom primenjenog postupka prerade, otvara se i mogućnost modifikovanja postupka u smislu smanjenja njegovog nepovoljnog dejstva, kao i potenciranja pozitivnih efekata. Osim ovoga, najnovije tehnologije u proizvodnji hrane (ne-termički tretman) i čuvanja (modifikovana atmosfera) postaju sve raznovrsnije i usložnjenije. Novi literaturni podaci jasno ukazuju na vezu između primenjenih postupaka prerade i bioaktivnih komponenti.

Uočeni značaj antioksidanata dugo je inicirao potrebu da se i veštački sintetišu. Naravno to je negativno sa nekog drugog stanovišta pa se vraćamo prirodi. Veliki interes za prirodne antioksidante rezultat je svetskog trenda minimiziranja upotrebe ili potpunog eliminisanja sintetičkih prehrambenih aditiva zbog njihovog potencijalnog štetnog dejstva.

Međutim, i prirodni antioksidanti imaju nedostatke, na primer slaba otpornost prema kiseoniku, svetlosti, visokim temperaturama i sušenju. Prema tome, i antioksidanti prisutni u hrani, kao i ostale komponente, se menjaju tokom procesa prerade hrane. Promene u antioksidantnoj aktivnosti hrane rezultat su hemijskih promena antioksidantnih jedinjenja prisutnih u proizvodu, a rezultat ovih promena može različito da utiče na krajnji antioksidantni status prehrambenog proizvoda.

2.3.3.1. Uticaj načina sušenja na aktivnost biološki aktivnih supstanci

Sušenje je jedan od najstarijih i najlakših načina konzervisanja biljnog materijala. Predstavlja najbolji način čuvanja, jer se sprečava razvoj mikroorganizama i zaustavljaju enzimski procesi. Naime, dovođenjem toplote se najveći deo aktivne vode iz namirnice udalji i enzimi mikroorganizama gube aktivnost. Vršiti se direktno na suncu ili u hladu, na promajnom mestu, ili u termičkim sušarama na tačno određenoj temperaturi. Zasniva se na principu kseroanabioze. Dovedena energija za isparavanje vode delom služi i kao energija aktivacije za mnoge procese pri čemu se menjaju nutritivna, ali i senzorna svojstva. Posebno je to značajno kod lekovitog i začinskog bilja jer se njihova upotrebna vrednost zasniva na prisustvu različitih polifenola.

Etarska ulja su lokalizovana u različitim delovima biljaka i uslovi sušenja se propisuju za svaku drogu. Tako, temperatura sušenja plodova biljaka porodice Apiaceae ne sme da bude viša od 45 °C, a za nadzemne organe biljaka porodice Lamiaceae ne sme da bude viša od 35 °C. Vlaga koja zaostaje u drogi posle sušenja označava se kao primarna, a ona koju droga naknadno upije usled nepropisnog čuvanja sekundarna. Nedovoljno osušena ili nepropisno čuvana droga (naknadno je upila nedozvoljenu količinu vlage), veoma lako se kvvari.

Sušenje proizvoda smanjuje biohemijske i mikrobiološke degradacije (Tarhan *et al.*, 2010). Od načina sušenja u dobroj meri zavisi i kvalitet osušene biljne droge. Neadekvatno sušenje može da prouzrokuje mikrobiološko onečišćenje, gubitak aktivnih sastojaka, kao i neželjenu promenu izgleda, što dovodi do smanjenja kvaliteta sirovine.

Uslovi sušenja se određuju prema strukturi biljnog materijala i hemijskoj prirodi aktivnih lekovitih sastojaka (Kišgeci, 2008). Osnovni pokazatelj uspeha procesa sušenja je stepen nastalih promena sastojaka sirovine (izuzev vode) čime se ustvari definiše njihov kvalitet. Iako termički tretmani imaju za cilj poboljšanje senzorne vrednosti hrane, kao posledica izlaganja visokim temperaturama mogu nastati i promene konstituenta hrane, smanjenje njihove nutritivne vrednosti, promene teksture, ali i hemijske promene antioksidanata. Sa povećanjem temperature sušenja smanjuje se prinos ekstraktivnih materija, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, a samim tim i antioksidantni potencijal ekstrakata. Znači, smanjuje se kvalitet biljne sirovine u smislu

lekovitog delovanja (Stanisavljević *et al.*, 2012). Niska temperatura sušenja, ispod 40°C, ne ugrožava hlorofil kod bilja. Zato lišće i posle sušenja ostaje prirodno zeleno.

Propisno osušen biljni materijal pakuje se u različitu ambalažu (papirne, jutane ili platnene vreće, odnosno sanduke i kutije od kartona, drveta, metala, plastike) zavisno od količine i vrste biljnog materijala. Dobro zapakovan osušeni biljni materijal se čuva na suvom mestu, u provetrenim prostorijama zaštićen od uticaja sunca. Relativna vlažnost vazduha u skladištima bi trebala da bude ispod 60%, a temperatura ne viša od 25 °C (Ph. Jug. V, 2000).

Tokom procesa sušenja biljnog materijala smanjuje se sadržaj vlage, ali se menja i količina i sastav isparljivih jedinjenja (Moyler, 1994). Etarska ulja koja daju specifičnu aromu i ukus začinskom i lekovitom bilju, dve su najvažnije kvalitetne komponente koje se u procesu sušenja moraju sačuvati u najvećoj mogućoj meri. Režim sušenja, uglavnom najviša dozvoljena temperatura vazduha, bitno utiče na degradaciju ovih materija. Na osnovu dosadašnjih saznanja, vrednosti maksimalne temperature vazduha tokom procesa konvektivnog sušenja su oko 45°C. Način sušenja ima značajan uticaj na kvalitativni i kvantitativni sastav etarskih ulja aromatičnih biljaka. Pojedine biljke se neposredno posle branja podvrgavaju procesu destilacije (zbog isparavanja etarskih ulja ili enzimskih transformacija), kao što je slučaj sa ružom i lavandom, dok se neke (gorki badem, slačica) suše duže vreme zbog enzimske hidrolize glikozidno vezanih komponenata, od čijeg sadržaja zavisi aroma. U pojedinim slučajevima preporučuje se odvajanje delova biljke i njihova posebna obrada, zbog različitog sadržaja ulja i različitog hemijskog sastava.

2.4. PREVENCIJA OKSIDATIVNOG STRESA ISHRANOM

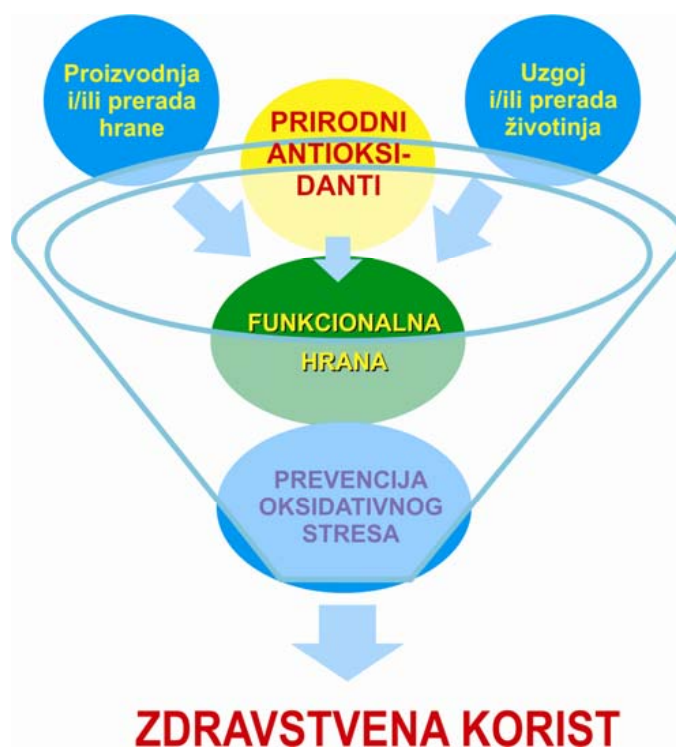
U poslednje dve decenije mnogo pažnje je posvećeno prirodnim antioksidantima zbog uočene veze antioksidanata i slobodnoradikalnih mehanizama u ljudskom organizmu. Naime, ishrana bogata snažnim antioksidantnim agensima, poput askorbinske kiseline, vitamina E, karotenoida ili biljnih fenola, zahvaljujući sposobnosti ovih jedinjenja da smanjuju nivo slobodnoradikalnih vrsta, može da utiče na prevenciju, ali i da ima terapeutsko dejstvo u slučaju bolesti povezanih sa oksidativnim stresom. Polifenoli su najzastupljeniji antioksidanti u ishrani i njihov preporučeni

dnevni unos iznosi od 20 mg do 1 g/dan, što je mnogo više nego za bilo koju drugu klasu fitonutritijenta (deset puta više nego vitamina C i sto puta više nego vitamina E i karotenoida) (Scalbert *et al.*, 2005). Flavonoidna jedinjenja zastupljena su u gotovo svim biljnim vrstama, pri čemu su flavonoidi u užem smislu najrasprostranjeniji. Velika razlika u preporučenim dnevnim dozama prema različitim autorima, potiče od nedostatka informacija o njihovoj apsorpciji, kasnijoj distribuciji, metabolizmu i ekskreciji kod ljudi. Na apsorpciju i metabolizam polifenola iz hrane primarno utiče njihova hemijska struktura, konjugacija sa drugim fenolima, molekulska masa, rastvorljivost i stepen polimerizacije (Wollgast i Anklam, 2000). Sadržaj polifenola u biljnom materijalu kreće se od nekoliko miligrama do nekoliko stotina miligrama u 100 g svežeg biljnog materijala, što je u pojedinim slučajevima i do sto puta više od sadržaja vitamina sa antioksidantnim osobinama u biljnom materijalu (Fukushima *et al.*, 2009).

Epidemiološka ispitivanja potvrđuju teoriju, da rani razvoj bolesti uzrokovanih reaktivnim kiseoničnim vrstama mogu da spreče prirodni antioksidanti. Zato, kada se konzumira hrana bogata prirodnim antioksidantima (prirodni sokovi, voće, povrće, vino, žitarice, čokolada, itd.) kao i prerađena hrana obogaćena istim, obezbeđuje željeni antioksidantni status i pomaže prevenciji razvoja bolesti u kojima je oksidativni stres glavni uzročnik. Zdravstvena korist upotrebe hrane obogaćene prirodnim antioksidantima prikazana je na slici 13.

Veliki izazov koji se nameće naučnicima na polju nutricionizma, hemije hrane i fiziologije, je određivanje optimalnog unosa prirodnih antioksidanata u funkcionalnu hranu. Za to je potrebno dobro poznavanje metabolizma ovih supstanci, apsorpcije, distribucije i biološke raspoloživosti, njihovih mehanizama konjugacije u organizmu i samog eliminisanja metabolita.

Sve više se radi na pronalaženju novih antioksidanata visoke antioksidantne moći, niske toksičnosti, i dobre rastvorljivosti u vodenoj i lipidnoj fazi, u cilju proizvodnje nove i raznovrsne funkcionalne hrane koja bi uticala na poboljšanje kvaliteta života. Utvrđeno je da je antioksidantna aktivnost jedne čaše crnog vina (150 ml) ekvivalentna aktivnosti 12 čaša belog vina, dve šolje čaja, 3,5 čaše soka od borovnice ili piva, 4 jabuke, 5 glavica luka, 5,5 patlidžana, 7 čaša soka od pomorandže i 20 čaša soka od jabuke (Paganga *et al.*, 1999).



Slika 13. Prirodni antioksidanti, funkcionalna hrana i zdravstvena korist
(Hardy, 2000)

2.4.1. Značaj funkcionalne hrane

Prema FUFOSSE, namirnica se može smatrati funkcionalnom ukoliko sadrži sastojke (nutritivne ili nenutritivne) koji povoljno deluju na jednu ili više funkcija u organizmu i to izvan okvira nutritivnih efekata koji su uobičajeni i na način bitan za održavanje dobrog opšteg zdravstvenog stanja organizma ili za smanjenje rizika od bolesti (Diplock *et al.*, 1999). Za specifično delovanje funkcionalnih namirnica (nutraceutika) odgovorne su biološki aktivne materije. Biološki aktivne komponente mogu da se dobijaju iz različitih sirovina i u tu svrhu najčešće se koriste biljni ekstrakti, namirnice biljnog i životinjskog porekla, proizvodi mikrobiološke fermentacije, mikroorganizmi, mikronutrienti, makronutrienti ili nenutritivne komponente (Richardson, 1998).

Upotreba usitnjenog lekovitog i aromatičnog bilja kao i odgovarajućih izolata (ekstrakti, tinkture, etarska ulja...) u novim prehrambenim proizvodima se svakodnevno povećava, kao i odgovarajuća saznanja potrošača, a i sama prihvatljivost takvih proizvoda. Lekovito i aromatično bilje ima veliku primenu i na senzorne osobine

prehrambenih namirnica, a njihovi izolati obezbeđuju bolju svarljivost i iskorišćavanje hrane, konzervišu i produžavaju njenu svežinu. Zbog svega napred navedenog ekstrakti i koncentracije se koriste u industriji alkoholnih i bezalkoholnih, osvežavajućih napitaka (Kovačević, 2004).

Funkcionalne namirnice su razvijene u skoro svim kategorijama hrane. Potrošači stalno zahtevaju od hrane da pruži ne samo senzorni kvalitet (na primer ukus), nego da je korisna za zdravlje. Veliki broj studija ukazuje na to da se povećanim konzumiranjem voća, povrća i aromatičnih biljaka smanjuje rizik od pojave bolesti kao što su kancer, kardiovaskularne, neurodegenerativne bolesti i dijabetes.

Hrana se smatra funkcionalnom ako sadrži sastojak koji korisno deluje na jednu ili više ciljnih funkcija u organizmu i time poboljšava opšte zdravstveno stanje ili smanjuje rizik od oboljevanja. Takođe može de bude aktivna fiziološki i psihološki za razliku od tradicionalne hrane. Tako nauka o funkcionalnoj hrani postaje nova istraživačka disciplina. Međutim tvrdnja da je određeni proizvod funkcionalna hrana ili hrana sa posebno korisnim svojstvima mora da se temelji na naučnim saznanjima. U tom cilju bi se identifikovali biomarkeri, sposobni za procenu aktivnih činilaca koji imaju modulatornu ulogu u ciljnim tkivima, kao i specifični biološki odgovor koji je u neposrednoj vezi ili sa rizikom za oboljevanje ili sa očuvanjem zdravlja. Životinja ima direktni uticaj na kvalitet mesa, mleka i jaja, bilo pozitivan ili negativan. Preko sastava obroka za životinje može se uticati na kvalitet proizvoda životinjskog porekla i mogu se postići različite nutritivne, organoleptičke, hemijske, fizičke i fiziološke karakteristike. Korišćenje lekova u intenzivnom i ekstenzivnom stočarstvu je rizično po kvalitet proizvoda i time na zdravlje ljudi. U organskom stočarstvu nije dozvoljeno korišćenje lekova. Zbog toga se intenzivno traže prirodna lekovita sredstva i resursi. U proizvodnji stočne hrane, biljke obezbeđuju realnu mogućnost da se poveća vrednost hrane korišćenjem različitih funkcionalnih dodataka. Dodaci u hrani za životinje mogu da poboljšaju funkcionalnost u smislu fiziološkog efekta. U razvijenim evropskim zemljama veoma je snažan trend zamene sintetičkih antibiotičkih preparata lekovitim biljnim preparatima. Kao biljni aditivi u hrani mogu se koristiti lekovi (sušene lekovite biljke kao sirovina), biljni ekstrakti ili biljni izolati (npr. esencijalna ulja). Potencijalne biljne lekovite supstance koje imaju antibakterijsku aktivnost, antiinflamatornu aktivnost, stimulišu digestiju, laksativnu aktivnost, antidijaroičnu aktivnost, holeretičnu,

itd., i koje se već koriste u ljudskoj medicini mogu se dodati i u stočnu hranu u tretmanu različitih poremećaja zdravlja životinja.

Široku i raznovrsnu primenu u različitim industrijama: hemijskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj ima lekovito bilje. Kada je u pitanju prehrambena, ono predstavlja najveći potencijal za proizvodnju funkcionalne hrane nutraceutika (Arsić, 2003). Potrošnja lekovitog i začinskog bilja prema podacima Shukla-e (Shukla, 1998), je iznosila 860 miliona libri na godišnjem nivou samo u SAD. Sa stanovišta razvoja prehrambenih proizvoda sa funkcionalnim svojstvima pekarski proizvodi su veoma interesantni zbog svoje nutritivne vrednosti i mogućnosti da budu nosači nutraceutika. Ideja proizvodnje hleba sa dodatkom smeše lekovitog bilja je i nastala u skladu sa ovim trendom (Brkić *et al.*, 2001). Do nedavno su se u proizvodnji hleba i peciva retko koristili začini i bilja kao dodaci direktno dodavani u testo, već više kao dodaci za posipanje u cilju korekcije ukusa proizvoda (Neumann, 1999). Međutim usled pada kvaliteta pšeničnog brašna povećana je potreba za dodavanje aditiva za poboljšanje tehnoloških osobina brašna. Literaturni podaci ukazuju na povoljni uticaj žalfije na poboljšanje reoloških osobina testa (Davidović *et al.*, 2004). Dodatkom ekstrakata žalfije (*Salvia officinallis*, *S. glutinosa*) kao aditiva, povećana je stabilnost testa, smanjen je stepen omekšavanja testa i povećana vrednost kvalitetnog broja, čime su poboljšane i tehnološke karakteristike.

Održivost kvaliteta keksa, krepera i biskvita zbog njihove široke upotrebe i relativno dugog roka trajanja od velikog je interesa. Dokazano je da u biskvitima, dodatak prečišćenih ekstrakata mente, majorana i bosiljka efikasno sprečava oksidaciju lipida u poređenju sa efektom BHA (Bassiouny *et al.*, 1990). Smatra se da antioksidantna svojstva variraju u zavisnosti od kompleksnih interakcija između različitih faktora, uključujući koncentraciju i tip aktivnih komponenti potencijalnog antioksidanta i prirodu ispitivanog matriksa hrane (Schwarz *et al.*, 2001).

Tokom dugog perioda pravljenja sira usavršavali su se postupci proizvodnje i poboljšavale senzorne karakteristike, ali i nutritivna i funkcionalna svojstva primenom različitih dodataka: začina, lekovitog bilja, voća i povrća, pečurki, mesnih prerađevina, ribe, mikroorganizama. Osnovna funkcija začina u proizvodnji sireva je da se postignu specifičan miris i ukus, koji nastaju kao kombinacija izvorne arome mleka/sira i aromatičnih jedinjenja začina. Pored prijatnog ukusa i mirisa, koji daju hrani, začini su

veoma bogati vitaminima i mineralima i imaju brojne lekovite sastojke, tako da stimulišu lučenje sokova za varenje i ublažavaju određene tegobe u organizmu.

Lekovito bilje i začini nisu i ne treba ih smatrati samo kao artikle koji utiču na ukus i miris. Veoma je značajno njihovo korisno delovanje u našem telu i njihov efekat na poboljšanje zdravlja. Lekovito i aromatično bilje sadrži etarska ulja kao i druge aktivne supstance (smole, organske kiseline, sluzaste i taninske supstance, enzime i dr.) koje daju ukus i aromu, a i povećavaju nutritivnu vrednost proizvoda sa vitaminima i mineralnim sastojcima (Willbrandt, 1989). Začini sadrže nutritivno vredne komponente. To su mineralne materije i vitamini. Minerali su elementi, koji čine oko 5%-tni deo hrane, a imaju bazičnu funkciju u čovekovom metabolizmu. Vitamini su esencijalni katalizatori u metabolizmu čoveka. Analitičkim istraživanjima mnogih autora utvrđeno je da su mineralne materije začina: kalcijum, gvožđe, magnezijum, fosfor, kalijum, natrijum, cink, bakar, mangan, selen, sumpor. Pojedini se začini odlikuju značajnom koncentracijom vitamina, a većina sadrži sledeće vitamine: A, C, tiamin-B₁, riboflavin-B₂, niacin-B₃, pantotensku kiselinu-B₅, piridoksin-B₆.

Etarska ulja se primenjuju u medicini, farmaciji, prehrambenoj, kozmetičkoj industriji, zatim industriji alkoholnih i bezalkoholnih pića, kao i u industriji boja i lakova. Mikrobiološka ispravnost, poboljšane fizičko hemijske i senzorne osobine proizvoda od etarskih ulja čine ih prihvatljivim, organizam ih usvaja, bez neželjenih posledica, što nije slučaj sa nekim prehrambenim proizvodima koji često u sebi sadrže sintetičkim putem proizvedena mirisna i antioksidantna jedinjenja. Zbog toga etarska ulja se najviše koriste u proizvodnji izuzetno cenjenih i vrednih biološki zdravih proizvoda. Ulje žalfije se koristi za aromatizovanje namirnica. Kada se dodaje kao aditiv koncentracije su drugačije: alkoholna pića (10 mg/kg), gorki likeri (35 mg/kg), hrana koja sadrži žalfiju (25 mg/kg), začini od žalfije (250 mg/kg), bezalkoholna pića (300 ppm), peciva (170 ppm), meso (1500 ppm), sladoled (16 ppm), slatkiši (11 ppm), žvakaće gume (30 ppm) (Jirovetz *et al.*, 2006).

Bezalkoholna pića se aromatizuju esencijalnim uljem mente ili cimeta. Veliki broj „italijanskih“ soseva su aromatizovani uljem majorana i/ili uljem origana. Mnogim industrijskim namirnicama se dodaju ulja crnog i belog luka kao i ulje ljutih paprika. Ulje mirođije se koristi kod bezalkoholnih pića kao i kod alkoholnih. Poznata francuska

biljka *Chervil* (Trstika), odnosno njeno esencijalno ulje je uobičajen aditiv u proizvodnji mesa, alkoholnih pića kao i bezalkoholnih.

Plodovi *Juniperus communis* i *J. virginiana* podvrgnuti su klasičnoj hidrodestilaciji i ekstrakciji, a njihovi produkti nakon izvršenih analiza korišćeni u pripremi proizvoda od votke. Ekstrakti su korišćeni u pripremi proizvoda od votke, a antioksidantna aktivnost krajnjih proizvoda takođe je vrednovana i utvrđena najbolja receptura za proizvodnju ovog veoma često konzumiranog pića (Plesa *et al.*, 2010).

Sastojci etarskog ulja i seskviterpenska jedinjenja prisutna u herbi pelina su gorkog ukusa, zbog čega etarsko ulje i ekstrakti pomenute herbe nalaze primenu u industriji pića za izradu gorkih likera i rakija (aperitiva) (Kovačević, 2004).

U pripremi gotovog proizvoda sa željenim biološkim svojstvima, osnovnim sirovinama se u odgovarajućoj količini i oblicima dodaju lekovite i aromatične biljne sirovine. Ovim obogaćivanjem sastava, gotov proizvod pored svoje nutritivne vrednosti pokazuje i jednu novu dimenziju pozitivne uloge na zdravlje ljudi. Kako je hemijski sastav lekovite biljne komponente veoma različit, odgovarajućim odabirom biljaka moguće je postići različito delovanje na fiziološke funkcije organizma.

Literaturni podaci govore o primeni biljnih izolata u proizvodnji pića u svetu i kod nas. Na tržištu se nalaze biljni ekstrakti napravljeni od velikog broja biljaka. Dodatak medicinske gljive *Ganoderma lucidum*, biljnom ekstraktu od 54 lekovitih i aromatičnih biljaka, predstavlja dobro rešenje. Ekstrakcijom gljive *Ganoderma (Ganoderma lucidum)* zajedno sa lekovitim i aromatičnim biljem, zadržavaju se sve aktivne vrednosti biljaka, uz postizanje dodatnih lekovitih svojstava gljive. Ovakav proizvod, na bazi ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja, voća i gljive *Ganoderma*, je interesantan sa aspekta mogućih lekovitih svojstava. On može biti deklarisan ili kao gorki biljni liker u komercijalnoj prodaji ili čak kao dijetetski suplement za prodaju u apotekama. Takav proizvod u svakom slučaju predstavlja, kako zdravstveno tako i nutritivno, bolje rešenje od drugih alkoholnih pića (Vukosavljević *et al.*, 2009). Fenolna jedinjenja su supstance zastupljene u biljkama, voću, povrću, orasima, semenkama i cveću, a koji su sastavni deo ljudske ishrane. Najznačajniji izvori polifenolnih jedinjenja su razni napitci (čajevi, crno vino, pivo, kafa i voćni sokovi), voće, povrće, čokolada itd. (Scalbert i Williamson, 2000). Epidemiološke studije su pokazale da konzumiranje pića bogatim fenolom, kao

što su gorki biljni liker, čajevi, vina koreliše sa smanjenom smrtnošću od koronarnih bolesti (Katalinić *et al.*, 2004).

2.4.2. Primena osvežavajućih pića

Možda život na Zemlji i nije nastao u vodi kao što tvrdi Oparinova teorija, ali je svakako prilagođen uslovima sa velikom količinom ove dragocene tečnosti. Svaka živa ćelija ima više od 60% vode. Iako voda nije reaktant (ne ulazi u hemijske reakcije) ona je osnova sredine u kojoj se metabolizam odvija. U njoj se rastvaraju (raspodeljuju) mnoge čvrste supstance koji su važni nutrijenti ili metaboliti. Svojim termodinamičkim karakteristikama se izdvaja od svih drugih tečnih supstanci. Zato je i preuzela značajnu fiziološku ulogu u metabolizmu (životu).

S' obzirom na fiziološku ulogu koju ima u organizmu, neophodno je da se svakodnevno unosi putem ishrane. U slučaju smanjenog unosa vode raste koncentracija čvrstih supstanci pri čemu raste osmotski pritisak sredine. Tako se značajno menjaju uslovi i metabolizam je ugrožen. To se manifestuje kroz rad mišića, ali i nervnog sistema. Zbog svega toga, čovek bez hrane može da živi i desetak dana (čak i mesec dana), ali bez vode svega nekoliko dana.

Zbog značaja koju ima na metabolizam definisana je i piramida unosa vode (slika 14). U osnovi piramide je voda za piće. Zatim su kuvana jela i supe (čorbe), a na vrhu piramide su pića za osvežavanje i uživanje.

Pravilna i zdrava ishrana postala je jedan od najvažnijih problema savremenog čoveka. Piramide ishrane su jedan od najčešćih metoda za ilustrovanje pravilnog načina ishrane. Prema njima uravnoteženu ishranu predstavlja pravilan balans 5 osnovnih grupa namirnica (proteini, ugljeni hidrati, masti, vitamini i minerali). Koncept ishrane značajno se menja u savremenom društvu.



Slika 14. Piramida unosa vode

Ishranom se osim supstanci koje imaju hranljivu vrednost, unose i sredstva za osveženje ili uživanje – pre svega kao napitci: alkoholna i bezalkoholna pića, čajevi, kafa i sl. Ova pića i napitci sadrže različite fiziološki aktivne supstance. Tako je čaj značajan izvor taninskih materija (sadrži 15-30%), među kojima ima više od 30 polifenolnih jedinjenja. Potvrđeno je da ih mnogo više ima u zelenom čaju nego u crnom, a posebno su bogati indijski i cejlonski zeleni čajevi (Zlatković, Bukvić, 2000). Dodaci u pićima za osveženje ili uživanje mogu da poboljšaju funkcionalnost u smislu fiziološkog efekta. Specifični proizvodi biljnog porekla (sušene lekovite biljke kao sirovina, biljni ekstrakti ili biljni izolati (npr. esencijalna ulja), koji se dobijaju od određenih lekovitih i aromatičnih biljaka, koriste se kao dodaci hrani i piću, radi poboljšavanja njihovog ukusa ili boje, kao i povećavanja nutritivnih i lekovitih vrednosti. Pored pomenutih pozitivnih aktivnosti, biljne supstance koje se unose u organizam sadrže značajne mikroelemente i vitamine, presudne za metabolizam ljudi. Svesni stvarne vrednosti pića za osveženje i uživanje prilikom konzumiranja, a imajući u vidu i činjenicu da ista moraju da opstanu na našoj trpezi jer su ušla na „velika vrata“ dodatkom biljnih aditiva kao fiziološki vrednih supstanci dobijamo proizvod koji pored svoje nutritivne vrednosti sadrži sastojke koji imaju pozitivnu ulogu na zdravlje ljudi i njihovo psiho-fizičko stanje.

Prema pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za osvežavajuća bezalkoholna pića („Sl. list SCG“, br. 18/2006), (Član 5) osvežavajuća bezalkoholna pića su proizvodi dobijeni posebnim tehnološkim postupkom od vode za piće ili prirodne mineralne vode ili prirodne izvorske vode, kojima se mogu dodavati: arome, šećeri, hidrolizati skroba, voćni sok, koncentrisani voćni sok, sok od povrća, žita i proizvodi od žita, soja i proizvodi od soje, hmelj i proizvodi od hmelja, surutka i druge namirnice, sa ili bez dodatka ugljen-dioksida, mineralnih soli i vitamina.

Prema pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za osvežavajuća bezalkoholna pića („Sl. list SCG“, br. 18/2006), (Član 9), osvežavajuća bezalkoholna pića mogu se proizvoditi i stavljati u promet pod sledećim nazivom: osvežavajuće bezalkoholno piće, osvežavajuće bezalkoholno piće sa voćnim sokom, voda sa aromom, soda voda, sirup za osvežavajuće bezalkoholno piće, prašak za osvežavajuće bezalkoholno piće, tableta za osvežavajuće bezalkoholno piće, energetska piće, osvežavajuće bezalkoholno piće sa mineralnim solima.

Osvežavajuća bezalkoholna pića prema važećem Pravilniku moraju ispunjavati sledeće zahteve kvaliteta:

1. da senzorna svojstva odgovaraju vrsti deklarisanog pića
2. da sadrže najmanje 7% suve materije (mereno refraktometrom na 20°C), osim za osvežavajuća bezalkoholna pića sa nižom energetska vrednošću
3. da sadrže najviše 0,5% v/v etanola

Prema pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za osvežavajuća bezalkoholna pića („Sl. list SCG“, br. 18/2006), (Član 14) sirup za osvežavajuće bezalkoholno piće je proizvod viskozne strukture dobijen po odgovarajućem tehnološkom postupku od sastojaka navedenih u članu 5. ovog pravilnika.

Sirup za osvežavajuća bezalkoholna pića, koji se stavlja u promet, mora ispunjavati sledeće zahteve kvaliteta:

1. da ima ujednačenu sirupastu konzistenciju bez pojave raslojavanja;
2. da količina ukupne suve materije mora biti najmanje 60% (mereno refraktometrom na 20°C), osim sirupa namenjenih za upotrebu u post-mix aparatima u kojima količina suve materije mora biti najmanje 40%;

3. da razblažen vodom, prema uputstvu proizvođača, ispunjava zahteve kvaliteta propisane ovim pravilnikom.

Osvežavajuća bezalkoholna pića od baza podrazumevaju bistre ili mutne tečne proizvode dobijene od vode ili mineralne vode, šećera i citrus baza, tj, voćnih baza, uz dodatak ugljen dioksida i drugih dozvoljenih aditiva. Pod bazama se smatraju proizvodi dobijeni mešanjem koncentrisanog soka odgovarajuće vrste voća i homogenizovanog čvrstog ostatka (kora i pulpa). Citrus baze se najčešće koriste u proizvodnji raznovrsnih osvežavajućih bezalkoholnih pića.

Ova pića se često pogrešno poistovećuju sa voćnim sokovima od citrus voća, naročito od pomorandže. U svom sastavu imaju sasvim malo voćnog soka, ima ga u tragovima ili ga uopšte nema. Niska biološka vrednost ovih napitaka i činjenica da sadrže i štetne sastojke (npr. pesticide) i konzervanse isključuje njihovu primenu u dijetama jer deluju nadražajno na sluzokožu gastrointestinalnog trakta, a imaju i manju nutritivnu i biološku vrednost. Ishrana je pravilna ako organizmu hranom obezbeđuje sve nutrijente u dovoljnim (potrebnim) količinama. Ne treba zaboraviti da osim nutrijenata koji su neophodni kao donosioci energije (energetske materije – pre svega skrob) treba unositi i niz drugih koji su važni za njeno izdvajanje u ćeliji: tiamin, riboflavin, nikotinamid, pantoteinska kiselina... ali i za zaštitu organizma od posledica oksidacije-antioksidanti. Pod zdravstvenom bezbednošću hrane se stoga ne podrazumeva samo unos povećanih količina toksina i antinutrijenata, jer rizik po zdravlje predstavlja i nedovoljan unos nutrijenata koji su na bilo koji način odgovorni za kontrolu i regulaciju metabolizma (Stanisavljević *et al.*, 2010).

Osvežavajuća bezalkoholna pića od biljnih ekstrakata podrazumevaju bistre ili mutne tečne proizvode dobijene od vode ili mineralne vode, šećera i biljnih ekstrakata uz dodatak ugljen dioksida i drugih aditiva. Biljni ekstrakti namenjeni za proizvodnju osvežavajućih bezalkoholnih pića su aromatični ekstrakti isključivo biljnog porekla, a mogu poticati od jedne ili više biljaka. Biljni ekstrakti sadrže etarska ulja, organske kiseline, boje, mineralne materije i druge komponente, koje mogu da imaju vrlo povoljno dejstvo na organizam. Od napitaka iz ove grupe poznat je napitak na bazi ekstrakta alpskih trava kao i nekih lekovitih (npr. nana, kopriva, bokvica).

Prema pravilniku o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda („Sl. glasnik RS“, br. 4/2012), (Član 4), pod nazivom čaj, u smislu ovog pravilnika, podrazumevaju se lisni pupoljci i mladi izdanci varijeteta biljne vrste *Camellia sinensis* L. (sinonim *Thea sinensis* L), familija Theaceae, tretirani odgovarajućim postupcima (maceracija, aeracija, sušenje), od kojih se na uobičajen način može pripremiti napitak.

Čaj je drugi po važnosti napitak. U mnogim zemljama čaj se pije umesto kafe. Aktivne materije u čaju su alkaloidi kofein (2-4%) i tein, kao i neke vrste eteričnih ulja. Fiziološko delovanje čaja slično je delovanju kafe.

Čaj (Tea) je veoma zdrav biljni napitak koji služi kao hrana i lek. Predstavlja važan izvor hranljivih i lekovitih supstanci za očuvanje i osvežavanje organizma. Predstavnicima antioksidanata su flavonoidi (zeleni čaj, crni čaj, ruski čaj i sl.). Nutritivna vrednost čaja je promenljiva u zavisnosti od vrste biljaka i načina pripreme čaja. Čaj gotovo da nema nikakvu energetske vrednost, ukoliko se ne dodaje šećer. Nutritivna vrednost čaja je promenljiva u zavisnosti od vrste biljaka i načina pripreme čaja. Kofein stimulatивно deluje na organizam, tanin čaju daje boju i volumen, a esencijalna ulja daju ukus i aromu.

Kod nas se biljni „čajevi“ uglavnom pripremaju od aromatičnih biljnih vrsta. One sadrže etarska ulja, koja, osim što su lekovita, imaju prijatan ukus i miris. Biljni čajevi se proizvode od cvetova, kore i semenja, a i od raznovrsnog voća. U svom sastavu nemaju kofein pa su pogodni za decu. Ovo je druga velika grupa čajeva koja nema mnogo zajedničkih osobina sa pravim čajevima. U našem narodu reč čaj podrazumeva lekoviti biljni čaj, i on se neuporedivo više koristi od crnog ili zelenog čaja. Glavni lekoviti sastojci čaja su kofein, tein, teobromin, teofilin, adenin, rutin, etarska ulja, ima još ali u manjim količinama i dekstrina, masti, voska, belančevina, tanina...

Predstavnicima antioksidanata u čajevima su flavonoidi, a s nutricionističkog gledišta „pravi“ se čajevi uglavnom smatraju predstavnicima ovakvih svojstava. Flavonoidna sposobnost antioksidacije je vrlo velika, smatra se da je aktivnost pojedinih biljnih polifenola veća od aktivnosti već dobro poznatih antioksidantnih supstanci - vitamina C i E. Flavonoidi pre svega pozitivno deluju na funkciju srca, ali i sprečavaju razvoj pojedinih vrsta raka. Osim navedenog, flavonoidi inhibiraju metaboličke reakcije nekih mikroorganizama kao što su npr. *Salmonella typhi*, *Campilobacter jejuni*, *Campilobacter coli*, *Helicobacter pylori*, *Shigella*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Candida*

i ostali. Najnovija istraživanja objavljena u američkom časopisu za kliničku ishranu (American Journal of Clinical Nutrition) ukazuju da ekstrakti iz pravog čaja mogu pomoći pri mršavljenju time što ubrzavaju oksidaciju masti.

Čaj vodi poreklo iz Azije. Već nekoliko hiljada godina gaji se u Kini, a mnogo kasnije počeo je da se gaji i u drugim delovima sveta. U Evropu prvi čaj stiže 1610. godine brodovima jedne holandske kompanije. U Moskvi počinju da ga upoznaju 1618. godine, kada je poslužen caru Alekseju u kineskoj ambasadi. Do kraja XVIII veka postaje dostupan skoro svima.

Čaj kao izbor napitka za vrele letnje dane ne zvuči kao idealno rešenje, ali kada se radi o ledenom čaju, onda je prijatno osveženje koje nam ovaj osvežavajući napitak može doneti pravo savršenstvo. Ledeni čaj sadrži mnogo vode, vitamina i minerala, podiže energiju i vitalnost, a neke vrste ledenog čaja pomažu i u prevenciji i ublažavanju raznih zdravstvenih problema. Može se praviti skoro od svih vrsta čaja koje se inače piju vruće. Po nekim izvorima, naziv ledeni čaj se pojavio prvi put u novinama u američkoj državi Nevada 1890. godine, kada je objavljen izveštaj sa godišnjeg skupa veterana, u kome se, pored pominjanja ogromnih količina utrošene hrane i pića, navodi i da je na ovoj svečanosti popijeno 880 galona ledenog čaja. Međutim, najrasprostranjenija verzija priče o nastanku ovog napitka vezuje se za sam početak dvadesetog veka. Otkako je ušao u masovnu proizvodnju, ledeni čaj se može pronaći na policama prodavnica širom sveta.

Prema Pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića („Sl. list RS“, br.73/10) liker se proizvodi zaslađivanjem i aromatizovanjem rafinisanog etil alkohola. U proizvodnji likera mogu da se dodaju aromatične biljke ili delovi aromatičnih biljaka, prirodne arome, prirodno identične arome i aromatični preparati.

Prema Pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića („Sl. list RS“, br.73/10) liker sadrži:

1. šećer izražen kao invertni šećer – minimalno 100 g/l;
2. etanol- minimalno 15 % v/v.

Prema Pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića („Sl. list RS“, br.73/10) alkoholno piće gorkog ukusa (bitter) se

proizvodi aromatizovanjem rafinisanog etil alkohola prirodnim aromama, prirodno identičnim aromama i aromatičnim preparatima i u njemu preovlađuje gorki ukus.

Prema *Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića* („Sl.list SCG“, br.24/2004) gorki likeri su kvalitetna alkoholna pića, dobijena od rafinisanog etanola poljoprivrednog porekla, šećera i vode uz dodatak aromatičnog ekstrakta i gorkog ekstrakta.

Likeri, u zavisnosti od ukusa i sadržaja dodatih sirovina, stavljaju se u promet kao: slatki likeri, gorki likeri, specijalni likeri i desertna likerska pića. Gorki likeri (*Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića* („Sl. list SCG“, br.24/2004) koji se stavljaju u promet moraju ispunjavati sledeće zahteve:

1. da sadržaj ekstrakta iznosi najmanje 10 g/l;
2. da sadržaj etanola iznosi najmanje 25% v/v;
3. da imaju slabo gorak do gorak ukus karakterističan za gorke likere.

Senzorna analiza predstavlja svesni pokušaj da se identifikuju (otkriju) i procene različite karakteristike nekog proizvoda, bilo da je reč o hrani, osvežavajućem piću ili dr. Postoje i druge definicije senzorne analize, ali čini se ipak najprikladnijom ona koju prezentira *Internacionalni standard ISO 5492*, po kojem je senzorna analiza „ispitivanje organoleptičkih osobina proizvoda pomoću čulnih organa“. Kada je reč o bezalkoholnim i alkoholnim pićima, pod senzoričkom se podrazumeva opisivanje ili ocenjivanje njihovih osobina čulima. Zasniva se na čulnim percepcijama i to: vida (optička), mirisa (olfaktivna), ukusa (gustativna) i dodira (taktilna).

Proizvodi na bazi ekstrakata lekovitog bilja (bitteri iz apoteka, gorki biljni likeri), predstavljaju proizvode veoma zastupljene na tržištu. Razlog njihove upotrebe u prvom redu je zdravstvene prirode (smanjenje stresa, umora i iscrpljenosti, regulacija varenja, stimulacija imunog sistema, normalizacija metabolizma i dr.), a u drugom, prijatna specifična aroma i ukus. Aktivni sastojci lekovitog bilja, koje se dodaje ovim alkoholnim pićima su gorki seskviterpeni, flavonoidi, tanini. U svakom slučaju gorki biljni likeri tipa Gorki liker mogu predstavljati kompromisno rešenje između bittera iz apoteka i gorkih biljnih likera kao komercijalnih pića. Likeri na bazi ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja interesantni su ne samo sa aspekta bezbedne hrane, već i mogućih lekovitih svojstava jer predstavljaju bolje rešenje od drugih alkoholnih pića.

Učešće biljnog ekstrakta obezbeđuje unošenje biološki vrednih sastojaka, a dodatak šećera i alkohola povoljan senzorni i osvežavajući efekat.

Kompozicija biljaka u gorkom likeru omogućava nutritivno i zdravstveno dobro rešenje u odnosu na druga jaka alkoholna pića, pa se i iz tog razloga na tržištu mogu naći gorki biljni likeri (Bitteri) od 28, 32 pa i 54, 56 lekovitih i aromatičnih biljaka i voća (Vukosavljević *et al.*, 2008; Vukosavljević *et al.*, 2009). Njegova proizvodnja je ekonomski potpuno opravdana, uz postizanje zaštite domaće proizvodnje i domaćeg tržišta zbog prisustva velikog broja uvoznih ekstrakata, aroma i aditiva. Na taj način se degustiraju vrlo prijatna, pa čak i osvežavajuća pića ako se serviraju sa ledom i limunom. Od ovakve vrste pića može se očekivati efekat sličan onom koji se pripisuje crvenim vinima, a koji je poznat pod nazivom „Francuski paradoks“. Naravno tome su poslednjih godina doprinela i mnoga naučna istraživanja usmerena ka ispitivanjima uticaja alkohola na ljudski organizam, a sa kojima je uklonjena negativna slika sa unošenja malih količina alkohola u organizam (jedno do dva „pića“ na dan).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u laboratorijama:

- Visoke poljoprivredno-prehrambene škole strukovnih studija u Prokuplju
- Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu
- Katedre za prehrambeno-biotehnoške nauke, Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Univerziteta u Nišu i
- Katedre za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu.

3.1. MATERIJAL

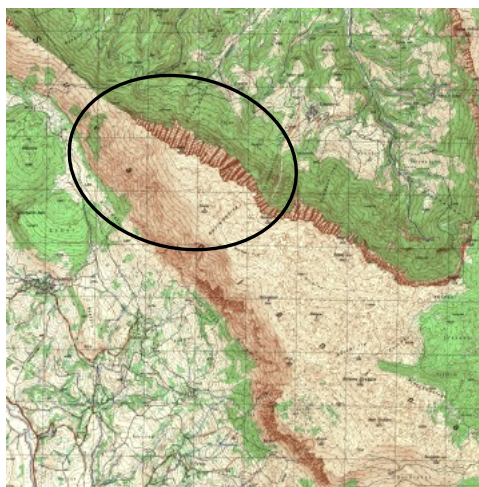
3.1.1. Biljni materijal

Biljni materijal predstavljaju nadzemni delovi biljnih vrsta koji su sakupljeni 2009. godine u fenološkoj fazi cvetanja u prepodnevničkim satima po suvom vremenu, na području južne i jugoistočne Srbije:

1. *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., Lamiaceae, čubar
2. *Origanum vulgare* L., Lamiaceae, vranilova trava
3. *Artemisia alba* Turra, Asteraceae, rudinski pelin
4. *Nepeta nuda* L., Lamiaceae, macina trava glatka
5. *Thymus serpyllum* L., Lamiaceae, majkina dušica
6. *Mentha longifolia* (L.) Hudson, Lamiaceae, dugolisna nana
7. *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae, izop

Primerici svih ispitivanih biljnih vrsta deponovani su u Herbarijumu Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, BEOU -pod odgovarajućim brojem vaučera.

Satureja kitaibelii i *Origanum vulgare* prikupljeni su u jugoistočnoj Srbiji avgusta 2009. godine, sa pašnjaka Suve planine (Devojački grob) na oko 1317 m nadmorske visine (vaučer primerak No 16471 i 16472, respektivno) (slika 15).



Slika 15. Lokalitet Suva planina, Niš



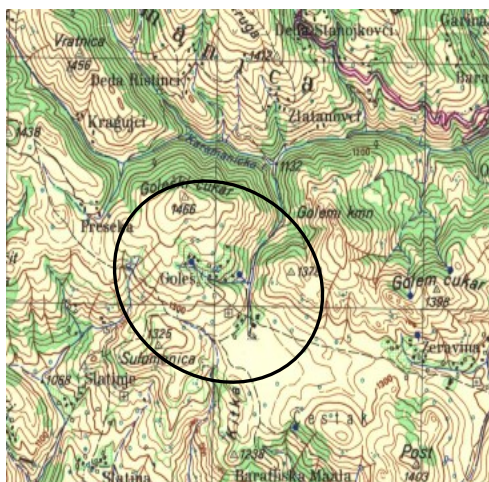
Slika 16. Lokalitet Golemi kamen, Knjaževac

Artemisia alba sakupljena je avgusta 2009. godine na području opštine Knjaževac (Golemi kamen) sa suvih pašnjaka na oko 524 m nadmorske visine (slika 16) (vaučer primerak No 16474).

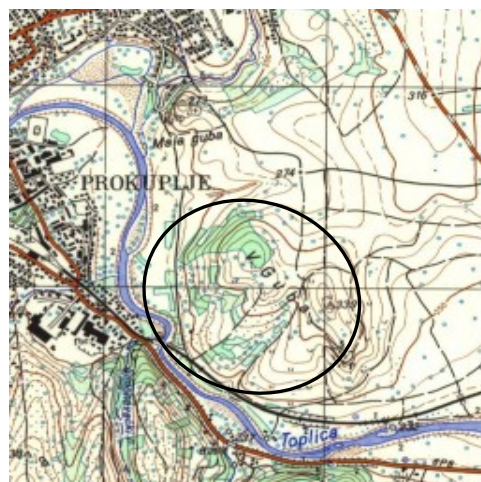
Hyssopus officinalis prikupljen je u septembru 2009. godine na području opštine Knjaževac (Golemi kamen) sa suvih pašnjaka na oko 524 m nadmorske visine (slika 16) (vaučer primerak No 16470).

Nepeta nuda prikupljena je jula 2009. godine sa livada i pašnjaka Goleške visoravni (područje opštine Bosilegrad), na nadmorskoj visini od oko 1318 m (slika 17) (vaučer primerak No 16473).

Thymus serpyllum je prikupljen juna 2009. godine na području opštine Prokuplje (brdo Guba), sa pašnjaka na oko 339 m nadmorske visine (slika 18) (vaučer primerak No 16475).



Slika 17. Goleška visoravan, Bosilegrad



Slika 18. Lokalitet Guba, Prokuplje

Mentha longifolia sakupljena je jula 2009. godine sa vlažnih livada područja opštine Prokuplje (mesto Rastovnica, planina Pasjača) na oko 400 m nadmorske visine (slika 19) (vaučer primerak No 16469).



Slika 19. Lokalitet Rastovnica, Prokuplje

3.1.2. Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije upotrebene u eksperimentalnom radu su analitičke čistoće:

- Folin-Ciocalteu (FC) reagens, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Galna kiselina, Rutin i DMSO (dimetil sulfoksid) (Sigma Chemical Company, SAD)
- TPTZ reagens (2,4,6-tripiridil-S-triazin) (TCI Europe, Belgija)
- Natrijum karbonat, Kalijum acetat, Aluminijum(III)-hlorid, Natrijum acetat trihidrat (Alkaloid, Skoplje)
- Etanol (Zorka-Pharma, Šabac, Srbija)
- Hlorovodonična kiselina, Vitamin C, Gvožđe(III)-hlorid heksahidrat, Gvožđe(II)-sulfat heptahidrat (VWR Prolabo, Belgija)
- Glacijalna sirćetna kiselina (NRK inženjering, Beograd)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Standardne supstance za HPLC (St. Louis, MO, USA)
- Müller-Hinton agar (za bakterije) i Sabouraud agar (za gljivice), Ampicilin, Amikacin, Nistatin (Institut za imunologiju i virusologiju Torlak iz Beograda).

3.1.3. Opis eksperimenta (opšta šema)

Dizajn eksperimentalnog rada koji prikazuje sva ispitivanja sprovedena u okviru ove disertacije, prikazan je na slici 20.

Uticaj različitih tehnika sušenja na hemijski sastav i biološke aktivnosti biljnih izolata, pokazan je samo na primeru herbe *Mentha longifolia*.

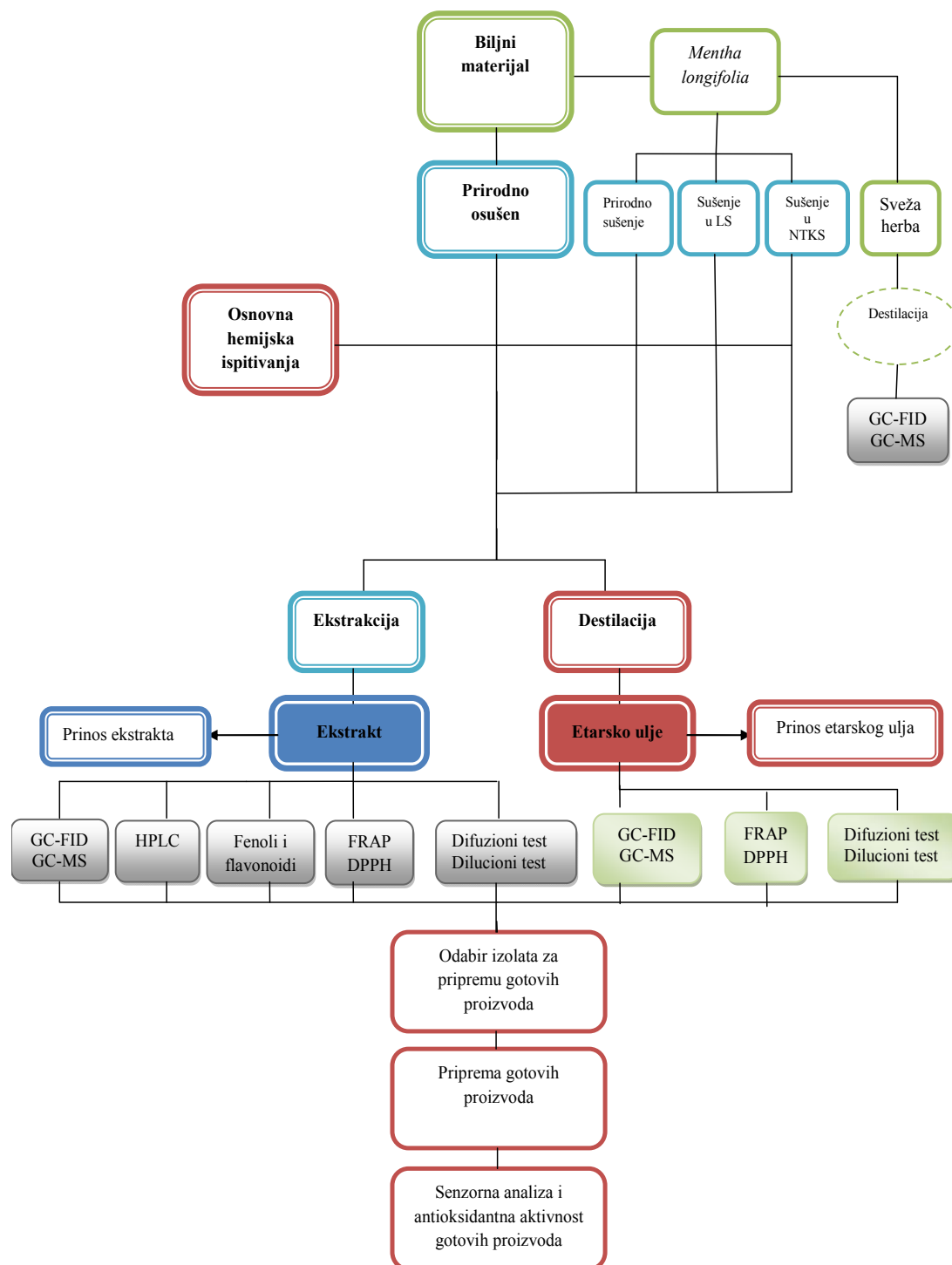
Jedan deo osušenog biljnog materijala je upotrebljen za dobijanje suvih ekstrakata (upotrebljeni ekstragens: 70% etanol; metoda ekstrakcije: jednostruka perkolacija, odnos biljni materijal: dobijeni tečni ekstrakt 1:2; prevođenje tečnog ekstrakta u suvi ekstrakt: uparavanjem ekstragensa iz tečnog ekstrakta pod sniženim pritiskom na 50°C).

Neisparljiva frakcija ekstrakata analizirana je visokoperformansnom tečnom hromatografijom HPLC, isparljiva frakcija ekstrakata gasnom hromatografijom GC-FID sa plameno-jonizujućim detektorom i gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom GC-MS, a kvantifikovani su i u pogledu sadržaja fenola i flavonoida spektrofotometrijskom metodom.

Ekstrakti su analizirani *in vitro* sa aspekta biološke aktivnosti (antioksidantna i antimikrobna aktivnost). Antioksidantna aktivnost, procenjena je na osnovu FRAP i DPPH testova, a antimikrobna aktivnost korišćenjem difuzionog i mikrodilucionog testa na 9 sojeva bakterija i 2 soja gljivica, poređenjem sa antibioticima i antimikotikom kao pozitivnom kontrolom.

Drugi deo osušenog biljnog materijala iskorišćen je za izolovanje etarskih ulja (hidrodestilacijom u aparatu po Klevendžeru), koja su analizirana sa aspekta kvalitativnog i kvantitativnog sastava GC-FID i GC-MS tehnikama. Njihov antioksidantni i antimikrobni potencijal procenjen je na osnovu gore pomenutih testova.

Na osnovu rezultata hemijskih i bioloških ispitivanja ekstrakata i etarskih ulja, odabrani su najkvalitetniji izolati za moguću primenu u izradi bezalkoholnih i alkoholnih pića. Kod formulisanih gotovih proizvoda izvršeno je ispitivanje senzornih karakteristika i antioksidantne aktivnosti.



Slika 20. Šema eksperimentalnog rada

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. Sušenje biljnog materijala

Prikupljeni biljni materijal sušen je prirodnim putem (PS) u hladu na promajnom mestu. Da bi se utvrdio uticaj sušenja na kvalitet biljnih izolata, nadzemni deo u cvetu dugolisne nane *M. longifolia*, sušen je još na dva načina: u laboratorijskoj sušnici (LS) i u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari (NTKS).

Prirodno sušenje

Jedan deo sirove herbe dugolisne nane sušen je 15 dana u hladu na promajnom mestu, spakovan u papirnate kese i čuvan na suvom i hladnom mestu do analiziranja.

Sušenje u laboratorijskoj sušnici

Drugi deo sirove herbe *M. longifolia* sušen je u laboratorijskoj sušnici „Stockli“, Švajcarska na temperaturi od 45°C dva dana. Ova sušnica je namenjena za sušenje voća, povrća, lekovitog bilja i pečuraka.

Sušenje u absorbcionoj sušari

Treći deo sirove herbe dugolisne nane sušen je dva dana u absorbcionoj niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari za voće, povrće i lekovito bilje „NT-KS/60S“ proizvođača FREON EKO - Kragujevac, na temperaturi od 35°C.

3.2.2. Osnovna hemijska ispitivanja

Osnovnim hemijskim (gravimetrijskim) ispitivanjima biljnih sirovina, dobijaju se podaci o nekim parametrima koji definišu njihov opšti kvalitet. U osnovna hemijska ispitivanja ubrajaju se: određivanje gubitka sušenjem i vode, određivanje ostatka posle žarenja (ukupnog pepela), određivanje u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO_2) i određivanje vodenog ekstrakta. U ovom radu određivan je:

- određivanje gubitka sušenjem i vode
- određivanje ostatka posle žarenja (ukupni pepeo)
- određivanje u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO_2)

Za naznačena određivanja korišćene su standardne farmakopejske metode (Ph. Jug. IV, 1984; Ph. Jug. V, 2000). Određivanja su rađena u triplikatu.

3.2.3. Priprema ekstrakata

Osušeni i usitnjeni biljni materijal ekstrahovan je modifikovanim farmakopejskim postupkom jednostruke perkolacije pomoću 70% etanola v/v kao rastvarača-ekstragensa (Ph. Jug. IV).

Postupak: 50 g usitnjenog biljnog materijala, u erlenmajeru, preliveno je sa 25 ml 70% etanola i ostavljeno 2 h, da herba upije ekstragens i da nabubri. Vlažan biljni materijal prebačen je u perkolatore, preliven određenom količinom istog ekstragensa i ostavljen na sobnoj temperaturi 24 h da se maceruje. Količina ekstragensa utvrđena je preliminarnom ekstrakcijom. Ekstrakt iz perkolatora ispuštan je u prihvatni sud propisanom brzinom. Ovim postupkom jednostruke perkolacije, dobijena količina tečnog ekstrakta u odnosu na početnu količinu biljne sirovine, iznosila je 2:1.

Tečni ekstrakt uparavan je u rotacionom vakuum-uparivaču IKA-WERKE, GMBH & CO.KG, D-79219 Staufen, Nemačka, na 50°C. Dobijeni sirovi suvi ekstrakti su, sušeni u vakuum-sušnici na 50°C do konstantne mase, usitnjeni u fini prah i čuvani u dobro zatvorenim staklenim posudama, na suvom, hladnom i tamnom mestu.

Prinos ekstraktivnih materija određivan je gravimetrijski (Ph. Jug. IV, 1984).

3.2.4. Izolovanje etarskih ulja

Etarska ulja su dobijena hidrodestilacijom u aparaturi po Klevendžeru po postupku koji propisuje Ph. Jug. IV. Čista etarska ulja su čuvana u tamnim staklenim ampulama na +4 °C do momenta analiziranja. Rezultati određivanja sadržaja etarskih ulja u herbama ispitivanih uzoraka predstavljaju srednju vrednost tri uporedne analize.

3.2.5. Hemijska analiza izolata

Kvalitativna i kvantitativna analiza isparljivih frakcija ekstrakata i etarskih ulja ispitivanog biljnog materijala sprovedena je GC-FID i GC-MS tehnikama.

Osnovni eksperimentalni uslovi analize isparljivih frakcija ekstrakata i etarskih ulja prikazani su u tabeli 1.

3.2.5.1. GC-FID analiza

GC-FID analiza ekstrakata i etarskih ulja urađena je na gasnom hromatografu Hewlett Packard, model 5890 II, opremljenom split/splitless injektorom, HP-5 kapilarnom kolonom (25 m × 0,32 mm, debljine filma 0,52 μm) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Temperatura injektora iznosila je 250°C, temperatura detektora 280°C, dok je hromatografisanje vršeno u režimu linearnog temperaturnog programiranja od 40-280 °C (4°C/min). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min). Tečni ekstrakti pri splitless modu i razblaženi rastvori uzoraka etarskih ulja u apsolutnom etanolu (10 μl/ml) pri split odnosu 1:30 injektirani su pomoću autoinjektora (1 μl). Kvantifikacija komponenata u dobijenim hromatogramima vršena je metodom normalizacije (eliminisanjem pika rastvarača iz obračuna).

3.2.5.2. GC-MS analiza

GC-MS analiza ekstrakata i etarskih ulja izvršena je na gasnom hromatografu Hewlett Packard, GCD serije II, model HP G1800C, opremljenom split/splitless injektorom, HP-5MS kapilarnom kolonom (30 m × 0,25 mm, debljine filma 0,25 μm) i masenospektrometrijski selektivnim detektorom (MSD). Temperaturni režimi prilikom hromatografisanja bili su identični onima kod GC-FID analize.

Tabela 1. Eksperimentalni uslovi analize isparljivih frakcija ekstrakata i etarskih ulja

	GC-FID	GC-MS
Aparat	Gasni hromatograf (Gas Chromatograph Electron Ionization Detector, Hewlett Packard, GCD System, GCD Series II)	Maseni spektrometar (Gas Chromatograph Electron Ionization Detector, Hewlett Packard, G 1800 C, GCD System, GCD Series II)
Kolona	HP-5, 25 m × 320 μm × 0,52 μm	HP-5, 30 m × 250 μm × 0,25 μm
Detektor	FID	MS
Split odnos	1:30	1:30
Protok gasa, ml/min l (H ₂)		1 (He)
Temp. injektora, °C	250	250
Temp. detektora, °C	280	280
Konc. uzorka	Ekstrakt: direktno "splitless mode" Etarsko ulje: 1 % u EtOH "split mode"	Ekstrakt: direktno "splitless mode" Etarsko ulje: 1 % u EtOH "split mode"
Injektirana zapr. μl	1	1
Mikrolitarski špric	Agilent	Agilent
En. jonizacije, eV		70
Opseg masa		40-450
Temp. slovi	40 °C	4 °C/min. → 280 °C

Kao noseći gas korišćen je helijum (1 ml/min). Tečni ekstrakti pri splitless modu i razblaženi rastvori uzoraka etarskih ulja u apsolutnom etanolu (10 µl/ml) pri split odnosu 1:30 injektirani su pomoću autoinjektora (1 µl). Maseni spektri su snimani u EI modu (70 eV), za opseg masa od 40-450.

Sadržaj komponenata u procentima dobijenje metodom normalizacije GC-hromatograma, odbacivanjem površine pika rastvarača. Komponente su identifikovane poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima baza Wiley 275, NIST 05 i Adams 2007, upotrebom pretraživača PBM, NIST 2.0, kao i kalibrisanim AMDIS (ver. 2.64) programom za determinaciju i poređenje retencionih indeksa (Adams, 2007).

3.2.5.3. HPLC analiza

Analiza fenolnih jedinjenja u ekstraktima izvršena je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (High Performance Liquid Chromatography), na Agilent 1100 Series i UV-DAD (UV-Diode Array Detector) detektorom, po originalnoj metodi (tabela 2) (Veit *et al.*, 1995). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Agilent Eclipse XDB-C18 kolona, 5 µm, 150×4,6 mm, 80 Å. Injektirano je 15 µl ekstrakata koncentracije 10 mg/ml, a hromatogrami su snimljeni na talasnoj dužini od 350 nm. Kao mobilna faza za hromatografsko razdvajanje korišćen je sistem rastvarača: A-0,15 % fosforna kiselina u smeši voda:metanol (77:23, pH=2) i B-metanol, pri protoku od 1 ml/min, temperaturi 15°C i primenom sledećeg elucionog profila: 0-3,6 min 100 % A; 3,6-24 min 80,5 % A; 24-30 min izokratski, 30-60 min. linearno 51,8 % A, 60-67,2 min 100 % B.

Tabela 2. Uslovi identifikacije i određivanja sadržaja flavonoida u ekstraktima

HPLC	
Aparat	Tečni hromatograf Agilent 1100 Series i UV-DAD, Agilent Eclipse XDB-C18 kolona
Stacionarna faza /Kolona	XDB-C18 5 µm, 150 × 4,6 mm, 80 Å
Talasna dužina detekcije /(nm)	350
Reagens za detekciju	A - 0,15 % fosforna kiselina u smeši voda:metanol (77:23, pH=2)
Mobilna faza	B - metanol
Protok mobilne faze (cm ³ /min)	1
Temperatura (°C)	15
Koncentracija uzorka	10 mg/ml (suvi ekstrakti dobijeni perkolacijom)
Injektirana zapremina (µl)	15
Filter papir za filtriranje mobilne faze, rastvora uzorka i standarda (µm)	0,45 (Sartorius AG, Germany)
Mikrolitarski špic	Agilent

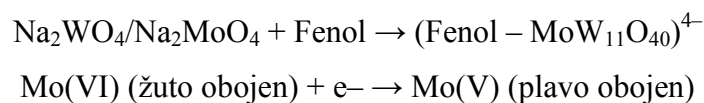
Fenolne komponente prisutne u uzorcima identifikovane su poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu.

3.2.5.4. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja

Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u ekstraktima sprovedeno je kroz analize određivanja ukupnih fenola i flavonoida.

3.2.5.4.1. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima (FC metoda)

Sadržaj ukupnih fenola određivan je u prethodno dobijenim suvim ekstraktima koji su rastvarani u 70 % etanolu, po metodi sa Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Metoda po Folin-Ciocalteu je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol – MoW₁₁O₄₀)⁴⁻:



Postupak: Po 0,2 ml rastvora suvih ekstrakta u 70% etanolu koncentracije 1 mg/ml, 0,2 ml tečnih uzoraka gotovih proizvoda koncentracije 0,2 ml pića/ml rastvora mešano je sa po 1 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 0,8 ml 7,5 %-tnog vodenog rastvora Na₂CO₃. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu u trajanju od 30 minuta, merena je absorbancija reakcione smeše na 765 nm na spektrofotometru „VARIAN Cary-100“. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja izračunat je pomoću jednačine standardne prave (R²=0,9919) koristeći galnu kiselinu kao standard i izražen kao mg galne kiseline/g suvog ekstrakta, odnosno kao mg galne kiseline/ml pića.

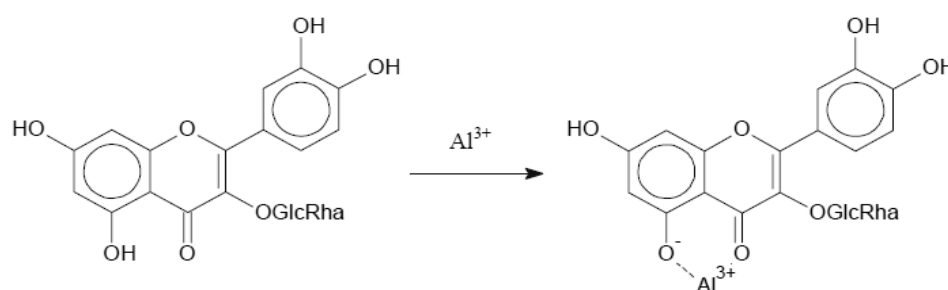
$$\text{Absorbanca} = 7,2328 c_{\text{galna kiselina}} (\mu\text{g ml}^{-1}) - 0,2286$$

Pre određivanja sadržaja ukupnih fenola u uzorcima izvršena je kalibracija i kalibraciona kriva je data u prilogu rada. Kalibracija je izvršena sa standardnim rastvorima galne kiseline. Na osnovu kalibracione krive i apsorbancije za ispitivane uzorke izračunat je sadržaj ukupnih fenola u uzorcima. Linearnost primenjene metode je

bila zadovoljavajuća što se može zaključiti na osnovu koeficijenta korelacije koji je iznosio 0,9919.

3.2.5.4.2. Određivanje flavonoida u ekstraktima

Sadržaj ukupnih flavonoida u prethodno dobijenim suvim ekstraktima koji su rastvarani u 70% etanolu određivan je spektrofotometrijskom metodom, koja se bazira na stvaranju kompleksnih jedinjenja flavonoida sa aluminijum(III)-hloridom (Chang *et al.*, 2002).



Slika 21. Građenje helata flavonoida (rutina) sa Al^{3+} jonom (Orčić, 2010)

Postupak: U 2,0 ml rastvora suvih ekstrakta u 70% etanolu koncentracije 1 mg/ml, 2,0 ml tečnih uzoraka gotovih proizvoda koncentracije 0,2 ml pića/ml rastvora dodato je 0,1 ml aluminijum(III)-hlorida (10%), 0,1 ml kalijum acetata (1 M) i 2,8 ml destilovane vode. Posle inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, merena je absorbancija reakcione smeše u odnosu na destilovanu vodu na 415 nm. Kao standard korišćen je rutin, a ukupan saržaj flavonoida je izražen kao mg rutina/g suvog ekstrakta, odnosno mg rutina/ml pića i izračunat pomoću jednačine standardne prave ($R^2 = 0,9994$).

$$\text{Absorbanca} = 12,722 c_{\text{rutin}} (\mu\text{g ml}^{-1}) + 0,0034$$

3.2.6. Biološki testovi *in vitro*

3.2.6.1. Određivanje antioksidantne aktivnosti izolata

Antioksidantne aktivnosti alkoholnih uparenih ekstrakata i etarskih ulja ocenjene su merenjem njihove sposobnosti da redukuju $[\text{Fe-TPTZ}]^{3+}$ (Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-S-triazin) kompleks, kao i sposobnosti da neutrališu DPPH-radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

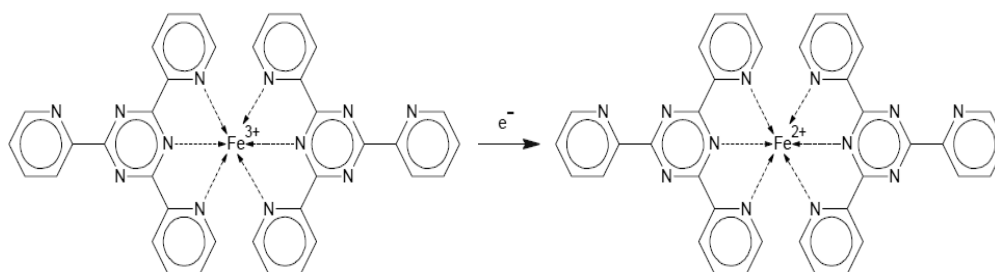
Ispitivanja su sprovedena na sledećim uzorcima:

- ekstrakti
- etarska ulja
- gotov proizvod

3.2.6.1.1. Određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala FRAP testom

FRAP metoda (*Ferric Reducing Ability of Plasma, Ferric Reducing Antioxidant Power*) je originalno razvijena za određivanje sadržaja redukujućih materija u krvnoj plazmi, ali je našla primenu i kod ispitivanja antioksidantnog potencijala biljnih ekstrakata (Szöllôsi, Szöllôsi Varga, 2002; Macdonald-Wicks *et al.*, 2006; Đordjević, 2008). Metoda je zasnovana na redukciji (Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-S-triazin) kompleksa svetlo braon boje do intenzivno plavog (apsorpcioni maksimum 593 nm) (Fe^{2+} -TPTZ) kompleksa u kiseloj sredini, a što je ilustrovano slikom 22.

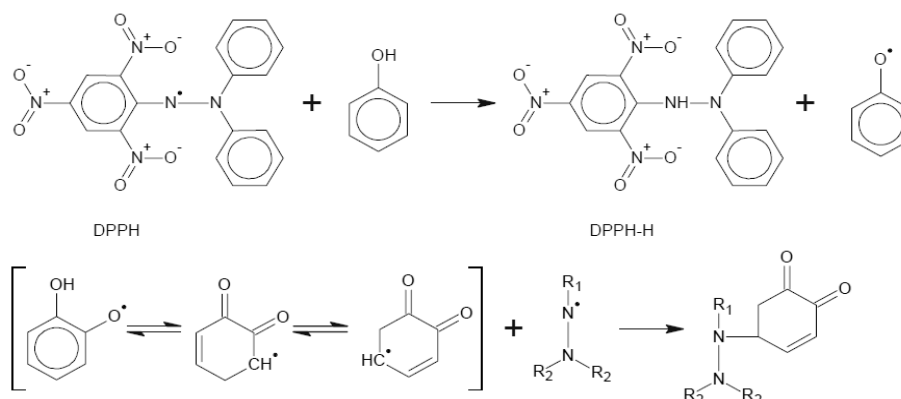
Postupak: Kalibraciona kriva za određivanje antioksidantnog kapaciteta dobijena je korišćenjem različitih koncentracija rastvora FeSO_4 (0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 mmol $\text{Fe}^{2+}/\text{dm}^3$). Rastvori uparenih ekstrakata (0,100 ml) koncentracije 0,2 mg/ml, etarskih ulja koncentracije 0,05 ml/ml i 0,100 ml razblaženih uzoraka gotovog proizvoda pomešani su sa 3,0 ml sveže pripremljenog FRAP reagensa (acetatni pufer + TPTZ reagens + $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ u odnosu 10:1:1). Nakon inkubiranja na 37 °C merena je apsorbancija na 593 nm u odnosu na slepu probu. Rezultati su izračunati korišćenjem kalibracione krive (prilog, slika 19), dobijene pomoću rastvora FeSO_4 , a vrednosti (nmol Fe^{2+}) se preračunavaju i izražavaju kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ suvog ekstrakta (FRAP vrednost). FRAP vrednost je izračunata korišćenjem jednačine kalibracione krive: $y=0,000568x+0,0837$ ($R^2=0,9987$)



Slika 22. Reakcija redukcije Fe^{3+} -TPTZ kompleksa (Orčić, 2010)

3.2.6.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (DPPH test)

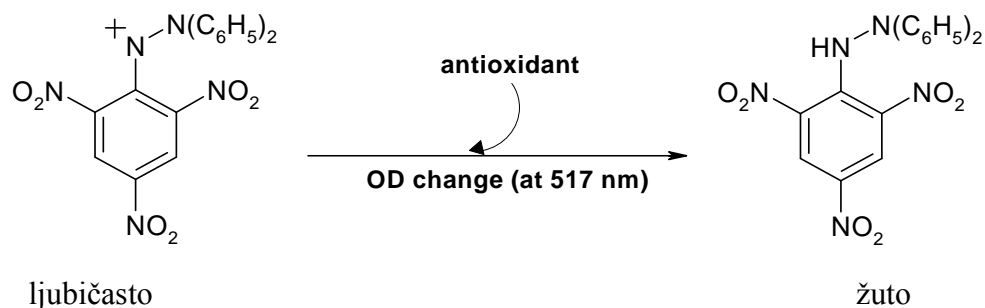
Antioksidantna aktivnost uparenih ekstrakata, etarskih ulja i tečnih uzoraka gotovog proizvoda određena je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testom (Choi *et al.*, 2002). U prisustvu antioksidanata dolazi do konverzije azot-centriranog stabilnog radikala DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ljubičaste boje (apsorpcioni maksimum 517 nm) u žuto obojenu formu DPPH-H i metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju intenziteta promene boje (Marxen, *et al.*, 2007). Antioksidanti redukuju DPPH, a mehanizam reakcije fenola sa DPPH radikalom je prikazan na slici 23.



Slika 23. Mehanizam reakcije fenola sa DPPH radikalom (Orčić, 2010)

Za antioksidantno delovanje fenolnih jedinjenja dominantnu ulogu ima prisustvo hidroksilne funkcionalne grupe u njihovoj strukturi.

Princip ovog testa jeste redukcija ljubičastog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u reakciji sa „scavenger“-ima slobodnih radikala do difenilpikrilhidrazina žuto obojenog. Promena boje predstavlja meru jačine „scavenger“-a i određuje se spektrofotometrijskim putem (Đorđević, 2008).



Postupak: Za određivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata, etarskih ulja i gotovih proizvoda napravljena je serija rastvora suvih ekstrakata u 70 % etanolu u opsegu

koncentracija 10,0; 50,0; 100,0; 500,0; 1000 µg/ml za ekstrakte, etarskih ulja 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 µl/ml za ulja, 10,0; 50,0; 100,0; 500,0; 1000 µl pića/ml rastvora za gotov proizvod i DPPH radikala koncentracije 0,3 mM u 70 % etanolu. Pomešan je 1,0 ml rastvora DPPH radikala i 2,5 ml pripremljenih rastvora ekstrakata, etarskog ulja i pripremljenih uzoraka gotovog proizvoda različitih koncentracija i posle inkubiranja od 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku merena apsorbanca na 517 nm na spektrofotometru „VARIAN Cary-100“.

Proračun: Kapacitet hvatanja ili neutralisanja slobodnih radikala je izračunavan pomoću sledeće jednačine:

$$\text{Kapacitet neutralisanja DPPH radikala, (\%)} = 100 - [(A_u - A_b) \times 100 / A_k]$$

A_U - Apsorbancija uzorka na 517 nm. Uzorak je ekstrakt, etarsko ulje, gotov proizvod rastvoren u etanolu (2,5 ml), određene koncentracije tretiran rastvorom DPPH radikala (1 ml).

A_B - Apsorbancija blank-a na 517 nm. Blank je ekstrakt, etarsko ulje, gotov proizvod rastvoren u 70% etanolu, određene koncentracije, koji nije tretiran rastvorom DPPH radikala (2,5 ml ekstrakta, etarskog ulja, gotovog proizvoda u koji je dodato 1 ml etanola).

A_K - Apsorbancija kontrole na 517 nm. Kontrola je 70% etanolni rastvor DPPH radikala (razblažen u odnosu 1 ml DPPH radikala koncentracije 0,3 mM u koji je dodato 2,5 ml etanola).

EC₅₀ je vrednost koja predstavlja koncentraciju ekstrakta i etarskog ulja koja je neophodna za neutralizaciju 50% DPPH radikala (Villaño *et al.*, 2007). Izračunavana je na osnovu eksperimentalnih podataka korišćenjem sigmoidne nelinearne metode pomoću programa Sigma Plot 2000 Trial. Kao referentna supstanca korišćen je etanolni rastvor komercijalnog antioksidanta vitamina C. Vrednosti EC₅₀ za vitamin C dobijene su na isti način kao i za ekstrakte herbi i etarskih ulja sa rastvorima vitamina C u 70% etanolu u opsegu koncentracije od 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 µg/ml.

3.2.6.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja

Za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti izolata odabranih lekovitih i aromatičnih biljnih vrsta *in vitro*, korišćeni su agar difuzioni (Acar i Goldstein, 1996) i mikrodilucioni metod (Candan *et al.*, 2003) Dobijeni rezultati su upoređivani sa aktivnošću odgovarajućih antibiotika (amikacin, ampicilin i nistatin).

Ampicilin (10 µg/disk), amikacin (30 µg/disk) i nistatin (100 IJ/disk) korišćeni su kao odgovarajuća kontrola senzitivnosti testiranih mikroorganizama i proizvedene su u Institutu za imunologiju i virusologiju Torlak iz Beograda.

Za potrebe rada korišćeni su standardni mikroorganizmi iz kolekcija: ATCC (American Type of Culture Collection) i NCIMB (National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen). Standardni sojevi su poreklom iz Instituta za imunologiju i virusologiju Torlak iz Beograda. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja je sprovedeno na devet standardnih sojeva bakterija:

Gram (+) bakterije:

- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Micrococcus flavus* ATCC 10240
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

Gram (-) bakterije:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* NCIMB-9111
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

i na dva standardna soja **gljivica:**

- *Candida albicans* ATCC 10259
- *Candida albicans* ATCC 24433.

Bakterije korišćene u eksperimentima, prvo su presejane na 10 ml tečne hranljive podloge, Müller-Hinton bujoni inkubirane na 37 °C. Nakon 24 h bakterije su presejane na 10 ml sveže tečne podloge, a zatim inkubirane 18 h. Na agar je presejana dobijena kultura mikroorganizama. Postupak koji je korišćen za *C. albicans* je isti, ali je u tom slučaju korišćen Sabouraud bujon.

Disk diffusion test

Na Müller-Hinton agaru (za bakterijske sojeve) i Sabouraud agaru (za gljivice) sproveden je agar difuzioni test. Da bi se postigao semikonfluentan rast navedene podloge su zasejane inokulumom gustine 10⁶ bakterija/ml. Ekstrakti su rastvoreni u

DMSO-u (30 mg/ml-ispitivana koncentracija ekstrakata). Etarska ulja su rastvorena u apsolutnom etanolu i primenjivana koncentracija za ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja je u ovom slučaju 2 i 4 % (m/v). Kao kontrola korišćen je apsolutni etanol. Na zasejane podloge naneta je po jedna kap (20 µl) uzorka. U aerobnim uslovima 18 h na 37 °C za bakterije, odnosno 48 h na 26 °C za gljivice je vršena inkubacija, a zatim su nakon inkubacije mereni dijometri zona inhibicije (u mm). Ampicilin (10 µg/disk), amikacin (30 µg/disk) i nistatin (100 IU/disk), korišćeni su kao odgovarajuća kontrola senzitivnosti testiranih mikroorganizama.

Bujon mikrodilucioni metod

Korišćenjem bujon mikrodilucionog testa u pločama za mikrotitraciju sa 96 mesta određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) ispitivanih uzoraka. U radu je korišćena osamnaestočasovna kultura navedenih bakterijskih sojeva (gustine 5×10^5 bakterija/ml) u Müller-Hinton bujonu sa dodatkom Tween 80 (finalna koncentracija 0,5 % v/v). Korišćeni su rastvori ekstrakata i etarskih ulja koji su rastvarani u DMSO (dimetil sulfoksid). Ispitivani ekstrakti su rastvoreni u DMSO-u i testirane su koncentracije u opsegu 30 mg/ml-0,81 mg/ml. Početna koncentracija je iznosila 30 mg/ml. Etarska ulja su rastvorena u DMSO i ispitivane su koncentracije 1,56-200 µl/ml. U testu su postavljene i pozitivna kontrola bakterijskog rasta, kao i kontrola sterilnosti ekstrakata i etarskih ulja. Inkubirane su ploče u aerobnoj atmosferi, na 37 °C u toku 24 h, odnosno na 30 °C tokom 48 h za gljivice. Semikvantitativno je nakon toga očitavan porast bakterija na osnovu замуćenja tečne podloge i formiranja taloga na dnu bazenčića.

3.2.7. Priprema i analize gotovih proizvoda

Sva predviđena hemijska i biološka ispitivanja odabranih lekovitih i aromatičnih biljaka, vršena su sa namerom da se odaberu njihovi izolati sa prihvatljivim senzornim karakteristikama i značajnim antioksidantnim potencijalom, da se inkorporiraju u pića za osvežavanje i uživanje, kako bi se dobio finalni proizvod odgovarajuće tehnološke, nutritivne i zdravstvene vrednosti.

Analizirani su ekstrakti i etarska ulja herbi sedam biljnih vrsta sa područja južne i jugoistočne Srbije: čubar, vranilova trava, rudinski pelin, macina trava glatka, majkina dušica, dugolisna nana i izop.

3.2.7.1. Formulacija gotovih proizvoda

Na osnovu dobijenih rezultata hemijske analize ekstrakata i etarskih ulja, njihovih *in vitro* bioloških testova, kao i tehnoloških mogućnosti, odabrani su EKSTRAKTI za formulaciju gotovih proizvoda i to:

- ledeni čaj
- sirup
- sok i
- liker.

Naime, tokom eksperimenta, pojavio se poseban tehnološki problem slabe rastvorljivosti etarskih ulja u vodenim rastvorima i u alkoholno-vodnim mešavinama sa malim procentom alkohola. Ovo svojstvo uslovljava zamućenje rastvora što nije baš poželjno. Ipak, ako se ova mutnoća stabilizuje to može da bude važan prepoznatljiv, ali i prihvatljiv čulni osećaj.

Nasuprot etarskim uljima, vodeni-etanolni ekstrakti se dobro inkorporiraju u bezalkoholna i alkoholna pića. Uparavanjem rastvarača iz 70% etanolnih ekstrakata u rotacionom vakuum uparivaču, odstranjen je najveći deo alkohola, a tako dobijeni ekstrakti su korišćeni za proizvodnju pića.

Vršena je senzorna ocena finalnih proizvoda, a isti su testirani i na antioksidantnu aktivnost.

Priprema ledenog čaja

Izrada ledenog čaja vršena je u dve faze: priprema osnove za čaj i dodavanje odabranog biljnog ekstrakta.

Osnova za ledeni čaj je slatko kiseli rastvor koji sadrži 7% saharoze i 0,2% limunske kiseline. Ova količina šećera je odabrana jer se iz iskustva prihvata kao optimalna za osvežavanje – ima odgovarajući osmotski pritisak koji vodu zadržava u vanćelijskoj tečnosti tako da može i da utoli žeđ.

Za ove proizvode odabrani su ekstrakti herbe čubra (*Satureja kitaibelii*) i vranilove trave (*Origanum vulgare*), koji su se zbog prijatnog i osvežavajućeg ukusa najbolje uklopili u senzorne karakteristike proizvoda. Testirane su različite koncentracije ekstrakta u izradi proizvoda: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 g/l.

Priprema sirupa

Za izradu šećernog sirupa odabran je ekstrakt herbe majkine dušice (*Thymus serpyllum*) jer se, zahvaljujući prijatnom mirisu, po literaturnim saznanjima i našem iskustvu najbolje uklopio sa aspekta senzornih svojstava.

Izrada sirupa je vršena u dve faze: priprema šećernog sirupa i dodavanje odabranog biljnog ekstrakta.

Rastvaranjem saharoze u vodi dobijen je sirup sa 65% suve materije. Korekcija stepena slasti je vršena dodavanjem limunske kiseline do koncentracije 1,5%.

Sirup je podeljen u pet porcija i u svaki je dodata odgovarajuća količina ekstrakta herbe *T. serpyllum* tako da je dobijena koncentracija ekstrakta u sirupu: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 g/l.

Priprema osvežavajućih pića

Za proizvodnju osvežavajućeg pića korišćena je herba *Mentha longifolia* koja je prirodno sušena. Naime, ovakav način sušenja herbe je ispoljio najbolji antioksidantni kapacitet.

Baza za piće je pripremljena kao vodeni rastvor saharoze i limunske kiseline (14% saharoze i 0,4% limunske kiseline). Piće je pripremljeno sa različitim udelom ekstrakta herbe: 0,6; 0,7; 0,8; 1,0; 1,2 g/l.

Priprema gorkog likera

Gorki likeri su poznati kao aperitivi za poboljšavanje apetita. Najčešće se u njih dodaju izolati herbe pelena *Artemisia absinthium*. Prema našim saznanjima na domaćem i inostranom tržištu nisu prisutni gorki likeri koji su napravljeni od rudinskog pelena *Artemisia alba*, što nas je navelo da naša istraživanja usmerimo na proveru mogućnosti primene ove biljne vrste.

Rafinirani etil alkohol (96,6% v/v) je omekšanom vodom sveden na odgovarajuću jačinu alkohola (45%v/v). Nakon toga je dodat prethodno pripremljen šećerni sirup koji je dobijen rastvaranjem saharoze u vodi (65% suve materije). Po završenom postupku definisanja jačine pića pripremljena baza za ovu vrstu pića je podeljena u seriju od pet uzoraka. U svaki je dodata odgovarajuća količina ekstrakta herbe tako da je napravljena proba od pet uzoraka likera sa različitim koncentracijama ekstrakta herbe *A. alba*: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 g/l i testirana na test dopadljivosti.

3.2.7.2. Ispitivanje kvaliteta, polifenolnih jedinjenja i antioksidantnih svojstava gotovih proizvoda

Ispitivanje kvaliteta proizvoda

Kvalitet gotovih proizvoda je definisan senzornom ocenom i hemijskim analizama.

Za senzornu ocenu bezalkoholnih pića je primenjivan Pravilnik o ocenjivanju kvaliteta osvežavajućih bezalkoholnih pića Novosadskog sajma.

Obrazac za senzorno ocenjivanje bezalkoholnih pića:

Uzorak _____

Bezalkoholno piće	Maksimalan broj poena	Ocena	Napomena
Boja	4		
Ujednačenost/homogenost	4		
Miris	5		
Ukus	7		
UKUPNO	20		

Senzorna ocena likera vršena je prema protokolu propisanom monografijom dr Nikićevića (Nikićević i Tešević, 2010).

Obrazac za senzorno ocenjivanje alkoholnih pića:

Uzorak _____

Liker	Maksimalan broj poena	Ocena	Napomena
Bistrina	1		
Boja	1		
Tipičnost	2		
Miris	6		
Ukus	10		
UKUPNO	20		

Ocenjivačku komisiju činilo je 15 (petnaest) ocenjivača, stručnjaka iz oblasti prehrambene tehnologije, prosečne starosti od 30 do 65 godina.

Svi uzorci su tokom senzornog ocenjivanja bili adekvatno označeni, a dobijeni rezultati su statički obrađeni.

Kao parametri hemijskog sastava su utvrđivani sadržaj u vodi rastvorne suve materije i sadržaj etanola. Kao važna tehnološka karakteristika je određivana antioksidantna aktivnost gotovog proizvoda.

Suva materija i indeks refrakcije su utvrđivani pomoću Abeovog refraktometra (Carl Zeiss, mernog opsega u masenom sadržaju šećera od 0,00% do 95,00%, i indeksa refrakcije od 1,30000 - 1,71000. Preciznost merenja je 0,05 (za suhu materiju) ili 0,0001 (za indeks refrakcije).

Sadržaj etanola je utvrđivan pomoću piknometra prema *Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza alkoholnih pića* („Sl.list SFRJ“, br.70/87).

Antioksidantna aktivnost je ocenjena primenom FRAP i DPPH metode, dok je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida određen spektrofotometrijskim metodama sa Folin-Ciocalteu reagensom i aluminijum(III)-hloridom, respektivno. Sva merenja su vršena u triplikatu, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.2.8. Statistička analiza

Svi eksperimenti su izvršeni u triplikatu, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Obrada eksperimentalnih podataka vršena je primenom programa Origin 8.0, Microsoft Excell 2007 i Sigma Plot 2000 Trial.

Rezultati su statistički obrađeni pomoću softverskog paketa SPSS (*for Windows Release 10.0* SPSS Inc., 1989–1999, Trial) u okviru kojeg su razlike između prosečnih vrednosti rezultata utvrđene analizom varijanse (one-way ANOVA), a za post-hoc analizu korišteni su Takijev (Tukey HSD test) i Šefeov (Scheffé test) test.

3.3. REZULTATI I DISKUSIJA

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja i odabranim metodama, rezultati doktorske disertacije su prikazani kao:

a) Karakteristike polaznih sirovina

- ✓ Osnovni hemijski sastav biljnog materijala
- ✓ Prinos etanolno-vodenih ekstrakata
- ✓ Sadržaj etarskih ulja u biljnom materijalu
- ✓ Sastav isparljive frakcije ekstrakata i etarskih ulja
- ✓ Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima
- ✓ Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima
- ✓ Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja
- ✓ Uticaj načina sušenja na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima
- ✓ Uticaj načina sušenja na antioksidantnu aktivnost ekstrakata i etarskih ulja i
- ✓ Antimikrobna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja.

b) Karakteristike gotovih proizvoda

- ✓ Senzorna ocena kvaliteta gotovih proizvoda
- ✓ Hemijska analiza gotovih proizvoda
- ✓ Ukupna fenolna jedinjenja i flavonoidi u gotovim proizvodima i
- ✓ Antioksidantna aktivnost gotovih proizvoda.

3.3.1. Osnovni hemijski sastav biljnog materijala

Osnovna hemijska (gravimetrijska) ispitivanja sprovedena su prema propisima Ph. Jug. IV i Ph. Jug. V. Rezultati svih određivanja predstavljaju srednju vrednost tri uporedne analize i nalaze se u farmakopejskim granicama. U tabeli 3 predstavljeni su rezultati osnovnih hemijskih ispitivanja koji u velikoj meri definišu kvalitet biljnog materijala.

Tabela 3. Osnovni hemijski sastav biljnog materijala

Biljna vrsta	Sadržaj vlage (%)	Sadržaj pepela (%)	Sadržaj peska (%)
<i>Satureja kitaibelii</i>	11,0	5,8	0,4
<i>Origanum vulgare</i>	10,9	11,5	1,8
<i>Artemisia alba</i>	8,2	5,2	0,4
<i>Nepeta nuda</i>	10,5	9,3	0,8
<i>Thymus serpyllum</i>	12,9	5,9	0,4
<i>Mentha longifolia</i> ^a	11,1	8,0	0,6
<i>Mentha longifolia</i> ^b	10,2	7,9	0,6
<i>Mentha longifolia</i> ^c	10,7	8,1	0,6
<i>Hyssopus officinalis</i>	9,6	6,9	0,5

^a Sušena prirodnim putem, ^b u laboratorijskoj sušnici, ^c u niskotemperaturnoj sušari

Sadržaj vlage, pepela, pepela nerastvorljivog u HCl ukazuje da su uzorci dobro pripremljeni, to jest dobro osušeni i očišćeni i ispitivani parametri zadovoljavaju uslove koje propisuju farmakopeje.

Sadržaj vlage sveže herbe dugolisne nane *M. longifolia* bio je 54,6%, dok je za *M. longifolia* sušenu prirodnim putem iznosio 11,1%, odnosno 10,7% i 10,2% za onu sušenu u niskotemperaturnoj i laboratorijskoj sušari.

3.3.2. Prinos etanolno-vodenih ekstrakata

Efikasnost ekstrakcije materija iz biljne sirovine zavisi od brojnih faktora, kao što su: tehnika ekstrakcije, priroda biljnog materijala, polarnost rastvarača, odnos čvrstog materijala i rastvarača (hidromodul), stepen usitnjenosti, temperatura i vreme. Kao

kriterijum efikasnosti ekstrakcije uzima se prinos suvog ekstrakta ili prinos željene supstance (Veličković, 2005).

Rezultati prinosa etanolno-vodenih ekstrakata odabranog lekovitog i aromatičnog bilja, koji su dobijeni postupkom perkolacije, prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Prinos etanolno-vodenih ekstrakata ispitivanog biljnog materijala

Biljna vrsta	Prinos ekstrakata g/100 g herbe
<i>Satureja kitaibelii</i>	11,4
<i>Origanum vulgare</i>	16,4
<i>Artemisia alba</i>	16,5
<i>Nepeta nuda</i>	14,3
<i>Thymus serpyllum</i>	12,2
<i>Mentha longifolia</i> ^a	11,6
<i>Mentha longifolia</i> ^b	9,4
<i>Mentha longifolia</i> ^c	8,9
<i>Hyssopus officinalis</i>	14,4

^a Sušena prirodnim putem, ^b u laboratorijskoj sušnici, ^c u niskotemperaturnoj sušari

Prinos ekstrakta herbe *A. alba* određen gravimetrijskim postupkom bio je najveći u poređenju sa ostalim biljnim vrstama i iznosio je 16,5 g/100 g suve herbe.

Ukupan sadržaj ekstraktivnih materija u slučaju ostalih biljnih materijala nalazio se u granicama od 8,9 do 16,4 g/100 g herbe.

Na osnovu dobijenih rezultata, uočava se uticaj vrste sušenja na prinos ekstraktivnih materija. Po prinosu se ističe *M. longifolia* sušena prirodnim putem (11,6 g/100g suvog biljnog materijala), a najmanji prinos zabeležen je u herbi dugolisne nane sušene u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari (8,9 g/100g suvog biljnog materijala).

3.3.3. Sadržaj etarskih ulja u biljnom materijalu

Izolovanje etarskih ulja iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala, sprovedeno je hidrodestilacijom u aparatu po Klevendžeru prema Ph. Jug. IV. Rezultati određivanja sadržaja etarskih ulja prikazani su u tabeli 5 i na slici 24. Sadržaj je izražen u ml/kg

osušenog biljnog materijala. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost iz tri ponavljanja. Sadržaj etarskih ulja u aromatičnim biljnim vrstama je varijabilan. Nadzemni delovi odabranih biljnih vrsta, u fenološkoj fazi cvetanja, su se pokazali kao najbolja sirovina za izolovanje etarskih ulja.

Tabela 5. Sadržaj etarskih ulja suve herbe ispitivanih biljnih vrsta

Biljna vrsta	Sadržaj etarskog ulja (ml/kg)
<i>Satureja kitaibelii</i>	3
<i>Origanum vulgare</i>	6
<i>Artemisia alba</i>	5
<i>Nepeta nuda</i>	8
<i>Thymus serpyllum</i>	5
<i>Mentha longifolia</i> ^a	9
<i>Mentha longifolia</i> ^b	6
<i>Mentha longifolia</i> ^c	11
<i>Hyssopus officinalis</i>	10

^a Sušena prirodnim putem, ^b u laboratorijskoj sušnici, ^c u niskotemperaturnoj sušari

Najveći sadržaj etarskog ulja bio je u herbi dugolisne nane *M. longifolia* sušenoj u niskotemperaturnoj sušari (11 ml/kg), dok se kod ostalih vrsta sadržaj kretao od 3-10 ml/kg. Najmanji sadržaj etarskog ulja je ustanovljen u herbi čubra *S. kitaibelii* (3 ml/kg).

Sadržaj etarskog ulja iz nadzemnog dela u cvetu čubra *S. kitaibelii*, bio je 3 ml/kg (Suva planina, Devojački grob). Interesantno je istaći da su biljke sa tri ekološki različita lokaliteta (S. Klisura, V. Ržana i Rtanj) u ranijim istraživanjima sadržavale istu količinu ulja (Palić, Gašić, 1993). Živanović i saradnici 1987 ističu da se količina ulja u ovoj biljnoj vrsti u zavisnosti od staništa, kreće u opsegu od tragova pa do 0,65%. Količina etarskog ulja *S. kitaibelii* na istraživanim lokalitetima Gornja Sokolovica, Vetren i Šljivovički vis, kretala se u granicama od 0,07 do 0,17% (Milosavljević *et al.*, 2000).

Prinos etarskog ulja herbe vranilove trave *O. vulgare* bio je 6 ml/kg (Suva planina, Devojački grob). Prema literaturnim podacima sadržaj etarskog ulja u ovoj biljnoj vrsti se kreće od 0,15 do 1,2%, što je u granicama naših istraživanja (Jančić *et al.*, 1995; PDR, 2004).

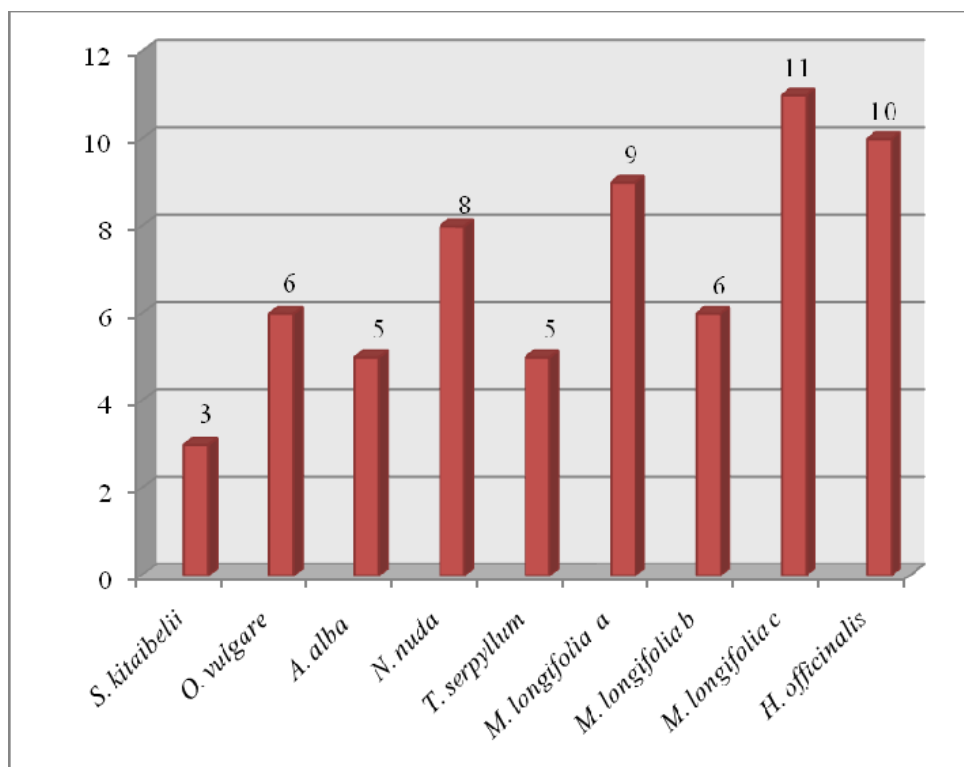
Mali je broj podataka o hemijskim analizama vrsta roda *Artemisia* L. Najveći broj podataka se odnosi na pelen *A. absinthium* L. Prinos etarskog ulja herbe rudinskog pelena *A. alba* iznosio je 5 ml/kg (Golemi kamen, Knjaževac). Ispitivanjem hemijskog sastava etarskog ulja ove vrste posle sedam godina skladištenja ustanovljeno je smanjenje prinosa ulja sa početnih 0,17% na 0,09% (Blagojević *et al.*, 2009). Jančić i saradnici navode da herba rudinskog pelena sadrži od 0,5 do 0,6% etarskog ulja (Jančić *et al.*, 1995). Sadržaj etarskog ulja iz nadzemnih delova biljke, ubranoj u fazi cvetanja sa lokaliteta Kokin Brod je iznosio 0,57% (Gorunović *et al.*, 1992).

Sadržaj etarskog ulja herbe nepete, glatke macine trave *N. nuda* bio je 8 ml/kg (Goleška visoravan, Bosilegrad). Prilikom ispitivanja različitih hemotipova vrste *N. nuda* (Basarabi, Frasinei i Herculane) sa područja Rumunije prikupljenih u različitim fenofazama, ustanovljeno je da se prinos etarskog ulja kretao od 0,66-3,2% i da je najbolji bio u fazi punog cveta (Padure *et al.*, 2008).

Prinos etarskog ulja majkina dušica *T. serpyllum* iznosio je 5 ml/kg (Guba, Prokuplje). Sadržaj etarskog ulja iz herbe poreklom iz Estonije kretao se od 0,6-4,4 ml/kg, a iz Letonije i Jermenije 1,9-8,2 ml/kg (Paaver, 2008). Prema literaturnim podacima, etarsko ulje majkine dušice sadrži od 0,1 do 0,6% etarskog ulja (Jančić *et al.*, 1995; Pekić, 1983; PDR, 2004).

Prinos etarskih ulja sveže i suve herbe dugolisne nane *M. longifolia* (Rastovnica, Prokuplje), kretao se u granicama od 6 do 11 ml/kg i međusobno je različit u zavisnosti od načina sušenja. Po prinosu etarskog ulja suve herbe ističe se kako je i navedeno biljni materijal sušen u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari NTKS (11 ml/kg), a najmanji prinos zabeležen je kod materijala sušenog u laboratorijskoj sušnici (6 ml/kg). Sveže izolovana etarska ulja dugolisne nane su svetlo-žute boje, koja stajanjem prelaze u tamnija, karakterističnog mirisa.

Sadržaj etarskog ulja izolovanog iz sveže herbe *M. longifolia* je 6 ml/kg. Kako je suva biljna sirovina dostupna za upotrebu tokom cele godine, a u uzimajući u obzir veći sadržaj etarskog ulja, ista je korišćena u daljim ispitivanjima. Količina etarskog ulja u herbi dugolisne nana ubranoj na lokalitetu Grza kod Paraćina iznosila je 1% (Mitrović *et al.*, 2002). Prinos etarskog ulja herbe *M. longifolia* sušenoj na vazduhu i izdvojenog hidrodestilacijom na Klevendžeru u Turskoj iznosio je 2,31 ml/100 g, što je više nego u slučaju ispitivanja mente sa prostora Srbije (Gulluce *et al.*, 2007).



^a Sušena prirodnim putem, ^b u laboratorijskoj sušnici, ^c u niskotemperaturnoj sušari

Slika 24. Sadržaj etarskog ulja ispitivanog biljnog materijala suve herbe

Sadržaj etarskog ulja u herbi izopa je bio 10 ml/kg (Golemi kamen, Knjaževac). Nikolova i Manolov (1990) ispitivali su količinu etarskog ulja u raznim biljnim organima izopa *H. officinalis* (cvetu, listu, nadzemnom delu u fazi cvetanja i stabljici). Ustanovili su da je najveća količina etarskog ulja u cvetu (0,9%), zatim u listu (0,66%), nadzemnom delu u fazi cvetanja (0,51%), a najmanje u stabljici (0,03%). Prema literaturnim podacima herba izopa sadrži do 1% etarskog ulja (Sarić, 1989; Jančić *et al.*, 1995; Grlić, 1986; Tucakov, 1990).

3.3.4. Sastav isparljive frakcije ekstrakata i etarskih ulja

Hemijskom karakterizacijom ekstrakata i etarskih ulja sedam različitih lekovitih i aromatičnih biljnih vrsta primenom GC-FID i GC-MS analiza, utvrđeno je prisustvo različitih komponenata.

Sastav isparljive frakcije ekstrakata i etarskih ulja ispitivanih biljnih vrsta prikazan je u tabelama 6-13. GC-hromatogrami su dati u Prilogu disertacije. U tabeli 6 prikazan je kvalitativan i kvantitativni sastav isparljivih frakcija čubra.

Hemijski sastav ekstrakta herbe *S. kitaibelii* se u velikoj meri razlikuje od sastava etarskog ulja. Broj registrovanih komponenata u analiziranom ekstraktu je 48 dok je broj identifikovanih komponenata 35 (90,24% od ukupne mase). Kod ekstrakta u većem procentu su zastupljeni monoterpeni (69,2%) u odnosu na seskviterpene (21,04%). Dominantna komponenta je monoterpen, ali ne *trans*-geraniol kao u slučaju etarskog ulja, već aldehid neral (12,53%). Komponente prisutne u etarskom ulju a ne u ekstraktu su: γ -terpinen, nerol, β -kopaen, γ -murolen, eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol. Sa druge strane, neke komponente se nalaze samo u ekstraktima: α -tujen, β -pinen, α -felandren, α -terpinen, *trans*-linalol oksid, *cis*-linalol oksid, *trans*-sabinen hidrat, kamfor, *cis*-dihidro karvon, *trans*-dihidro karvon, karvakrol, germakren D, α -farnesen.

Broj registrovanih, a ujedno i identifikovanih komponenata kod etarskog ulja je 27. Dominantna jedinjenja etarskog ulja su kao i kod ekstrakta monoterpeni (72,86%), dok su seskviterpeni zastupljeni u manjem procentu (27,17%). Glavna komponenta u etarskom ulju je *trans*-geraniol (36,13%), što odgovara literaturnim podacima (Milosavljević *et al.*, 2000). Prisutni su od monoterpena *p*-cimen, limonen, linalol, borneol, terpinen-4-ol, dok su od seskviterpena najzastupljeniji *trans*-kariofilen, γ -murolen, β -burbonen i kariofilen oksid. U etarskom ulju primetan je sadržaj alkohola (linalol, borneol) i aldehida (geranial, neral).

Prilikom ispitivanja kvalitativnog sastava i kvantitativnog sadržaja komponenata *S. kitaibelii* (populacije sa staništa S. klisura, V. Ržana i Rtanj) utvrđeno je prisustvo velike količine geraniola u etarskom ulju (58,69 odnosno 13,69%), a posebno velika količina geranilacetata u etarskom ulju populacije sa staništa V. Ržana (30,05%), odnosno *p*-cimola (23,11%) u etarskom ulju populacije sa staništa Rtanj (Palić, 1981).

Pregled udela terpena u ekstraktu i etarskom ulju prikazan je u tabeli 6, dok se primeri GC-hromatograma mogu videti na slikama 1a, 1b u prilogu.

Tabela 6. Hemijski sastav ekstrakta i etarskog ulja herbe *S. kitaibelii*

Redni broj	Komponente	KIE ekstrakt	KIE etarsko ulje	KIL	Ekstrakt (%)	Etarsko ulje (%)
1	α -tujen ^m	932,9	-	924	0,66	-
2	α -pinen ^m	932,9	932,2	932	2,19	0,36
3	kamfen ^m	946,7	946,7	946	1,11	0,20
4	β -pinen ^m	975,9	-	974	0,65	-
5	mircen ^m	1002,7	992,5	988	1,18	0,22
6	α -felandren ^m	1005,4	-	1002	2,56	-
7	α -terpinen ^m	1017,7	-	1014	0,31	-
8	<i>p</i> -cimen ^m	1025,6	1024,8	1020	4,77	4,45
9	limonen ^m	1029,0	1028,5	1024	7,06	5,58
10	1,8-cineol ^m	1032,4	1030,7	1026	1,62	0,38
11	<i>cis</i> - β -ocimen ^m	n/a	1039,2	1032	1,76	1,65
12	<i>trans</i> - β -ocimen ^m	1050,8	1049,3	1044	0,62	1,05
13	γ -terpinen ^m	-	1058,8	1054	-	0,52
14	<i>cis</i> -sabinen hidrat ^m	1069,3	1067,9	1065	0,56	2,47
15	<i>trans</i> -linalol oksid ^m	n/a	-	1073	9,95	-
16	<i>cis</i> -linalol oksid ^m	n/a	-	1087	0,47	-
17	<i>trans</i> -sabinen hidrat ^m	1102,4	-	1098	0,57	-
18	linalol ^m	1104,9	1102,7	1095	4,50	8,94
19	kamfor ^m	1145,4	-	1141	1,31	-
20	borneol ^m	1168,0	1167,0	1165	3,90	3,84
21	terpinen-4-ol ^m	1180,3	1178,1	1174	1,38	2,76
22	α -terpineol ^m	n/a	1192,7	1186	0,40	0,27
23	<i>cis</i> -dihidro karvon ^m	n/a	-	1191	2,60	-
24	<i>trans</i> -dihidrokarvon ^m	1200,0	-	1200	1,25	-
25	nerol ^m	-	1231,4	1227	-	1,13
26	neral ^m	1260,7	1243,2	1235	12,53	1,16
27	<i>trans</i> -geraniol ^m	1260,7	1260,6	1249	0,81	36,13
28	geranial ^m	n/a	1273,5	1264	1,44	1,75
29	karvakrol ^m	1323,0	-	1298	3,04	-
30	α -kopaen ^s	n/a	1376,1	1374	1,57	0,47
31	β -burbonen ^s	1385,8	1385,0	1387	2,44	3,56
32	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1420,2	1419,6	1417	8,14	4,74
33	β -kopaen ^s	-	1429,5	1430	-	0,30
34	γ -murolen ^s	-	1482,3	1478	-	8,97
35	germakren D ^s	1482,5	-	1484	4,85	-
36	biciklogermakren ^s	1497,8	1497,3	1500	1,20	2,53
37	α -farnesen ^s	n/a	-	1506	0,32	-
38	spatulenol ^s	n/a	1578,4	1577	1,08	1,64
39	kariofilen oksid ^s	1584,8	1582,7	1582	1,44	4,42
40	eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol ^s	-	1688,1	1687	-	0,54

KIE - Kovats-ev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS); KIL - Kovats-ev (retencioni) indeks - literarni podatak (Adams, 2007); m - monoterpeni, s – seskviterpeni

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava ekstrakta i etarskog ulja herbe *Origanum vulgare* dati su u tabeli 7.

Hemijski sastav ispitivanog ekstrakta se razlikuje od hemijske kompozicije etarskog ulja. Hemijskom karakterizacijom ekstrakta herbe primenom GC i GC-MS, identifikovano je svih 39 komponenata, koje čine 100% ukupnog sastava ekstrakta. Značajan deo ukupnih terpena čine seskviterpeni, a najdominantniji je *trans*-kariofilen sa zastupljenošću od 34,62%.

Tabela 7. Hemijski sastav ekstrakta i etarskog ulja herbe *O. vulgare*

Redni broj	Komponente	KIE ekstrakt	KIE etarsko ulje	KIL	Ekstrakt (%)	Etarsko ulje (%)
1	α -tujen ^m	913,8	926,6	924	0,29	0,29
2	α -pinen ^m	-	932,4	932	-	0,35
3	kamfen ^m	933,5	946,7	946	0,20	0,42
4	sabinen ^m	961,1	972,9	969	1,69	4,42
5	β -pinen ^m	-	975,3	974	-	1,08
6	mircen ^m	-	992,6	988	-	0,48
7	α -terpinen ^m	-	1016,8	1014	-	0,25
8	<i>p</i> -cimen ^m	1014,4	1025,0	1020	1,07	0,68
9	1,8-cineol ^m	1023,2	1030,6	1026	1,43	6,77
10	<i>cis</i> - β -ocimen ^m	-	1039,4	1032	-	3,29
11	<i>trans</i> - β -ocimen ^m	1038,8	1049,5	1044	0,24	4,65
12	γ -terpinen ^m	-	1059,0	1054	-	1,02
13	<i>cis</i> -sabinen hidrat ^m	1060,9	-	1065	1,10	-
14	artemisia alkohol ^m	1069,5	-	1080	0,26	-
15	terpinolen ^m	-	1088,5	1086	-	0,26
16	<i>o</i> -gvajakol ^o	1090,8	-	1087	3,74	-
17	linalol ^m	1095,0	1102,2	1095	4,46	1,78
18	kamfor ^m	1133,9	-	1141	0,68	-
19	3,5-dihidroksi-6-metil 2,3-dihidro-4H-piran-4-on ^o	1150,7	-	1149	2,12	-
20	borneol ^m	1157,9	1167,0	1165	1,98	2,16
21	terpinen-4-ol ^m	1168,2	1178,3	1174	0,65	1,17
22	α -terpineol ^m	1183,4	1192,7	1186	1,27	3,08
23	hidrokinon ^o	1206,7	-	1220	0,33	-
24	1,4:3,6-dianhidro- α -d-glukopiranos* ^o	1214,7	-	n/a	3,36	
25	bornil acetat ^m	1273,9	1286,8	1287	1,73	0,38
26	indol ^o	1299,0	-	1290	0,42	-
27	β -burbonen ^s	1369,5	1385,0	1387	2,05	1,33
28	β -elemen ^s	1378,3	-	1389	0,31	-
29	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1403,3	1420,2	1417	34,62	9,74
30	α -humulen ^s	-	1454,1	1452	-	1,29
31	alo-aromadendren ^s	-	1461,4	1458	-	1,15

32	γ -murolen ^s	-	1483,7	1478	-	27,14
33	germakren D ^s	1465,5	-	1484	0,44	-
34	biciklogermakren ^s	-	1497,6	1500	-	8,17
35	α -murolen ^s	-	1501,6	1500	-	2,34
36	acifilen ^s	-	1505,9	1501	-	0,45
37	β -bisabolen ^s	1494,5	-	1505	0,56	-
38	<i>trans,trans</i> - α -farnesen ^s	-	1510,1	1505	-	3,32
39	δ -kadinen ^s	1508,2	-	1522	2,07	-
40	germakren B ^{*s}	-	1576,5	1559	-	3,46
41	spatuleno ^s	1563,8	-	1577	3,79	-
42	kariofilen oksid ^s	1567,2	1582,9	1582	2,93	1,74
43	viridiflorol ^s	1577,4	1592,0	1592	0,96	0,38
44	humulen epoksid II ^s	1593,2	-	1608	0,44	-
45	epi- α -kadinol (ζ -kadinol) ^s	-	1643,5	1638	-	2,75
46	α -kadinol ^s	1640,8	1656,4	1652	0,80	4,21
47	germakra-(15),5,10(14) - trien-1 α -ol ^s	1672,9	-	1685	0,80	-
48	longiborneol acetat ^{*s}	1683,5	-	1684	0,63	-
49	oplopanon ^s	1724,7	-	1739	0,43	-
50	heksadekanska kiselina ^{FAD}	1956,3	-	1959	0,91	-
51	etil heksadekanoat ^{FAD}	1977,8	-	1992	8,66	-
52	fitol ^d	2095,7	-	2114	0,89	-
53	etil linoleat ^{FAD}	2098,3	-	2155	1,24	-
54	etil linolenat ^{FAD}	2150,6	-	2159	4,38	-
55	etil oktadekanoat ^{FAD}	2176,9	-	2196	6,07	-

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, d - diterpeni, FAD - masne kiseline i derivati masnih kiselina, o - ostalo; * - probna identifikacija, n/a - nije dostupno

Monoterpeni su zastupljeni u manjem procentu u odnosu na seskviterpene. Najviše je zastupljen linalol (4,46%). Kamfor je zastupljen u ekstraktu, za razliku od etarskog ulja, ali sa malim udelom (0,68%). Evidentirano je vidno prisustvo estara masnih kiselina poput etil heksadekanoata (8,66%), etil oktadekanoata (6,07%) i etil linolenata (4,38%). Kada je u pitanju etarsko ulje herbe *O. vulgare* kao što se vidi iz tabele 7 registrovane su, a ujedno i identifikovane 32 komponente. U etarskom ulju herbe monoterpeni su zastupljeni sa 32,53%, a seskviterpeni sa 67,47%. Seskviterpeni su dominantna klasa jedinjenja etarskog ulja sa glavnom komponentom γ -murolenom (27,14%). Pored pomenute, etarsko ulje obiluje sledećim komponentama iz klase seskviterpena: *trans*-kariofilen (9,74%), biciklogermakren (8,17%), α -kadinol (4,21%). Kada su u pitanju monoterpeni, glavne komponente su 1,8-cineol (6,77%), sabinen (4,42%) i *trans*- β -ocimen (4,65%).

Ispitivanjem hemijskog sastava ulja *O. vulgare* sa područja Šar planine ustanovljena je kao dominantna komponenta *p*-cimen (Stolić, 1997), čije je prisustvo u

ispitivanom etarskom ulju i ekstraktu znatno manje. Etarska ulja vrsta roda *Origanum* bila su predmet analiza mnogih istraživača (Fasseas *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Azizi *et al.*, 2009). Na slikama 2a, 2b (prilog) mogu se videti gasni hromatogrami izolata *O. vulgare*.

Sve identifikovane komponente ekstrakta i etarskog ulja herbe *A. alba* prikazane su u tabeli 8, dok se primeri GC-hromatograma mogu videti na slici 3a, 3b u prilogu.

Tabela 8. Hemijski sastav ekstrakta i etarskog ulja herbe *A. alba*

Redni broj	Komponente	KIE ekstrakt	KIE etarsko ulje	KIL	Ekstrakt (%)	Etarsko ulje (%)
1	triciklen ^m	927,3	920,4	921	0,19	0,14
2	α -pinen ^m		932,0	932	-	0,80
3	kamfen ^m	945,9	946,2	946	0,62	3,21
4	β -pinen ^m	964,0	974,9	974	1,06	0,20
5	jomogi-alkohol ^m	-	1003,0	999	-	1,78
6	<i>p</i> -cimen ^m	-	1024,8	1020	-	0,41
7	β -felandren ^m	1016,5	-	1025	0,93	-
8	1,8-cineol ^m	1030,8	1030,6	1026	5,89	14,05
9	artemisia keton ^m	1063,1	1062,9	1056	2,94	15,21
10	artemisia alkohol ^m	1086,2	1085,3	1080	0,60	1,25
11	<i>trans</i> -krisantenol ^m	1116,2	1115,5	1096	7,43	8,57
12	krisantenon ^{m*}	1126,2	1136,8	1124	0,99	0,33
13	<i>trans</i> -pinokarveol ^m	-	1140,0	1135	-	1,53
14	kamfor ^m	1144,0	1144,7	1141	4,31	23,70
15	pinokarvon ^m	1163,3	1162,5	1160	0,35	1,57
16	<i>cis</i> -krisantenol ^m	-	1164,4	1160	-	1,10
17	borneol ^m	1167,3	1166,8	1165	1,01	1,44
18	<i>cis</i> -pinokamfon ^m	1174,5	-	1172	1,29	-
19	terpinen-4-ol ^m	-	1178,1	1174	-	0,99
20	n-dekanal	1216,8	-	1201	1,79	-
21	bornil acetat ^m	1287,3	-	1287	0,82	-
22	para-vinil-gvajakol ^m	1319,3	-	1309	1,95	-
23	δ -elemen ^s	1348,8	-	1335	1,74	-
24	metil eugenol ^o	1409,8	-	1403	0,23	-
25	<i>cis</i> -treo-davanafuran ^s	1418,5	-	1414	0,40	-
26	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1419,2	-	1417	1,55	-
27	alo-aromadendren ^s	-	1461,0	1458	-	0,52
28	γ -murolen ^s	-	1481,5	1478	-	0,63
29	germakren D ^s	1481,7	-	1484	2,92	-
30	biciklogermakren ^s	1497,1	-	1500	0,91	-
31	α -murolen ^s	1508,7	-	1500	0,71	-
32	silfiperfolan-6- α -ol ^s	-	1506,0	1507	-	0,48

33	1-endo-burbonanol ^{s*}	-	1523,5	1518	-	3,30
34	silfiperfol-5-en-3-ol B ^s	-	1536,4	1534	-	0,71
35	silfiperfol-5-en-3-on B ^s	-	1548,9	1550	-	1,23
36	silfiperfol-5-en-3-ol A ^s	-	1557,0	1557	-	1,54
37	silfiperfol-5-en-3-on A ^s	1574,2	1572,5	1574	0,17	6,44
38	spatulanol ^s	1579,7	-	1577	0,25	-
39	kariofilen oksid ^s	1584,2	1582,4	1582	0,81	1,56
40	α -eudesmol ^s	1656,2	-	1652	1,23	-
41	α -bisabolol ^s	1687,0	1685,2	1685	1,92	6,07
42	solavetivon ^{s*}	-	1691,2	n/a	-	1,24
43	<i>iso</i> -longifolol ^s	1729,7	-	1728	0,39	-
44	ciklokolorenon ^s	1752,9	-	1759	2,14	-
45	korimbolon ^s	1853,2	-	n/a	10,34	-
46	umbeliferon(skimetin) ^o	1881,5	-	1875	4,90	-
47	skopoletin ^s	1974,3	-	n/a	14,03	-
48	etil heksadekanoat ^{FAD}	1998,2	-	1992	2,23	-
49	<i>E,E</i> -geranil linalol ^d	2050,6	-	2026	2,00	-
50	fitol ^d	2117,0	-	2114	3,16	-

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, d - diterpeni, FAD - masne kiseline i derivati masnih kiselina, o - ostalo; n/a - nije dostupno * - probna identifikacija

Ekstrakti ispitivane vrste nisu do sada analizirani kako sa aspekta hemijskog sastava, tako i bioloških aktivnosti. Hemijski sastav ispitivanog ekstrakta se razlikuje od sastava etarskog ulja.

Hemijskom karakterizacijom ekstrakta herbe rudinskog pelena identifikovano je ukupno 36 od 49 registrovanih komponenata, koje čine 84,19 od 100% ukupnog sastava ekstrakta. Značajan deo ukupnih terpena čine seskviterpeni, a najdominantniji su: skopoletin 14,03% i korimbolon 10,34%. Umbeliferon (skimetin) zastupljen je sa 4,90%. Metil eugenol je zastupljen u ekstraktu samo 0,23%. Monoterpeni su zastupljeni u manjem procentu u odnosu na ispitivano etarsko ulje. Najviše je zastupljen *trans*-krisantenol 7,43%. Smanjen je sadržaj kamfora i 1,8-cineola. Kamfor je zastupljen sa samo 4,31%, a 1,8-cineol 5,89%. Sadržaj artemisia ketona je 2,94% što je znatno niže u odnosu na analizirano etarsko ulje, a aldehid n-dekanal je zastupljen sa 1,79%.

Sastav ekstrakata je značajan u kontekstu njegove primene u prehrambenoj industriji, zatim u medicinske i kozmetičke svrhe, gde se ekstrakti koriste kao sirovina. Odsustvo α - i β -tujona u ekstraktu je veoma važna podatak jer se oni mogu dodavati u razne proizvode. Tujon spada u toksična jedinjenja, može izazvati niz poremećaja u organizmu, kada se koristi duže vreme, čak i u malim količinama. Dakle, njegova koncentracija u proizvodima je strogo ograničena, a njegova upotreba je zabranjena.

Sastav isparljivih frakcija, kao i osvežavajući kamforast gorki ukus, opravdava korišćenje etanolno-vodenog ekstrakta *A. alba* kao amara-aromata, za pripremu raznih fitopreparata, kao i za pravljenje alkoholnih pića.

U etarskom ulju herbe *A. alba* identifikovano je i registrovano 28 komponenata (tabela 8). Obiluje monoterpenima (76,28%), dok seskviterpena ima manje (23,72%). Rezultati ispitivanja prikazani tabelom ukazuju da u etarskom ulju herbe *A. alba* dominiraju jedinjenja iz klase oksidovanih monoterpena koja su zastupljena u velikoj količini. Kao dominantne komponente iz ove klase izdvajaju se: kamfor (23,70%), artemisia keton (15,21%) i 1,8-cineol (14,05%).

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja etarskog ulja pelena iz Srbije (Blagojević, *et al.*, 2009). Visok sadržaj 1,8-cineola (21,5-27,6%) i kamfora (15,9-37,3%) pronađeni su i u uljima *A. cana*, *A. frigida*, *A. longifolia* i *A. ludoviciana* (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

Od ostalih klasa terpenoida u etarskom ulju sa ovog lokaliteta, zastupljeni su u značajnoj količini i ugljovodonični monoterpeni, sa kamfenom kao dominantnom komponentnom (3,21%), *trans*-krisantenolom (8,57%) dok su silfiperfol-5-en-3-on A (6,44%) i α -bisabolol (6,07%) dominantni seskviterpeni ovog ulja.

Komponente, kao što su kamfor, 1,8-cineol i artemisia keton tipične su za nekoliko različitih ulja *Artemisia* vrsta, uključujući i testirano ulje *A. alba*. Naši rezultati pokazuju da osušen biljni materijal *A. alba* može da se koristi kao visoko kvalitetna sirovina za izolovanje eteričnih ulja, a oksidovani monoterpeni kao što su kamfor, 1,8-cineol i artemisia keton su tipične za ispitivanu biljnu vrstu. Pregledom literature (Chemical Abstract, baze podataka MEDLINE, Science Citation Index (SCI) i Beilstein Abstracts), ustanovili smo da su podaci o hemijskom sastavu i antimikrobnom dejstvu ekstrakta i etarskog ulja vrste *A. alba*, vrlo oskudni.

Poređenjem sa rezultatima dobijenim ispitivanjem etarskog ulja *A. alba* sa lokaliteta Kokin Brod, a koje iznose: kamfor (31,0%), 1,8-cineol (14,4%), artemisia keton (8,7%), artemisia alkohol (0,1%) i borneol (3,7%), može se zaključiti da su ulja generalno sličnog sastava kada su u pitanju glavne komponente. Etarsko ulje *A. alba* sa lokaliteta Kokin Brod sadrži značajan iznos tujona (10,5%), dok u našem ulju ovaj monoterpen nije identifikovan, što odgovara karakteristikama ove sekcije (Stangl i Greger, 1980). Dominantne komponente u etarskom ulju *A. alba* sa lokaliteta Gradište –

Sićevačka klisura u svim fazama vegetacije su kamfor (33,2-36,8%), 1,8-cineol (15,2-21,1%), artemisia keton (6,0-24,2%), artemisia alkohol (2,6-3,2%) i borneol (3,0-3,6%), što je generalno u skladu sa rezultatima istraživanja u okviru ovoga rada. Interesantno je napomenuti da je u ulju sa lokaliteta Gradište u fazi cveta, nađena značajna količina fenil-propanoidea-metil eugenola (3,6%), dok je u našem slučaju pomenuta komponenta nađena samo u ekstraktu i to u maloj količini (0,23%). Takođe je interesantan i visok sadržaj jomogi-alkohola (4,7-5,2 %) u ulju sa lokaliteta Gradište, dok je prisustvo pomenute komponente u našem ulju identifikovano u znatno manjoj količini, a u ispitivanom ekstraktu nije zabeleženo njeno prisustvo.

Rezultati GC-MS analize ekstrakta i etarskog ulja *N. nuda* prikazani su tabelom 9.

U ekstraktu herbe *N. nuda* registrovano je 47 komponenta, a identifikovano 25, što predstavlja 80,68% od ukupne mase. Kao i kod etarskog ulja, tako i kod ekstrakta herbe *N. nuda*, najzastupljenija komponenta je oksidovani monoterpen 1,8-cineol sa učešćem od 37,03%. Od seskviterpena najzastupljeniji je γ -murolen (5,51%) čiji je udeo u ekstraktu manji u odnosu na etarsko ulje.

Kada je u pitanju etarsko ulje herbe, broj registrovanih i identifikovanih komponenta je 24. Pregled udela terpena u ekstraktu i etarskom ulju prikazan je u tabeli 9, dok se primer GC-hromatograma ove biljne vrste može videti u prilogu na slikama 4a i 4b. Monoterpen 1,8-cineol je prisutan u velikom udelu kod etarskog ulja (64,64%), dok su druge komponente prisutne u umerenoj količini: β -pinen (2,93 %) i α -terpineol (1,97 %).

U poređenju sa ostalim ispitivanim etarskim uljima, etarsko ulje herbe *N. nuda*, odlikuje se najvišim procentom oksidovanog monoterpena 1,8-cineola. Takođe, u ovom ulju seskviterpeni su prisutni u zapaženoj količini, a pojedinačno najzastupljeniji su γ -murolen (7,37 %), kariofilen oksid (5,03%) i *trans*-kariofilen (3,19 %). Monoterpen 4 α ,7 α ,7 α -nepetalakton je zastupljen u ulju herbe (1,93%).

Tabela 9. Hemijski sastav ekstrakta i etarskog ulja *N. nuda*

Redni broj	Komponente	KIE Ekstrakt	KIE Etarsko ulje	KIL	Ekstrakt (%)	Etarsko ulje (%)
1	α -tujen ^m	932,2	-	924	0,73	-
2	α -pinen ^m	934,0	932,3	932	1,02	0,76
3	sabinen ^m	972,7	972,7	969	1,81	1,04
4	β -pinen ^m	975,0	975,1	974	1,37	2,93
5	mircen ^m	992,9	992,6	988	1,82	0,41
6	1,8-cineol ^m	1030,4	1032,2	1026	37,03	64,64
7	γ -terpinen ^m	1067,7	1059,0	1054	0,54	0,50
8	<i>cis</i> -sabinen hidrat ^m	-	1068,4	1065	-	0,13
9	<i>trans</i> -pinokarveol ^m	-	1139,5	1135	-	0,33
10	3,5-dihidroksi-6-metil-2,3-dihidro-4H-piran-4-on ^o	1150,6	-	1149	1,95	-
11	δ -terpineol ^m	-	1168,8	1162	-	1,48
12	terpinen-4-ol ^m	1169,6	1178,4	1174	2,11	0,47
13	α -terpineol ^m	1193,4	1192,6	1186	1,07	1,97
14	mirtenal ^m	-	1196,7	1195	-	0,62
15	2Z-heksenil isovalerat ^o	1238,8	-	1241	0,66	-
16	2E,4Z-dekadienal ^o	1284,8	-	1292	2,79	-
17	4a- α ,7 α ,7a- α nepetalakton ^m	-	1362,5	1357	-	1,93
18	α -kopaen ^s	1376,2	-	1374	0,35	-
19	β -burbonen ^s	1384,8	1384,9	1387	3,11	0,80
20	4a- α ,7- β ,7a- α nepetalakton ^m	1397,6	1396,5	1391	3,73	1,11
21	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1419,4	1419,6	1417	2,33	3,19
22	α -humulen ^s	1453,7	1454,0	1452	0,69	2,89
23	<i>trans</i> - β -farnesen ^s	1459,2	1458,6	1454	4,10	0,63
24	γ -murolen ^s	1481,7	1482,2	1478	5,51	7,37
25	biciklogermakren ^s	1491,4	1497,1	1500	2,71	0,19
26	δ -kadinen ^s	1525,1	-	1522	0,49	-
27	3a,7,7-trimetiltetrahidro-1H-ciklopropa[c]inden-2,3-dion* ^o	-	1554,1	n/a	-	0,56
28	kariofilen oksid ^s	1584,2	1582,8	1582	2,25	5,03
29	humulen epoksid II ^s	-	1608,9	1608	-	0,69
30	α -kadinol ^s	-	1656,0	1652	-	0,33
31	heksadekanska kiselina ^{FAD}	1970,6	-	1959	1,10	-
32	etil heksadekanoat ^{FAD}	1998,0	-	1992	0,39	-
33	fitol acetat ^d	2116,7	-	2218	1,01	-

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, d - diterpeni, FAD - masne kiseline i derivati masnih kiselina, o - ostalo; * - probna identifikacija n/a - nije dostupno

Prilikom ispitivanja različitih hemotipova vrste *N. nuda* (Basarabi, Frasinei i Herculane) sa područja Rumunije prikupljenih u različitim fenofazama, došlo se do podataka da je dominantna komponenta oksidovani monoterpen 1,8-cineol sa učešćem od 31,9% do 44,87% (Padure *et al.*, 2008), što je u skladu sa rezultatima istraživanja u

disertaciji. Sastav ekstrakta i etarskog ulja *N. nuda* u ovom radu sličan je po velikom udelu 1,8-cineola, koji je takođe registrovan kao glavna komponenta etarskog ulja *Nepeta flavida* Hub.-Mor. poreklom iz Turske (Tepe *et al.*, 2007) i *Nepeta cataria* sa područja Pakistana (Gilani *et al.*, 2009).

Komponente identifikovane u ekstraktu i etarskom ulju *Thymus serpyllum* prikazane su u tabeli 10.

Tabela 10. Hemijski sastav ekstrakta i etarskog ulja herbe *T. serpyllum*

Redni broj	Komponente	KIE ekstrakt	KIE etarsko ulje	KIL	Ekstrakt (%)	Etarsko ulje (%)
1	triciklen ^m	918,7	-	921	2,36	-
2	α -tujen ^m	919,4	926,4	924	6,02	0,30
3	α -pinen ^m	-	932,3	932	-	0,19
4	kamfen ^m	-	946,5	946	-	0,18
5	sabinen ^m	-	972,8	969	-	tr.
6	β -pinen ^m	-	975,2	974	-	0,78
7	1-okten-3-ol ^m	-	982,6	974	-	0,32
8	3-oktanon	-	988,8	979	-	0,74
9	mircen ^m	-	992,3	988	-	tr.
10	α -terpinen ^m	-	1016,5	1014	-	1,18
11	<i>p</i> -cimen ^m	-	1025,0	1020	-	16,88
12	limonen ^m	-	1028,4	1024	-	0,50
13	1,8-cineol ^m	-	1030,5	1026	-	2,18
14	<i>trans</i> - β -ocimen ^m	1037,8	1049,2	1044	2,17	0,75
15	γ -terpinen ^m	1046,7	1058,9	1054	0,51	9,88
16	<i>cis</i> -sabinen hidrat ^m	-	1067,8	1065	-	1,46
17	<i>o</i> -gvajakol ^o	1091,3	-	1087	0,29	-
18	linalol ^m	1095,5	1102,2	1095	1,73	0,94
19	kamfor ^m	1133,8	1144,0	1141	4,16	0,37
20	borneol ^m	1158,3	1166,8	1165	1,36	1,81
21	etil benzoat ^m	1165,0	-	1169	0,33	-
22	terpinen-4-ol ^m	-	1178,2	1174	-	0,90
23	α -terpineol ^m	1183,9	1192,8	1186	6,08	0,49
24	timol metil etar ^m	-	1236,5	1232	-	3,56
25	karvakrol metil etar ^m	-	1245,6	1241	-	0,89
26	<i>trans</i> -geraniol ^m	-	1259,3	1249	-	1,02
27	timol ^m	-	1300,5	1289	-	35,80
28	indol ^o	1300,2	-	1290	0,96	-
29	karvakrol ^m	-	1308,5	1298	-	2,12
30	<i>para</i> -vinil-gvajakol ^m	1312,2	-	1309	11,45	-
31	α -terpinil acetat ^m	-	1351,3	1346	-	0,85
32	β -burbonen ^s	1369,7	-	1387	0,69	-

33	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1403,3	1419,4	1417	2,87	1,97
34	α -humulen ^s	1437,6	1453,8	1452	1,16	0,29
35	γ -murolen ^s	-	1481,7	1478	-	3,22
36	germakren D ^s	1465,7	-	1484	4,17	-
37	β -bisabolen ^s	-	1509,8	1505	-	2,78
38	β -seskvifelandren ^s	1509,0	-	1521	2,42	-
39	δ -kadinen ^s	-	1524,4	1522	-	0,38
40	<i>trans</i> -nerolidol ^s	1552,0	1565,2	1561	4,47	5,23
41	germakren D-4-ol ^s	-	1576,0	1574	-	0,92
42	kariofilen oksid ^s	-	1582,6	1582	-	0,62
43	ζ -murolo ^s	1641,0	-	1640	1,49	-
44	α -kadinol ^s	-	1656,0	1652	-	0,50
45	germakra- 4(15),5,10(14)-trien- 1 α -ol ^s	1672,7	-	1685	0,70	-
46	longiborneol acetat ^s	1683,6	-	1684	0,45	-
47	etil tetradekanoat ^{FAD}	1779,8	-	1795	0,45	-
48	heksadekanol ^{FAD}	1866,1	-	1871	8,36	-
49	heksadekanska kiselina ^{FAD}	1955,7	-	1959	5,30	-
50	etil heksadekanoat ^{FAD}	1978,3	-	1992	8,13	-
51	fitol ^d	2096,3	-	2114	7,10	-
52	etil linoleat ^{FAD}	2143,9	-	2141	5,08	-
53	etil linolenat ^{FAD}	2156,1	-	2159	6,78	-
54	etil oktadekanoat ^{FAD}	2177,1	-	2196	0,56	-

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, d - diterpeni, FAD - masne kiseline i derivati masnih kiselina, o - ostalo; tr. - komponente u tragovima

Iz tabele se vidi da je od detektovanih 32, identifikovano 29 komponenata u ekstraktu herbe *T. serpyllum*, što predstavlja 97,58% od ukupnog broja registrovanih. Timol nije prisutan u ekstraktu pomenute herbe. Dominantna komponenta je monoterpen *para*-vinil-gvajakol (11,45%). Od seskviterpena najzastupljeniji su *trans*-nerolidol (4,47%), germakren D (4,17%) i *trans*-kariofilen (2,87%). Značajno je prisustvo masnih kiselina i njihovih derivata, a od diterpena zastupljen je fitol (7,10%).

Od registrovane 33 komponente etarskog ulja herbe (tabela 10), identifikovane su sve. Monoterpeni su dominantna klasa jedinjenja ispitivanog etarskog ulja sa glavnom komponentom timolom (35,80%). Timol, predstavnik fenolnih jedinjenja često pominjan u literaturi kao dominantna komponenta, glavna je komponenta etarskog ulja majkine dušice prikupljene sa područja Prokuplja. Karvakrol je takođe identifikovan u ovom etarskom ulju (2,12%). Generalno, pored timola, kao najzastupljenijeg, ostale manje zastupljene komponente su *p*-cimen (16,88%), γ -terpinen (9,88%), timol metil

etar (3,56%), *trans*-nerolidol (5,23%), β -bisabolen (2,78%), γ -murolen (3,22%) i *trans*-kariofilen (1,97%).

Visok sadržaj timola je bio i u rezultatima ispitivanja ulja majkine dušice poreklom sa Radan planine (Tonić, 2002). Prema Messerschmidt-u vrsta *Thymus* u svom etarskom ulju sadrži 30-71% timola (Kowal, Krupinska, 1979). Upoređujući sa rezultatima analiza etarskih ulja vrsta koje potiču iz drugih krajeva Evrope i Srbije ovim istraživanjima na primeru majkine dušice potvrđuje se činjenica, da je kvalitativni i kvantitativni sastav etarskih ulja uslovljen brojnim faktorima, od staništa biljke preko načina sušenja biljnog materijala do analitičke procedure (Stanisavljević *et al.*, 2012).

Primeri GC-hromatograma ekstrakta i etarskog ulja herbe *T. serpyllum* mogu se videti na slikama datim u prilogu disertacije (slika 5a, 5b).

Pregled udela terpena u ekstraktu i etarskim uljima divlje nane *M. longifolia* prikazan je tabelom 11 i 12, dok se primeri GC-hromatograma ekstrakata i etarskih ulja ove biljne vrste sušene različitim tehnikama mogu videti u prilogu na slikama 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g.

Sve identifikovane komponente ekstrakata divlje nane sušene na tri različita načina prikazane su u tabeli 11. U ekstraktu herbe sušene prirodnim putem registrovana je 51 komponenta, a identifikovane su 33 komponente koje učestvuju sa 92,93% od ukupno prisutnih komponenata. Monoterpeni su u ekstraktu, kao i u etarskom ulju, u sva tri slučaja zastupljenije komponente od seskviterpena. Sadržaj dominantne komponente piperitona je 53,87%, limonena 1,93%, 1,8-cineola 2,87%, nema mentona, karvona samo 2,96% (etarsko ulje 20,03%), karvakrol 3,29% (u etarskom ulju ga nije bilo), *trans*-kariofilen 4,65%, γ -murolen 3,44%.

U ekstraktu *M. longifolia* sušenoj u laboratorijskoj sušnici, registrovane su 42 komponente, a identifikovano je 28 komponenata koje učestvuju sa 90,51% od ukupno prisutnih komponenata. Dominantna komponenta u ekstraktu dobijenom od herbe sušene na ovaj način je menton (35,45%), čiji je sadržaj dvostruko veći u odnosu na etarsko ulje. Sadržaj piperitona je 18,53% što je znatno manje u odnosu na etarsko ulje (43,05%), 1,8-cineola 3,54%, limonena 0,20%, izomentona 9,45%, karvona 1,70%, karvakrola 2,32%, *trans*-kariofilena 2,39%, γ -murolena 1,99%.

Tabela 11. Hemijski sastav ekstrakata herbe *M. longifolia* sušene različitim postupcima

Redni broj	Komponente	KIE Suva	KIL	Biljni materijal		
				PS	LS	NTKS
1	α -tujen ^m	932,8	924	0,60	-	0,40
2	α -pinen ^m	n/a	932	0,85	0,92	0,78
3	sabinen ^m	973,1	969	-	-	0,40
4	β -pinen ^m	975,9	974	0,70	0,73	0,80
5	mircen ^m	994,2	988	1,03	1,57	0,52
6	3-oktanol	1004,6	988	1,54	0,90	0,89
7	limonen ^m	1029,3	1024	1,93	0,20	1,99
8	1,8-cineol ^m	1032,0	1026	2,87	3,54	4,55
9	<i>cis</i> - β -ocimen ^m	1040,9	1032	1,05	0,58	0,73
10	benzen acetaldehid (hiacintin) ^o	1051,4	1036	0,42	-	0,31
11	menton ^m	1154,4	1148	-	35,45	-
12	<i>iso</i> -menton ^m	1164,9	1158	0,71	9,45	-
13	α -terpineol ^m	1195,0	1186	0,39	-	0,38
14	<i>cis</i> -dihidrokarvon ^m	n/a	1191	0,71	0,61	1,26
15	<i>trans</i> -dihidrokarvon ^m	1200,0	1200	1,29	0,63	0,38
16	(3 <i>Z</i>)-heksenil 3-metil butanoat ^o	1239,4	1232	0,50	0,34	0,29
17	pulegon ^m	1242,6	1233	0,25	0,22	-
18	karvon ^m	1247,0	1239	2,96	1,70	4,11
19	piperiton ^m	1257,3	1249	53,87	18,53	61,12
20	<i>cis</i> -piperiton epoksid ^m	1258,2	1250	0,73	0,16	-
21	<i>trans</i> -piperiton epoksid ^m	1257,6	1252	0,45	-	0,20
22	karvakrol ^m	1302,8	1298	3,29	2,32	2,10
23	6-hidroksi-karvotanacetone ^m	1307,8	1309	0,98	-	0,52
24	<i>para</i> -vinil gvajakol ^m	1322,4	1309	0,26	0,19	0,19
25	9-dekanska kiselina * ^{FAD}	1359,2	1359	0,78	0,24	-
26	β -burbonen ^s	1385,7	1387	1,18	0,64	0,90
27	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1420,3	1417	4,65	2,39	5,63
28	α -humulen ^s	n/a	1452	0,73	0,57	-
29	<i>cis</i> -murolo-4(14),5-dien ^s	1459,0	1465	0,64	0,70	0,48
30	γ -murolen ^s	1482,5	1478	3,44	1,99	3,55
31	biciklogermakren ^s	1497,8	1500	0,52	-	0,62
32	n-heksadekanska kiselina ^{FAD}	1969,8	1951	0,35	0,64	-
33	etil heksadekanoat ^{FAD}	1999,0	1992	0,60	1,64	0,58
34	fitol ^d	2117,6	2114	1,72	1,35	1,97
35	(<i>Z,Z</i>)-9,12-oktadekadienska kiselina* ^{FAD}	2173,2	2132	0,92	2,31	0,78

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, d - diterpeni; FAD - masne kiseline i derivati masnih kiselina; * - probna identifikacija n/a - nije dostupno; PS - prirodno sušenje; LS - sušenje u laboratorijskoj sušnici; NTKS - sušenje u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari

U ekstraktu herbe sušene u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušnici identifikovano je 28 komponenata od registrovanih 37 komponenata koje čine 96,43% od 100% ukupnog sastava ekstrakta. Sadržaj dominantne komponente piperitona je 61,12%, 1,8-cineola 4,55%, limonena 1,99%, nema mentona i izomentona, karvona

4,11%, karvakrola 2,10%, *trans*-kariofilena 5,63%, γ -murolena 3,55%. Hromatografska analiza je pokazala da u ekstraktu vrste *M. longifolia* sušene u hladu i u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušnici, kao i u etarskom ulju dominira monoterpenski keton, piperiton, ali je njegova zastupljenost manja u odnosu na etarsko ulje, osim u slučaju mente sušene normalnim putem.

Način sušenja *M. longifolia* pokazuje veliki uticaj kako na prinos etarskog ulja dobijenog iz osušene herbe tako i na broj i udeo komponenti prisutnih u etarskom ulju. Herba sušena na vazduhu ima sastav ulja koji je po broju komponenti i sadržaju sličan sastavu sveže biljke dok se iz herbe osušene u sušnici i na suncu dobija ulje koje se i po broju komponenti i po sastavu znatno razlikuje (Asekuna *et al.*, 2007). Hemijska kompozicija ispitivanih etarskih ulja je takođe različita što se vidi iz priložene tabele 12. Iz tabele se uočava da su u etarskom ulju sveže herbe registrovane, a ujedno i identifikovane, 22 komponente.

U ulju dobijenom od herbe sušene prirodnim putem identifikovano je i registrovano 18 komponenata. Sadržaj dominantne komponente piperitona je 50,84%, limonena 6,27%, 1,8-cineola 3,94%, mentona samo 0,58%, nema izomentona, karvona 20,03%, *trans*-kariofilena 4,33%, γ -murolena 3,12%.

U etarskom ulju dobijenom od herbe koja je sušena u laboratorijskoj sušnici identifikovane su i registrovane 24 komponente. Sadržaj dominantne komponente piperitona je 43,05%, 1,8-cineola 3,56%, limonena 1,59%, mentona 17,53%, izomentona 8,31%, karvona 2,85%, *trans*-kariofilena 4,10%, γ -murolena 4,26%.

U etarskom ulju herbe sušene u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušnici identifikovano je 20 komponenata od registrovanih 21. Sadržaj dominantne komponente piperitona je 71,71%, 1,8-cineola 3,50%, limonena 2,36%, nema mentona i izomentona, karvona 4,97%, *trans*-kariofilena 5,40%, γ -murolena 3,59%. Hromatografska analiza je pokazala da u etarskom ulju dominira monoterpenski keton, piperiton, sa različitim procentom zastupljenosti, zbog čega ova vrsta pripada piperitonskom tipu (Stanisavljević *et al.*, 2010). Maksimalni sadržaj je kako vidimo zabeležen je kod *M. longifolia* sušene u NTKS (71,71%) dok je kod materijala sušenog na promajnom mestu i u laboratorijskoj sušnici sadržaj niži i iznosi (50,84% i 43,05%) respektivno.

Tabela 12. Hemijski sastav etarskih ulja sveže i suve herbe *M. longifolia* sušene različitim postupcima

Redni broj	Komponente	KIE Sveža	KIE Suva	KIL	Sveža (%)	Biljni materijal sušen		
						PS	LS	NTKS
1	α -pinen ^m	933,7	932,8	932	0,17	0,83	0,58	0,60
2	sabinen ^m	974,7	973,2	969	0,21	0,67	0,45	0,40
3	β -pinen ^m	976,2	975,6	974	0,36	1,32	0,88	0,84
4	mircen ^m	995,5	993,0	988	0,37	0,66	1,19	0,45
5	3-oktanol ^o	1006,6	1000,2	988	0,25	0,34	-	0,20
6	limonen ^m	1029,2	1029,0	1024	2,99	6,27	1,59	2,36
7	1,8-cineol ^m	1031,3	1030,9	1026	1,69	3,94	3,56	3,50
8	<i>cis</i> - β -ocimen ^m	1040,9	1039,6	1032	0,82	1,30	0,84	1,24
9	<i>trans</i> - β -ocimen ^m	-	1049,2	1044	-	-	-	0,37
10	linalol ^m	1102,7	1102,8	1095	13,63	-	0,36	-
11	menton ^m	-	1154,6	1148	-	0,58	17,53	-
12	isomenton ^m	-	1165,1	1158	-	-	8,31	-
13	ocimenol ^{*m}	1171,0	1169,4	n/a	0,32	-	-	0,32
14	mentol ^m	-	1175,3	1167	-	0,34	-	-
15	<i>cis</i> -isopulegon ^m	-	1177,1	n/a	-	-	0,72	-
16	α -terpineol ^m	1193,5	1193,4	1186	0,90	1,06	0,28	0,47
17	<i>cis</i> -dihidro karvon ^m	1197,2	1198,2	1191	4,33	3,47	0,55	0,34
18	<i>trans</i> -dihidro karvon ^m	1205,6	1205,4	1200	8,03	-	2,26	1,08
	izo-dihidrokarveol ^m	1218,6	-	1212	0,47	-	-	-
19	neoizo-dihidrokarveol ^m	1231,7	1231,8	1226	0,70	-	0,82	-
20	<i>cis</i> -3-heksenil isovalerat ^m	-	1238,8	1232	-	0,46	-	-
21	pulegon ^m	-	1240,7	1233	-	-	1,40	-
22	karvon ^m	1246,1	1247,1	1239	9,23	20,03	2,85	4,97
23	piperiton ^m	1257,3	1257,7	1249	40,81	50,84	43,05	71,71
24	dihidroedulan I ^o	-	1288,6	1289	-	-	0,27	-
25	piperitenon oksid ^m	-	1369,0	1366	-	-	2,72	-
26	β -burbonen ^s	1385,1	1385,1	1387	0,65	-	-	0,80
27	β -elemen ^s	-	1392,9	1389	-	-	0,34	-
28	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1419,6	1420,1	1417	6,49	4,33	4,10	5,40
29	α -humulen ^s	1454,1	1454,1	1452	0,31	-	-	0,25
30	γ -murolen ^s	1481,8	1482,3	1478	6,34	3,12	4,26	3,59
31	biciklogermakren ^s	1497,0	1497,6	1500	0,92	0,44	1,07	0,81

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, o - ostalo; * - probna identifikacija; n/a - nije dostupno; PS - prirodno sušenje; LS - sušenje u laboratorijskoj sušnici; NTKS - sušenje u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari

Promene u koncentracijama isparljivih jedinjenja za vreme sušenja zavise od nekoliko faktora, kao što su metode sušenja i klase biljaka. Nana pripada porodici Lamiaceae, za koje se zna da je skladištenje etarskog ulja na ili blizu površine lista (Moyler, 1994). Pulegon je dokazano moćan hepatotoksin, čak i pri niskim koncentracijama. Metaboliše se u jetri u menthofuran, veoma reaktivan metabolit, koji deluje nepovoljno na jetru (Chen *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 1987). Pulegona u našim

ispitivanjima ima samo u ulju koje je izolovano iz herbe divlje nane sušene u laboratorijskoj sušnici. U etarskom ulju biljne vrste *M. longifolia* ubranoj na lokalitetu Grza kod Paraćina najzastupljenija komponenta je bila piperiton (71,11%), zatim (*Z*)-kariofilen (6,08%), timol (3,5%), kariofilen-oksidi (2,71%), 1,8-cineol (1,8%), limonen (1,65%), (*E*)-dihidro-karvon (1,51%), dok je količina ostalih identifikovanih komponentata bila ispod 1%, što je donekle u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja u ovoj disertaciji (Mitrović *et al.*, 2002). U ranijim istraživanjima (Džamić *et al.*, 2010), utvrđeno je da su u slučaju etarskog ulja biljne vrste *M. longifolia* poreklom sa lokaliteta Gradina, Zlatar dominantne komponente: *trans*-dihidrokarvon (23,64%), piperiton (17,33%) i *cis*-dihidrokarvon (15,68%). Iz priloženog vidimo da je hemijski sastav različit po procentualnom udelu glavnih komponentata od onih dobijenih u ovom radu.

Rezultati analize ekstrakta i etarskog ulja herbe *H. officinalis* su dati tabelom 13.

Analizom ekstrakata od registrovane 52 komponente, identifikovano je 40, što predstavlja 88,63% od detektovanih komponentata. Monoterpeni su dominantna klasa jedinjenja ispitivanog ekstrakta sa glavnom komponentom *cis*-pinokamfonom (36,09%). Ekstrakt ispitivane vrste se odlikuje niskim sadržajem ugljovodoničnih monoterpena. Hemijski sastav ispitivanog ekstrakta se u mnogome razlikuje od hemijske kompozicije etarskog ulja. Smanjen je sadržaj β -pinena i 1,8-cineola. β -pinen je zastupljen samo 0,52%, a 1,8-cineol 2,07%. Sadržaj terpinen-4-ola je 9,74% što je znatno više u odnosu na etarsko ulje.

U etarskom ulju vrste *H. officinalis* L. se sreću komponente koje nisu identifikovane u ekstraktu (kamfen, α -terpinen, *trans*- β -ocimen, γ -terpinen, kamfor, *trans*-pinokamfon, i dr.), dok su neke karakteristične samo za ekstrakte (β -felandren, mirtenol, *trans*-2-hidroksi-pinokamfon, linalil acetat, perila alkohol, *p*-vinilgvajakol, δ -kadinen, fitol i dr.). Hemijskom analizom etarskog ulja suve herbe *H. officinalis* L. kao što vidimo iz tabele 13 registrovane su i identifikovane 32 komponente.

Tabela 13. Hemijski sastav ekstrakta i etarskog ulja herbe *H. officinalis*

Redni broj	Komponente	KIE ekstrakt	KIE etarsko ulje	KIL	Ekstrakt (%)	Etarsko ulje (%)
1	α -tujen ^m	931,7	926,9	924	0,29	0,12
2	α -pinen ^m	931,8	932,7	932	0,67	1,13
3	kamfen ^m	-	947,1	954	-	0,17
4	sabinen ^m	972,5	973,5	969	0,30	2,05
5	β -pinen ^m	974,7	975,9	974	0,52	12,37
6	mircen ^m	992,7	993,0	988	1,64	1,22
7	α -terpinen ^m	-	1017,3	1014	-	0,19
8	<i>p</i> -cimen ^m	1024,9	1026,3	1020	0,17	0,11
9	β -felandren ^m	1028,4	-	1025	1,75	-
10	1,8-cineol ^m	1030,9	1032,5	1026	2,07	39,24
11	<i>cis</i> - β -ocimen ^m	1039,5	1040,0	1032	0,58	4,28
12	<i>trans</i> - β -ocimen ^m	-	1049,9	1044	-	0,75
13	γ -terpinen ^m	-	1059,4	1054	-	0,35
14	<i>cis</i> -sabinen hidrat ^m	1069,4	-	1065	0,41	-
15	terpinolen ^m	-	1088,9	1086	-	0,25
16	linalol ^m	1103,7	1103,2	1095	0,30	0,27
17	<i>cis</i> -tujon ^m	-	1106,6	1102	-	0,12
18	<i>trans</i> -pinokarveol ^m	1139,5	1140,1	1135	0,31	0,69
19	kamfor ^m	-	1161,1	1146	-	2,36
20	<i>trans</i> -pinokamfon ^m	-	1161,1	1158	-	0,50
21	pinokarvon ^m	-	1163,4	1160	-	0,63
22	δ -terpineol ^m	-	1171,0	1166	-	0,23
23	<i>cis</i> -pinokamfon ^m	1174,2	1176,0	1172	36,09	26,88
24	terpinen-4-ol ^m	1179,1	1178,9	1174	9,74	0,55
25	α -terpineol ^m	1193,9	-	1186	0,60	-
26	mirtenol ^m	1197,3	-	1194	0,48	-
27	mirtenal ^m	1199,3	1197,0	1195	0,52	1,22
28	<i>cis</i> -karveol ^m	n/a	-	1229	0,25	-
29	<i>trans</i> -2-hidroksi-pinokamfon ^m	1251,0	-	1247	1,88	-
30	linalil acetat ^m	n/a	-	1257	14,19	-
31	perila alkohol ^m	1302,9	-	1294	0,15	-
32	(<i>Z</i>)-metil cinamat ^o	-	1299,0	1300	-	0,13
33	<i>p</i> -vinilgvajakol ^m	1318,2	-	1309	1,53	-
34	mirtetil acetat ^m	1340,8	1327,6	1324	0,40	0,13
35	α -terpinil acetat ^m	n/a	-	1346	0,19	-
36	β -burbonen ^s	1384,9	1385,4	1387	0,20	0,46
37	<i>trans</i> -kariofilen ^s	1419,4	1419,9	1417	0,18	0,72
38	α -humulen ^s	1454,5	1454,5	1452	0,62	0,12
39	γ -murolen ^s	1481,6	1482,3	1478	0,32	1,18
40	biciklogermakren ^s	1496,9	1497,6	1500	0,22	0,85
41	δ -kadinen ^s	1522,2	-	1522	2,35	-
42	spatulenol ^s	1579,9	1578,7	1577	1,01	0,32
43	kariofilen oksid ^s	1568,5	1583,2	1582	0,84	0,43
44	α -kadinol ^s	n/a	-	1654	0,21	-
45	α -bisabolol ^s	n/a	-	1685	0,86	-
46	heksadekanska kiselina ^{FAD}	1969,2	-	1959	0,75	-
47	etil heksadekanoat ^{FAD}	1998,0	-	1992	1,55	-
48	fitol ^d	2116,9	-	2114	1,13	-

49	(Z,Z)-9,12-oktadeka dienska kiselina ^{FAD}	2165,7	-	2132	0,98	-
50	(Z)-9-Oktadecenska kiselina * ^{FAD}	2172,7	-	2140	2,19	-
51	etil oktadekanoat ^{FAD}	n/a	-	2196	0,21	-

m - monoterpeni, s - seskviterpeni, d - diterpeni, FAD - masne kiseline i derivati masnih kiselina; * - probna identifikacija;
n/a - nije dostupno

Etarsko ulje suve herbe vrste *H. officinalis* L. odlikuje se visokim sadržajem monoterpena od kojih su najzastupljeniji *cis*-pinokamfon (26,88%), 1,8-cineol (39,24%), β -pinen (12,37%), *cis*- β -ocimen (4,28%), kamfor (2,36%). Udeo prisutnih seskviterpena je daleko manji u odnosu na monoterpene. Uopšteno, na osnovu detaljne GC-MS analize etarskih ulja porodice Lamiaceae kojoj pripada i vrsta roda *Hyssopus* sakupljenih na teritoriji jugoistočne Srbije, može da se zaključi da se ispitivana etarska ulja odlikuju visokim sadržajem monoterpena, a što je u skladu sa podacima nađenim u literaturi. Po sadržaju glavnih komponenti spada u grupu ulja bogatih *cis*-pinokamfonom i 1,8-cineolom.

Rezultati drugih istraživača kada je u pitanju etarsko ulje izopa, kao i rezultati dobijeni u okviru ovog ispitivanja, ukazuju na razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu terpenoidnih jedinjenja, što je najverovatnije posledica značajnog uticaja različitih ekoloških faktora na produkciju ovih sekundarnih metabolita. Ispitivanjem biljnog materijala *H. officinalis* L. sa oglednih parcela fabrike „Zdravlje“ Leskovac jula 1999. godine utvrđeno je da su dve najzastupljenije komponente izopinokamfon (44,7%) i pinokamfon (14,1%) i ispitivano ulje kao i u našem slučaju karakterisao je visok udeo monoterpena i nizak udeo seskviterpena (Mitić, 2001). U etarskom ulju izopa gajenog u Španiji (Fathiazad i Hamedeyazdan, 2011) identifikovan je veliki sadržaj 1,8-cineola (52,89%), koji je i u slučaju našeg ulja najdominantnija komponenta.

Primeri GC-hromatograma ekstrakta i etarskog ulja herbe *H. officinalis* mogu se videti na slikama datim u prilogu disertacije (slike 7a, 7b).

Ovi rezultati ukazuju da se ekstrakti i etarska ulja ispitivanih vrsta mogu smatrati izvorom dominantno prisutnih mono- i seskviterpena. Kada se dobijeni rezultati uporede sa literaturnim, uočavaju se velike razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu analiziranih ekstrakata i etarskih ulja, a one su najverovatnije nastale kao posledica uticaja različitih ekoloških faktora, u kojima su ispitivane vrste rasle

(Stanisavljević *et al.*, 2012). Pored geografskog porekla, na sastav terpenoidnih jedinjenja utiču i sastav zemljišta, broj sunčanih sati tokom godine, biljne vrste koje rastu u neposrednoj blizini, kao i sama tehnika izolovanja ekstrakata i etarskih ulja. Osim navedenog, doba godine, odnosno faza vegetacije u kojoj je biljni materijal sakupljen, ima veliki značaj za sastav etarskih ulja. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na to da etarsko ulje iste biljne vrste, izolovano istom metodom, ali iz materijala sakupljenog u različitim vegetativnim fazama, može da se razlikuje u prisutnosti dominantne komponente α -pinena i do 5 puta (Shanjani *et al.*, 2010). Sastav etarskih ulja zbog velike varijabilnosti sadržaja istih komponenti u istoj biljnoj vrsti, ne može se koristiti kao pouzdani hemotaksonomski marker. Međutim, sastav ekstrakata i etarskih ulja je značajan u kontekstu njihove primene u medicinske svrhe, zatim u industriji gde se ekstrakti i etarska ulja koriste kao sirovina, ali i u kulinarstvu zbog toga što kvalitet proizvoda u mnogome zavisi od hemijskog sastava ekstrakata i etarskih ulja.

Iako o sastavu većine etarskih ulja, mada ne i ekstrakata izabranih lekovitih i aromatičnih biljaka, postoje podaci u literaturi, dobijeni rezultati su značajni u smislu evaluacije kvaliteta izolata ispitivanih vrsta sa **područja južne i jugoistočne Srbije**. Međutim, za potpuniju determinaciju sastava ekstrakata i etarskih ulja sa područja južne i jugoistočne Srbije, neophodno je nastaviti njihovu detaljnu hemijsku karakterizaciju, i ispitati kako se menja sastav ovih izolata dobijen iz analiziranih herbi sa različitih lokaliteta, sakupljenih u različitom vegetacionom periodu, sa ciljem da se tačno utvrde uticaji različitih ekoloških faktora na terpenoidni profil. Ovo je naročito bitno za **standardnu** proizvodnju sokova i pića, npr. vermuta kod koga je bitno da hemijski sastav biljaka koje se koriste u procesu proizvodnje bude ujednačen tokom niza godina, što zavisi od klime, načina gajenja, branja, pripremanja i čuvanja (Jović, Cvetković, 2000). Kod ovog pića uobičajeno je korišćenje biljaka iz istog podneblja, pri čemu se naročito vodi računa o postupcima kojima se izdvajaju i koncentrišu aromatični sastojci. U celim biljkama ili delovima biljaka nalaze se materije koje su nosioci mirisa i ukusa vermuta.

3.3.5. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima

Sastojci lekovitog bilja, koji pokazuju antioksidantnu sposobnost, su različite bioaktivne komponente. Među njima, veoma važna jedinjenja su polifenoli (fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, tanini i dr.).

Rezultati određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida dati su u tabeli 14.

Tabela 14. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima^{a,b}

Biljna vrsta	Ukupni fenoli, mg galne kiseline/ g suvog ekstrakta	Ukupni flavonoidi, mg rutina/ g suvog ekstrakta
<i>Satureja kitaibelii</i>	90,0±10,56 a	63,3±0,58 a
<i>Origanum vulgare</i>	129,2±12,71 b	110,7±2,47 b
<i>Artemisia alba</i>	77,18±2,76 a,c	53,8±0,75 c
<i>Nepeta nuda</i>	40,9±1,21 d	20,0±0,6 d
<i>Thymus serpyllum</i>	65,6±1,99 c	63,4±0,65 a
<i>Hyssopus officinalis</i>	63,3±6,79 c	46,6±0,42 e

^a Vrednosti prikazane u tabeli date su u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

^b Različitim slovima u koloni su obeležene vrednosti koje se značajno razlikuju (p<0,05, Scheffé test)

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da je najveći sadržaj fenola i flavonoida prisutan u ekstraktu biljne vrste *O. vulgare* (129,2±12,71 mg galne kis/g suvog ekstrakta, odnosno 110,7±2,47 mg rutina/g suvog ekstrakta), dok je najniži sadržaj ovih jedinjenja detektovan u ekstraktu biljne vrste *N. nuda* (40,9 mg galne kis/g suvog ekstrakta, odnosno 20,0±0,6 mg rutina/g suvog ekstrakta). Između ekstrakata biljnih vrsta *A. alba*, *T. serpyllum* i *H. officinalis* nema statistički značajne razlike u sadržaju fenola na nivou poverenja od 95% što je dokazano Šefe-ovim testom (Scheffé test). Korišćenjem istog statističkog testa utvrđena je statistički visoko značajna razlika u sadržaju flavonoida kod većine ispitivanih vrsta, osim kod *S. kitaibelii* i *T. serpyllum*.

Visok sadržaj fenolnih jedinjenja (149 mg galne kiseline/g ekstrakta) u ekstraktima vrsta roda *Origanum* je identifikovan i u ranijim ispitivanjima vrste *O. vulgare* (Dorman *et al.*, 2003) što je u skladu sa rezultatima ovoga rada.

Dobijene vrednosti predstavljaju samo aproksimaciju sadržaja flavonoida, a za dobijanje egzaktnih rezultata potrebno je izvršiti hromatografsko razdvajanje i kvantifikaciju pojedinačnih jedinjenja korišćenjem referentnih standarda.

3.3.6. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima

Hemijski sastav ekstrakata, utvrđen primenom HPLC metode, prikazan je u tabelama 15 i 16, a hromatogrami su dati na slikama 8–13 u prilogu rada.

Broj registrovanih komponenata u ekstraktu *S. kitaibelii* je 10, a identifikovano je 8 komponenata koje učestvuju sa 49,11% od ukupno prisutnih komponenata. U ispitivanom ekstraktu herbe *S. kitaibelii* najzastupljenija fenolna jedinjenja su flavonoidni *O*-glikozidi: kemferol 3-*O* glukozid, kemferol 3-*O*-(6''-*O*-malonilglukozid)-7-*O*-ramnozid, luteolin 5-*O*-glukozid. Flavonoidi identifikovani u ispitivanoj herbi su identifikovani u drugim vrstama porodice Lamiaceae (Marin, 1995).

Registrovano je 15 komponenata u ekstraktu *O. vulgare*, a identifikovano je 13, koje učestvuju sa 98,83% od ukupno prisutnih komponenata. Većina identifikovanih flavonoida su derivati kemferola, luteolina, apigenina, među kojima su dominante: kemferol 3-*O*-(6''-*O*-acetilglukozid)-7-*O*-ramnozid, luteolin 5-*O*-glukozid, kemferol 3-*O*-(6''-*O*-malonilglukozid)-7-*O*-ramnozid. Skoula i saradnici su ispitivali HPLC metodom sastav različitih vrsta roda *Origanum*, pri čemu su došli do zaključka da vrsta *O. vulgare* sadrži više flavanona od flavona (Skoula *et al.*, 2008).

Broj registrovanih komponenata u ekstraktu *A. alba* je 23, od kojih je identifikovano 13, ili 72,93%.

Tabela 15. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima: A - *S. kitaibelii*, B - *O. vulgare*, C - *A. alba*

Broj pika	Komponenta	A	B	C
		Udeo (%)		
1	Galna kiselina	-	-	0,32
2	Hlorogena kiselina	-	-	11,37
3	Kemferol 3-O-7-O-di glukozid	-	-	8,42
4	Kemferol 3-O-glukozid-7-O-ramnozid	-	1,39	-
5	Kemferol 3-O-soforozid	-	0,31	-
6	Luteolin 5-O-glukozid	2,74	28,70	1,23
7	Kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-ramnozid	6,21	10,14	16,06
8	Rutin	-	-	9,48
9	Apigenin 5-O-glukozid	-	1,77	-
10	Apigenin 4'-O-glukozid	-	0,50	-
11	Luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid)	-	1,75	7,65
12	Kemferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid	1,14	42,73	-
13	Kemferol 3-O-glukozid	34,30	-	-
14	Genkvanin 5-O-glukozid	-	2,44	2,06
15	Kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)	0,71	7,60	3,62
16	Kemferol 3-O-ramnozid	2,46	-	3,72
17	Kvercetin	-	0,20	-
18	Genkvanin 5-O-(6''-O-malonilglukozid)	-	0,63	-
19	Luteolin	-	-	3,35
20	Kemferol 7-O-ramnozid	0,59	-	1,87
21	Genkvanin 4'-O-glukozid	-	0,67	-
22	Apigenin	0,96	-	3,78

Kemferol derivati su u većem broju i količini prisutni u odnosu na luteolin derivate kod ispitivane herbe *A. alba*, a uočen je i veliki udeo hlorogene kiseline. Dominantna fenolna komponenta je kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-ramnozid. Kemferol je bio glavni flavonol kod šest ispitivanih *Artemisia* vrsta (Carvalho *et al.*, 2011).

U ekstraktu *N. nuda* identifikovano je 10 od 15 registrovanih komponenata, koje čine 87,45% (tabela 16). U etanolnom ekstraktu utvrđeno je i kvantifikovano prisustvo komponenata datih u tabeli, pri čemu su dominantne komponente bile kemferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid, hlorogena kiselina, luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid), luteolin, što je slično rezultatima HPLC analize endemične vrste u Grčkoj *N. sibthorpii* gde je dokazano prisustvo hlorogene kiseline i derivata luteolina (Miceli *et al.*, 2005). Flavon apigenin je detektovan kod osam ispitivanih vrsta roda *Nepeta* u Iranu (Jamzad *et al.*, 2003).

Tabela 16. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima: D - *N. nuda*, E - *T. serpyllum*, F - *H. officinalis*

Broj pika	Komponenta	D	E	F
		Udeo (%)		
1	Galna kiselina	1,00	-	0,32
2	Hlorogena kiselina	17,67	-	59,02
3	Kvercetin 3,7-O-diglukozid	-	-	1,93
4	Hidroksicimetna kiselina	-	-	3,27
5	Kemferol 3-O-7-O-di glukozid	-	-	9,91
6	Metil estar kafeinske kiseline	-	1,80	-
7	Kemferol 3-O glukozid-7-O-ramnozid	-	0,79	-
8	Kemferol 3-O-soforozid	0,68	-	-
9	Luteolin 5-O-glukozid	4,04	14,73	-
10	Kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-ramnozid	5,69	26,25	-
11	Apigenin 4'-O-glukozid	-	1,75	-
12	Luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid)	12,95	35,46	-
13	Kemferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid	32,49	-	1,57
14	Kemferol 3-O glukozid	-	11,99	-
15	Genkvanin 5-O-glukozid	-	0,48	-
16	Luteolin	5,99	2,11	-
17	Kaempferol 7-O-rhamnoside	-	2,11	-
18	Genkvanin 4'-O-glukozid	1,24	-	-
19	Apigenin	5,70	2,29	-

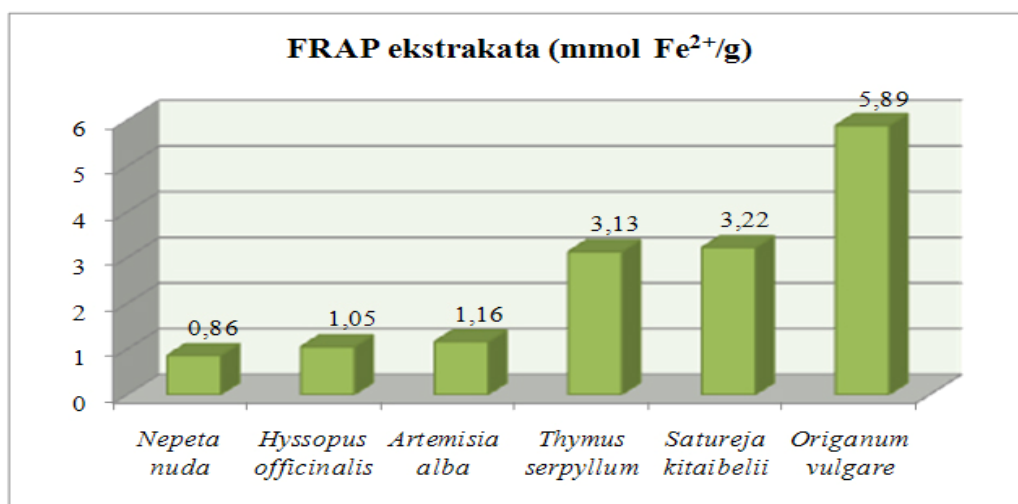
U ekstraktu vrste *T. serpyllum* identifikovano je 11 komponenata koje čine 99,76% ukupnog sastava ekstrakta. Dominantne komponente bile su luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid), kemferol 3-O glukozid-7-O-ramnozid, luteolin 5-O-glukozid, kemferol 3-O glukozid, apigenin, luteolin i u manjoj količini genkvanin 5-O-glukozid. U poređenju sa ostalim kvantifikovanim jedinjenjima, svojim sadržajem se isticao luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid). Luteolin, apigenin, genkvanin su bila izolovana i karakteristična fenolna jedinjenja iz ekstrakata nadzemnih delova *T. herba barona* (Corticchiato *et al.*, 1995).

Broj registrovanih komponenata u ekstraktu *H. officinalis* je 9 dok je broj identifikovanih 6, što predstavlja 76,02%. Najzastupljenija komponenta je hlorogena kiselina, što je u skladu sa ranijim istraživanjima kojih je inače samo nekoliko u vezi pomenute herbe (Zgorka, Glowniak, 2001; Gönül *et al.*, 2013).

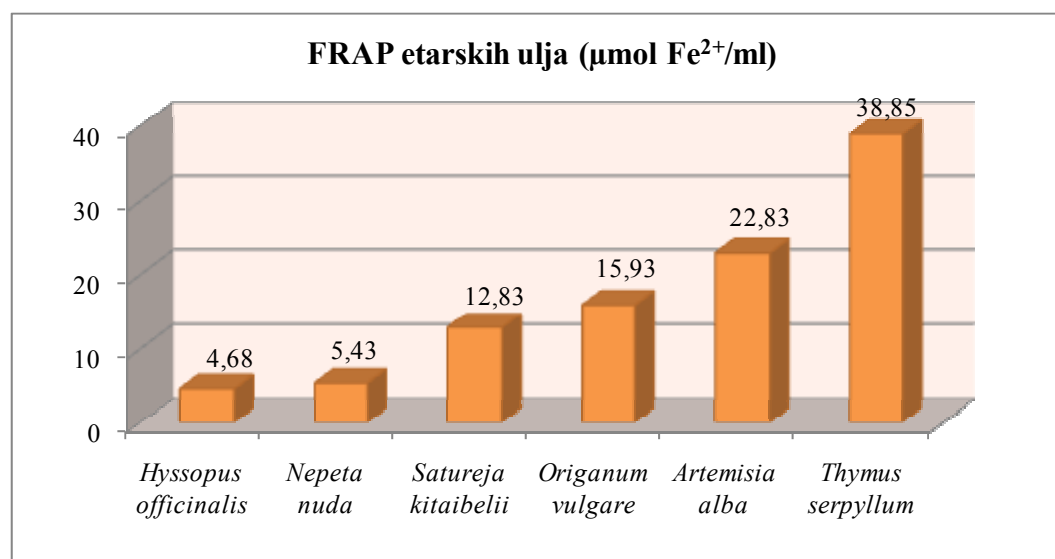
3.3.7. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja

FRAP metoda

Rezultati dobijeni ispitivanjem antioksidantne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja FRAP testom prikazani su na slici 25 i 26. Najveću FRAP vrednost i visoku antioksidantnu aktivnost pokazao je ekstrakt biljne vrste *O. vulgare* ($5,89 \pm 0,12$ mmol Fe^{2+}/g), dok je najmanju FRAP vrednost tj. najmanju antioksidantnu aktivnost pokazao ekstrakt biljne vrste *N. nuda* ($0,86 \pm 0,07$ mmol Fe^{2+}/g) (slika 25).



Slika 25. Vrednosti FRAP ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta (mmol Fe^{2+}/g)



Slika 26. FRAP vrednosti etarskih ulja ispitivanih biljnih vrsta ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{ml}$)

Ispitivanjem antioksidantnih aktivnosti etarskih ulja biljnih vrsta FRAP metodom dobijene su različite vrednosti. Kako se može videti sa slike 26 ukupan antioksidantni potencijal se povećavao u nizu sledećim redosledom: *H. officinalis* L. < *N. nuda* L. < *S. kitaibelii* < *O. vulgare* L. < *A. alba* < *T. serpyllum* L.

Neutralizacija DPPH radikala

U tabelama 17 a,b - 22 a,b je dat inhibitorni efekat ekstrakata i etarskih ulja ispitivanih biljnih vrsta na DPPH radikal, izražen kao neutralizacija DPPH (%) i kao EC₅₀ vrednost (µg/ml) za ekstrakte i kao EC₅₀ (µl/ml) za etarska ulja.

Neutralizacija DPPH radikala i antioksidantna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja herbe *S. kitaibelii* na DPPH radikal data je tabelama 17 a,b.

Tabela 17. a: Inhibitorni efekat ekstrakta **b:** etarskog ulja *S. kitaibelii* na DPPH radikal

Ekstrakt (µg/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ± SD
10	23,14±1,248
50	82,55±1,759
100	85,40±2,912
500	89,08±1,759
1000	91,84±0,196
EC₅₀ (µg/ml) ± SD	18,85±0,310

a)

Etarsko ulje (µl/ml)	Neutralizacija DPPH (%)± SD
0,5	1,42±0,674
1	3,79±0,168
2,5	5,74±0,585
5	17,45±1,219
10	28,20±2,218
25	55,79±1,814
EC₅₀ (µl/ml) ± SD	20,78 ± 1,296

b)

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala kod herbe *S. kitaibelii* maksimalno dostiže 91,84% za ekstrakt i 55,79% za etarsko ulje, a procenat neutralisanja DPPH radikala iskazan sa vrednošću EC₅₀ ekstrakta (EC₅₀=18,85±0,310 µg/ml), a kod etarskog ulja (EC₅₀=20,78±1,296 µl/ml), respektivno.

Inhibitorni efekat i antioksidantna aktivnost izolata herbe *O. vulgare* na DPPH radikal data je tabelama 18 a,b.

Tabela 18. a: Inhibitorni efekat ekstrakta b: etarskog ulja *O. vulgare* na DPPH radikal

Ekstrakt ($\mu\text{g/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
10	61,36 \pm 0,784
50	80,66 \pm 2,704
100	81,98 \pm 1,473
500	83,53 \pm 1,313
1000	90,56 \pm 0,06
EC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	4,77 \pm 0,492

a)

Etarsko ulje ($\mu\text{l/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
0,5	4,18 \pm 0,831
1	4,73 \pm 0,318
2,5	12,75 \pm 1,855
5	22,48 \pm 0,607
10	33,02 \pm 1,281
25	56,80 \pm 4,425
EC₅₀ ($\mu\text{l/ml}$) \pm SD	20,11\pm2,522

b)

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala kod herbe *O. vulgare* maksimalno dostiže 90,56% za ekstrakt i 56,80% za etarsko ulje, a procenat neutralisanja DPPH radikala iskazan sa vrednošću EC₅₀ kod ekstrakta iznosi (EC₅₀=4,77 \pm 0,492 $\mu\text{g/ml}$), a kod etarskog ulja (EC₅₀=20,11 \pm 2,522 $\mu\text{l/ml}$), respektivno.

Inhibitorni efekat i antioksidantna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja herbe *A. alba* na DPPH radikal data je tabelama 19 a,b.

Tabela 19. a: Inhibitorni efekat ekstrakta b: etarskog ulja *A. alba* na DPPH radikal

Ekstrakt ($\mu\text{g/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
10	17,73 \pm 2,201
50	62,53 \pm 3,595
100	81,49 \pm 1,475
500	90,86 \pm 1,248
1000	92,90 \pm 0,131
EC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	31,85 \pm 2,278

a)

Etarsko ulje ($\mu\text{l/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
0,5	2,88 \pm 0,192
1	3,77 \pm 0,836
2,5	12,93 \pm 1,885
5	27,57 \pm 2,173
10	39,69 \pm 1,852
25	63,56 \pm 1,733
EC₅₀ ($\mu\text{l/ml}$) \pm SD	14,08\pm1,091

b)

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala kod herbe *A. alba* maksimalno dostiže 92,90% za ekstrakt i 63,56% za etarsko ulje, a procenat neutralisanja DPPH radikala iskazan sa vrednošću EC₅₀ kod ekstrakta iznosi (EC₅₀=31,85 \pm 2,278 $\mu\text{g/ml}$), a kod etarskog ulja (EC₅₀=14,08 \pm 1,091 $\mu\text{l/ml}$), respektivno.

Inhibitorni efekat i antioksidantna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja herbe *N. nuda* na DPPH radikal data je tabelama 20 a,b.

Tabela 20. a: Inhibitorni efekat ekstrakta b: etarskog ulja *N. nuda* na DPPH radikal

Ekstrakt ($\mu\text{g/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD	Etarsko ulje ($\mu\text{l/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
10	7,34 \pm 0,614	0,5	2,11 \pm 0,459
50	26,68 \pm 2,085	1	4,36 \pm 0,337
100	57,86 \pm 2,439	2,5	8,02 \pm 1,271
500	92,13 \pm 0,607	5	11,86 \pm 1,993
1000	93,93 \pm 0,191	10	22,76 \pm 1,829
EC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	86,24\pm1,850	25	40,02 \pm 4,660
		EC₅₀ ($\mu\text{l/ml}$) \pm SD	36,64\pm1,670

a)

b)

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala kod herbe *N. nuda* maksimalno dostiže 93,93% za ekstrakt i 40,02% za etarsko ulje, a procenat neutralisanja DPPH radikala iskazan sa vrednošću EC₅₀ kod ekstrakta iznosi (EC₅₀=86,24 \pm 1,850 $\mu\text{g/ml}$), a kod etarskog ulja (EC₅₀=36,64 \pm 1,670 $\mu\text{l/ml}$), respektivno. Inhibitorni efekat etarskog ulja na DPPH radikal ispitivane vrste je umeren i maksimum je postignut pri koncentraciji od 25 $\mu\text{l/ml}$ (40,02%) (tabela 20 b). Do sličnih rezultata došao je Mothana ispitujući vrstu *Nepeta deflersiana*, gde je utvrđen maksimalni stepen inhibicije od 37,9% (Monthana, 2012).

Inhibitorni efekat i antioksidantna aktivnost izolata herbe *T. serpyllum* na DPPH radikal data je tabelama 21 a,b.

Tabela 21. a: Inhibitorni efekat ekstrakta b: etarskog ulja *T. serpyllum* na DPPH radikal

Ekstrakt ($\mu\text{g/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD	Etarsko ulje ($\mu\text{l/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
10	15,74 \pm 1,335	0,5	45,97 \pm 1,355
50	53,68 \pm 0,113	1	50,37 \pm 1,947
100	72,63 \pm 0,398	2,5	68,11 \pm 6,106
500	83,84 \pm 4,198	5	87,21 \pm 0,356
1000	88,52 \pm 1,538	10	91,54 \pm 0,339
EC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	41,59\pm0,738	25	92,72 \pm 0,779
		EC₅₀ ($\mu\text{l/ml}$) \pm SD	0,77\pm0,051

a)

b)

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala kod herbe *T. serpyllum* maksimalno dostiže 88,52% za ekstrakt i 92,72% za etarsko ulje, a procenat neutralisanja DPPH radikala iskazan sa vrednošću EC_{50} kod ekstrakta iznosi ($EC_{50}=41,59\pm 0,738 \mu\text{g/ml}$), a kod etarskog ulja ($EC_{50}=0,77\pm 0,051 \mu\text{l/ml}$), respektivno.

Inhibitorni efekat i antioksidantna aktivnost izolata herbe *H. officinalis* na DPPH radikal data je tabelama 22 a, b. Kapacitet neutralisanja DPPH radikala kod herbe *H. officinalis* maksimalno dostiže 90,94% za ekstrakt i 37,77% za etarsko ulje, a procenat neutralisanja DPPH radikala iskazan sa vrednošću EC_{50} kod ekstrakta iznosi ($EC_{50}=58,47\pm 3,911 \mu\text{g/ml}$), a kod etarskog ulja ($EC_{50}=47,50\pm 1,624 \mu\text{l/ml}$), respektivno. Inhibitorni efekat etarskog ulja na DPPH radikal ispitivane vrste je umeren i maksimum je postignut pri koncentraciji od 25 $\mu\text{l/ml}$ (37,77%) (tabela 22 b).

Tabela 22. a: Inhibitorni efekat ekstrakta b: etarskog ulja *H. officinalis* na DPPH radikal

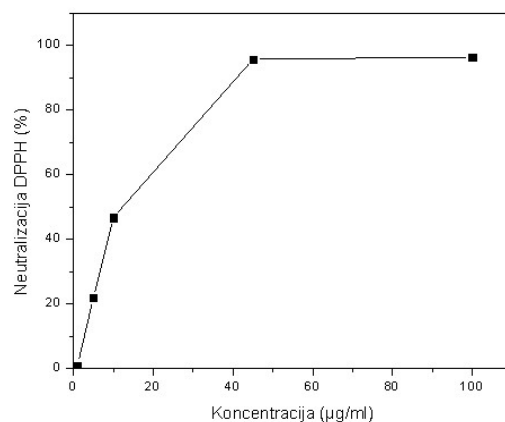
Ekstrakt ($\mu\text{g/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
10	11,60 \pm 1,431
50	39,50 \pm 3,289
100	73,08 \pm 2,081
500	91,28 \pm 0,661
1000	90,94 \pm 0,363
EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	58,47\pm3,911

a)

Etarsko ulje ($\mu\text{l/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) \pm SD
0,5	0,61 \pm 0,044
1	1,44 \pm 0,230
2,5	5,60 \pm 1,216
5	8,22 \pm 1,633
10	19,81 \pm 2,029
25	37,77 \pm 1,906
EC_{50} ($\mu\text{l/ml}$) \pm SD	47,50\pm1,624

b)

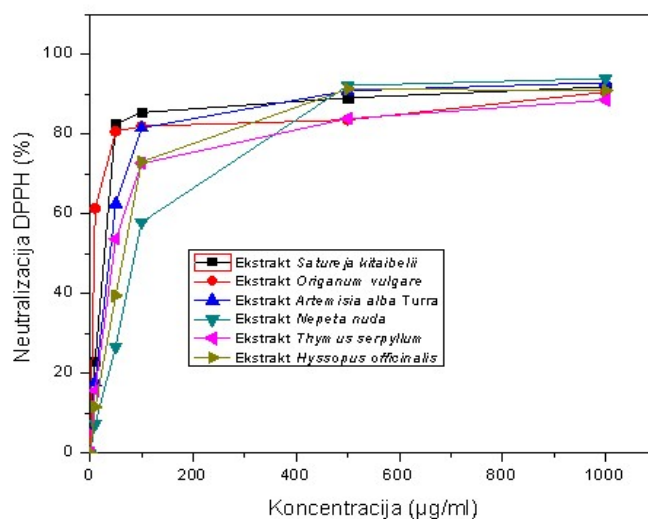
Najrasprostranjeniji hidrofilni antioksidant i esencijalni nutrijent za ljudski organizam je vitamin C. Antioksidantna aktivnost vitamina C utvrđena merenjem njegove sposobnosti da neutrališe DPPH radikal prikazana je na slici 27.



Slika 27. Antioksidantna aktivnost vitamina C (referentnog standarda)

Vitamin C, komercijalni referentni antioksidant, pokazuje najveću sposobnost neutralizacije DPPH radikala u odnosu na ostale ispitivane uzorke, sa vrednošću EC_{50} od $11,12 \pm 0,62$ µg/ml.

Rezultati DPPH testa kada su u pitanju ekstrakti dati su na slici 28 u vidu krivih neutralizacija DPPH radikala.

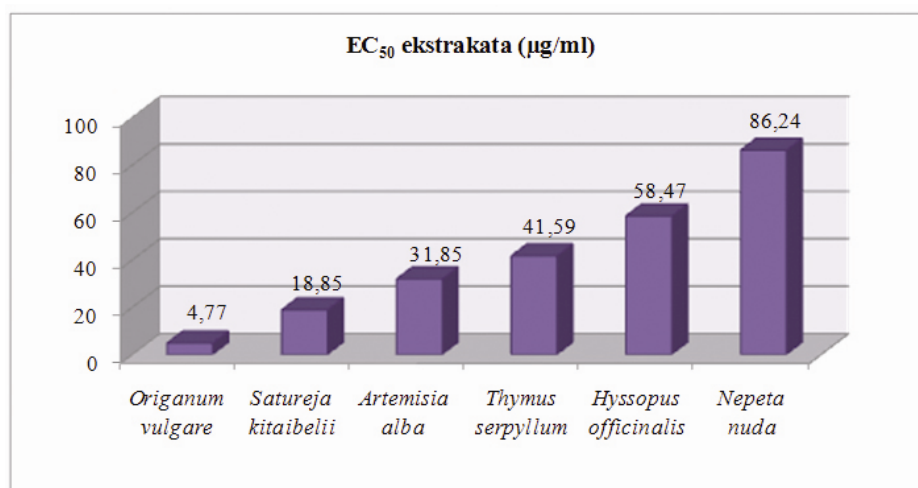


Slika 28. Antioksidantna aktivnost ekstrakata

U softveru Origin 8.0 konstruisana je kriva zavisnosti antioksidantne aktivnosti svih uzoraka od radne koncentracije (koncentracije ekstrakata i etarskog ulja u finalnoj reakcionoj smeši), i izračunata EC_{50} vrednost kao koncentracija koja dovodi do neutralizacije 50 % DPPH radikala.

EC₅₀ vrednost je koncentracija ekstrakta ili etarskog ulja potrebna za „hvatanje“ 50% DPPH ili hidroksil radikala pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Manja EC₅₀ vrednost odgovara većoj antioksidantnoj aktivnosti, što je i prikazano na slici 29.

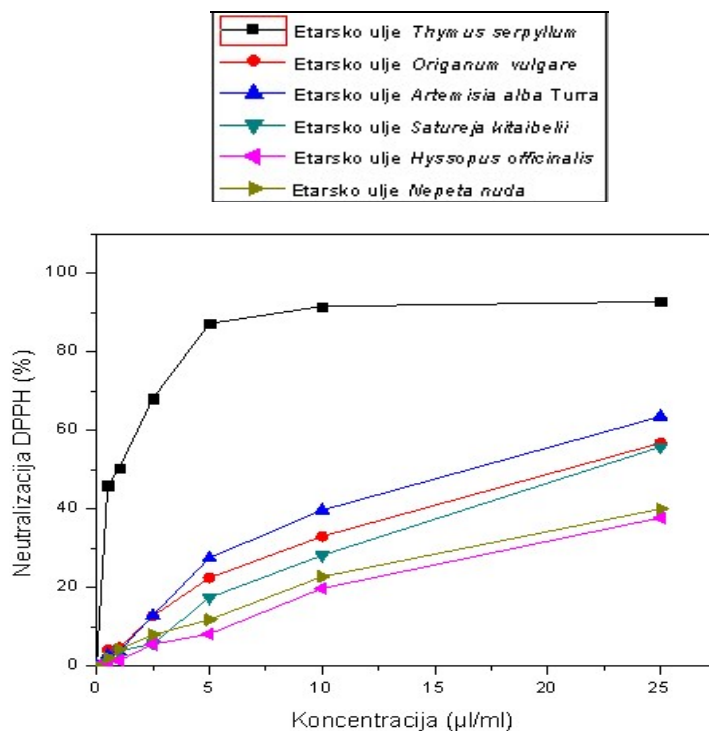
Najveće pokazano antioksidantno dejstvo, ispitivano DPPH testom, odnosno najmanju EC₅₀ vrednost ima ekstrakt biljne vrste *O. vulgare* (4,77±0,492 µg/ml) dok najmanje antioksidantno dejstvo, odnosno najveću EC₅₀ vrednost ima ekstrakt biljne vrste *N. nuda* (86,24±1,85 µg/ml) (slika 29).



Slika 29. Vrednosti EC₅₀ ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta (µg/ml)

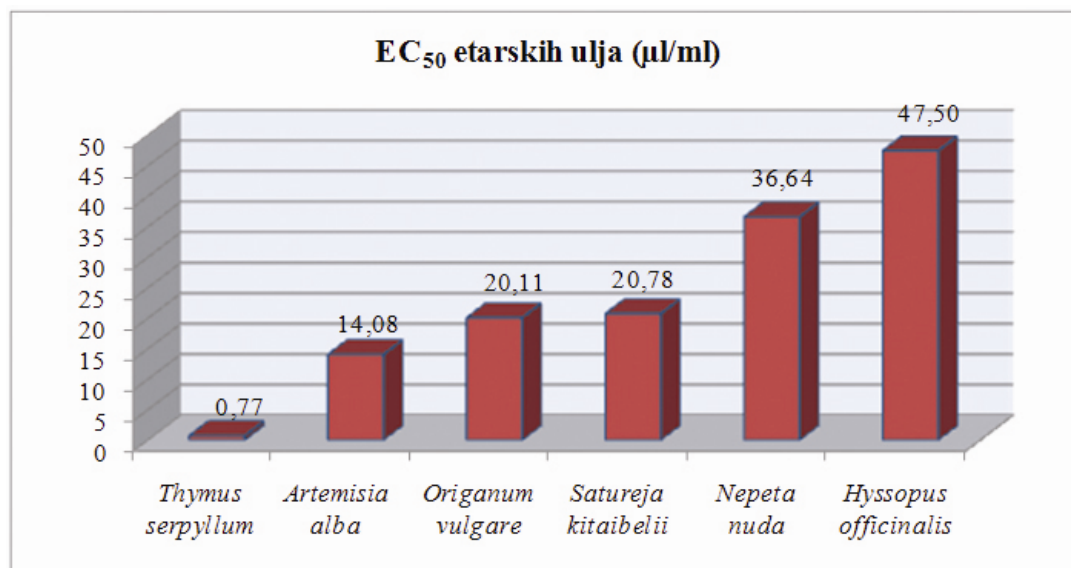
Rezultati DPPH testa kada su u pitanju etarska ulja dati su na slici 30 u vidu krivih neutralizacija DPPH radikala.

Rezultati pokazuju da ispitivani izolati poseduju značajnu antioksidantnu aktivnost, koja je opadala u nizu sledećim redosledom: *T. serpyllum* L. > *A. alba* > *O. vulgare* L. > *S. kitaibelii* > *N. nuda* L. > *H. officinalis* L.



Slika 30. Antioksidantna aktivnost etarskih ulja

Rezultati dobijeni ispitivanjem antioksidantne aktivnosti etarskih ulja DPPH testom prikazani su na slici 31.

Slika 31. EC₅₀ vrednosti etarskih ulja ispitivanih biljnih vrsta (µl/ml)

Znatno je teže uspostaviti korelaciju između rezultata FRAP testa i sadržaja fenola za razliku od DPPH. Da fenoli nisu glavne redukcijske komponente ekstrakta nizak

stepen korelacije ne znači nužno jer se ne sme zaboraviti da već jedinjenja sa malim razlikama u strukturi mogu imati vidno različit redoks-potencijal i stehiometriju reakcije sa FRAP reagensom, koja ne mora imati veze sa brojem elektrona koje mogu donirati (Macdonald-Wicks *et al.*, 2006).

Antioksidantne osobine ekstrakata procenjujane primenom FRAP i DPPH testa date su u tabeli 23.

Tabela 23. Antioksidantna aktivnost ekstrakata dobijena primenom FRAP i DPPH metode

Biljna vrsta	mmol Fe ²⁺ /g ^a	EC ₅₀ , μg/ml ^a	ARP (1/EC ₅₀) × 10 ³ ml/μg
<i>Satureja kitaibelii</i>	3,22±0,15a	18,85±0,310a	53,05
<i>Origanum vulgare</i>	5,89±0,12b	4,77±0,492b	209,64
<i>Artemisia alba</i>	1,16±0,08c,d	31,85±2,278c	31,39
<i>Nepeta nuda</i>	0,86±0,07c	86,24±1,850d	11,59
<i>Thymus serpyllum</i>	3,13±0,11a	41,59±0,738e	24,04
<i>Hyssopus officinalis</i>	1,05±0,02d	58,47±3,911f	17,10

^a Vrednosti prikazane u tabeli date su u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

^b Različitim slovima u koloni su obeležene vrednosti koje se značajno razlikuju (p<0,05, Scheffé test)

Generalno, postoji relativno dobro slaganje rezultata dobijenih za antioksidantnu aktivnost korišćenjem različitih tehnika određivanja (koeficijent korelacije, R²=0,7501), ali je korišćenjem Šefe-ovog testa (Scheffé test) na nivou poverenja od 95% pokazano da se rezultati dobijeni DPPH testom za sve ekstrakte statistički značajno razlikuju, što nije slučaj sa rezultatima dobijenim primenom FRAP metode.

Antioksidantni kapacitet se može izraziti kao ARP vrednost (anti radical power), gde veće vrednosti predstavljaju veću antioksidantnu aktivnost. ARP vrednost je opadala u nizu sledećim redosledom: *O. vulgare* > *S. kitaibelii* > *A. alba* > *T. serpyllum* > *H. officinalis* > *N. nuda*.

U tabeli 24 su dati rezultati dobijeni ispitivanjem antioksidantne aktivnosti etarskih ulja primenom FRAP i DPPH metode.

Tabela 24. Antioksidantna aktivnost etarskih ulja dobijena primenom FRAP i DPPH metode

Biljna vrsta	$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{ml}^{\text{a}}$	$\text{EC}_{50}, \mu\text{l}/\text{ml}^{\text{a}}$
<i>Satureja kitaibelii</i>	12,83±0,240	20,78 ± 1,296
<i>Origanum vulgare</i>	15,93±0,538	20,11± 2,522
<i>Artemisia alba</i>	22,83±0,260	14,08 ± 1,091
<i>Nepeta nuda</i>	5,43±0,630	36,64 ± 1,670
<i>Thymus serpyllum</i>	38,85±0,274	0,77 ± 0,051
<i>Hyssopus officinalis</i>	4,68±0,194	47,50 ± 1,624

a - srednja vrednost ± standardna devijacija

Zbog veoma kompleksnog i raznolikog sastava etarskih ulja evaluacija bioloških aktivnosti je komplikovana. Terpenske komponente koje poseduju dvostruke veze i hidroksilne grupe u svojoj strukturi imaju generalno, sposobnost za neutralizaciju slobodnih radikala. Kao što se može videti iz tabele 24, vrednosti EC_{50} za ispitivana etarska ulja, izračunate na osnovu eksperimentalnih podataka, imaju različite brojne vrednosti. Najveću EC_{50} vrednost ima etarsko ulje biljne vrste *H. officinalis* (47,50±1,624 $\mu\text{l}/\text{ml}$), dok najmanju vrednost ima ulje *T. serpyllum* (0,77± 0,051 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Najveću FRAP vrednost i visoku ukupnu antioksidantnu aktivnost pokazalo je ulje biljne vrste *T. serpyllum* (38,85±0,274 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{ml}$), dok je najmanja vrednost određena za ulje *H. officinalis* (4,68±0,194 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{ml}$). Uzimajući u obzir hemijski sastav etarskog ulja *T. serpyllum* visoka antioksidantnost je očekivana jer je poznato da najviši antioksidantni potencijal imaju oksidovani monoterpeni, timol i karvakrol, i monoterpenski ugljovodonici, terpinolen, α - i γ -terpinen i sabinen (Ruberto i Baratta, 2000; Božin *et al.*, 2007).

Rezultati ukazuju da najveću antioksidantnu aktivnost ispoljavaju ekstrakti, a zatim etarska ulja.

3.3.8. Uticaj načina sušenja na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima

Rezultati pokazuju da način sušenja utiče kako na prinos ukupnih ekstraktivnih materija tako i na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u dobijenim ekstraktima iz herbe *M. longifolia* sušene na različite načine (Tabela 25).

Tabela 25. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima i herbi *M. longifolia* sušene na različite načine^{a,b}

Način sušenja	Ukupni fenoli		Ukupni flavonoidi	
	mg galne kiseline/g suvog ekstrakta	mg galne kiseline /g herbe	mg rutina/g suvog ekstrakta	mg rutina /g herbe
Prirodno sušenje	113,8±2,0a	13,2±0,22a	106,7±0,3a	12,4±0,04a
Laboratorijska sušnica	85,1±1,5b	8,0±0,14b	70,6±2,0b	6,7±0,08b
Niskotemperaturna sušara	83,7±1,1b	7,4±0,01c	74,8±0,1c	6,6±0,01c

^a Vrednosti prikazane u tabeli date su u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

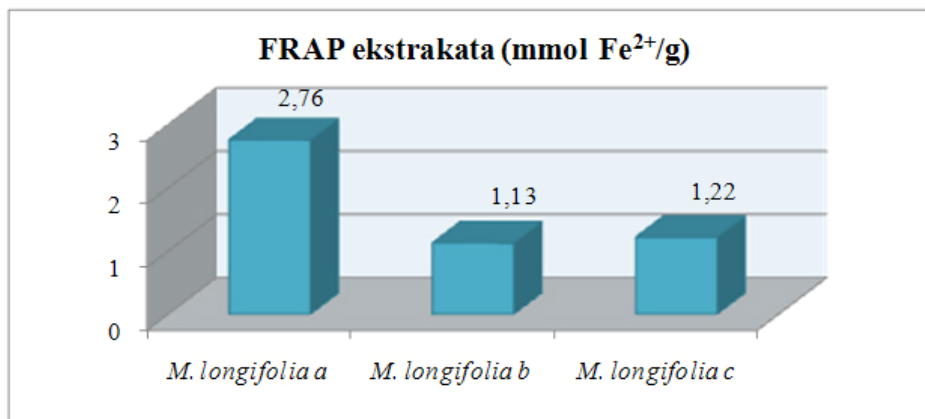
^b Različitim slovima u koloni su obeležene vrednosti koje se značajno razlikuju (p<0,05, Tukey test)

Poređenjem sa drugim ekstraktima, ekstrakt biljnog materijala sušen prirodnim putem u hladu na promajnom mestu, ima najveći sadržaj ukupnih fenola (113,8±2,0 mg galne kiseline/g suvog ekstrakta) i flavonoida (106,7±0,3 mg rutina/g suvog ekstrakta). Najmanji sadržaj ukupnih fenola dobijen je kod ekstrakta *M. longifolia* sušenoj u niskotemperaturnoj sušari, što se može tumačiti slabijom ekstrakcijom fenolnih jedinjenja biljke sušene na ovaj način. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u dobijenim ekstraktima pokazuje da je prirodno sušenje najpovoljniji način sušenja sa aspekta sadržaja fenola i flavonoida u ekstraktima kao i količine ekstrahovanih fenola i flavonoida po masi herbe.

3.3.9. Uticaj načina sušenja na antioksidantnu aktivnost ekstrakata i etarskih ulja

FRAP metoda

Rezultati određivanja ukupnog antioksidantnog potencijala ekstrakata FRAP testom prikazani su na slici 32.



^a normalno sušena, ^b laboratorijski sušena, ^c niskotemperaturna sušara

Slika 32. Ukupna antioksidantna aktivnost *M. longifolia* određena FRAP testom

Primenom FRAP metode, najveća antioksidantna aktivnost se uočava kod ekstrakta dobijenog iz herbe koja je sušena prirodnim putem (2,76 mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta), a najmanja u ekstraktu dobijenom iz biljnog materijala koji je sušen u laboratorijskoj sušnici (1,13 mmol Fe²⁺/ g suvog ekstrakta).

Ukupan antioksidantni potencijal kao što se može videti sa slike 32 je opadao u nizu sledećim redosledom: *M. longifolia* (PS) (2,76) > *M. longifolia* (NTKS) (1,22) > *M. longifolia* (LS) (1,13).

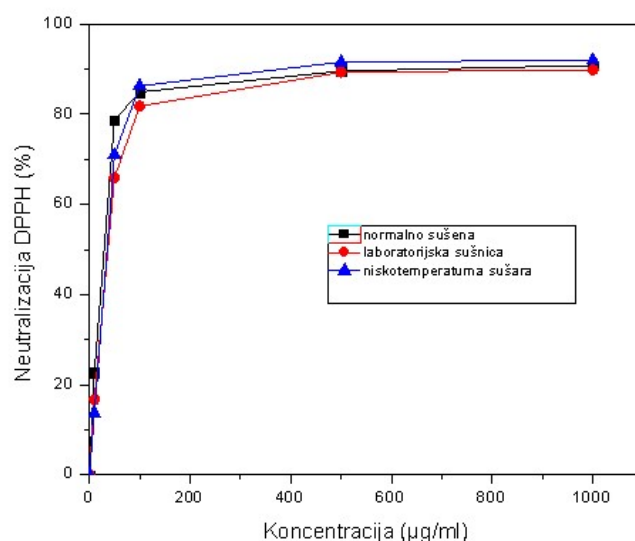
Neutralizacija DPPH radikala

Antioksidantna aktivnost ekstrakata dobijenih iz herbe *M. longifolia* sušene na različite načine, utvrđena merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH radikal, prikazana je u tabeli 26 i na slici 33.

Tabela 26. Inhibitorski efekat ekstrakata *M. longifolia* na DPPH radikal

Ekstrakt (µg/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ^a ± SD	Neutralizacija DPPH (%) ^b ± SD	Neutralizacija DPPH (%) ^c ± SD
10	22,74±1,391	16,70±0,933	13,66±1,134
50	78,71±3,647	65,90±0,928	71,01±0,128
100	84,90±0,727	81,80±0,227	86,26±2,268
500	89,56±0,493	89,30±1,041	91,57±0,230
1000	90,83±0,546	89,81±0,126	91,97±0,230
EC₅₀(µg/ml) ± SD	21,00±2,00	36,00±4,00	33,00±1,00

^a - normalno sušena, ^b - laboratorijski sušena, ^c - niskotemperaturna sušara



Slika 33. Antioksidantna aktivnost ekstrakata herbe *M. longifolia*

Ekstrakti pokazuju karakterističnu promenu stepena neutralizacije sa povećanjem koncentracije suve materije u uzorku. Vrednosti antioksidantne aktivnosti ekstrakata izračunate na osnovu eksperimentalnih podataka prikazane su u tabeli 27.

Tabela 27. Antioksidantna aktivnost ekstrakata *M. longifolia*^{a,b}

Način sušenja biljnog materijala	Antioksidantna aktivnost		
	FRAP ^a , mmol Fe ²⁺ /g suvog ekstrakta	DPPH (EC ₅₀) ^a , µg/ml	ARP (1/EC ₅₀)×10 ³ ml/µg
Prirodno sušenje	2,76±0,15a	21,00±2,00a	47,62
Laboratorijska sušnica	1,13±0,21b	36,00±4,00b	27,78
Niskotemperaturna sušara	1,22±0,15b	33,00±1,00b	30,30

^a Vrednosti su prikazane u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

^b Različitim slovima u koloni su obeležene vrednosti koje se značajno razlikuju (p<0,05, Tukey test)

Tehnika sušenja biljnog materijala ima značajan uticaj na sadržaj flavonoida u dobijenim ekstraktima, što je dokazano Takijevim testom (Tukey test) na nivou poverenja od 95%.

Najveći sadržaj fenola i antioksidantna aktivnost ekstrakata dokazana je u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom iz prirodno sušenog biljnog materijala, dok je Takijevim testom dokazano da nema statistički značajne razlike u sadržaju fenola i antioksidantnoj aktivnosti ekstrakata dobijenih ekstrakcijom biljnih materijala sušenih u niskotemperaturnoj i laboratorijskoj sušnici.

Najveću antioksidantnu aktivnost (određenu FRAP i DPPH testom) pokazuje ekstrakt dobijen iz biljke prirodno sušene dok ekstrakti dobijeni iz biljke sušene u laboratorijskoj i niskotemperaturnoj sušnici pokazuju znatno slabiju antioksidantnu aktivnost.

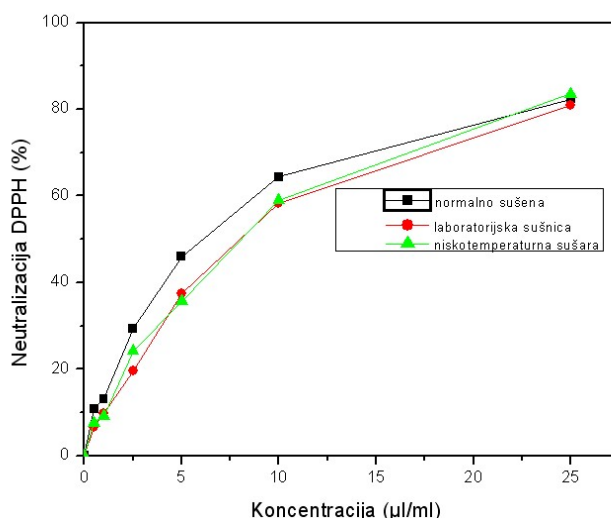
Normalizovana vrednost antioksidantnog kapaciteta (određen FRAP testom) ekstrakata (u odnosu na 1 g polazne biljke) je tri puta veća u odnosu na vrednosti za biljke sušene u sušnici. Vrednost EC_{50} za ekstrakte dobijene iz biljke sušene u sušnici je za 50% veća nego za prirodno sušenu biljku. Ovakve vrednosti upućuju na zaključak da prirodnim sušenjem najmanje dolazi do razgradnje polifenolne strukture jedinjenja kojima se pripisuje antioksidantna aktivnost (Barros *et al.*, 2010). U poređenju sa vitaminom C svi ekstrakti su imali manju antioksidantnu aktivnost prema „hvatanju“ DPPH radikala. Antioksidantna aktivnost vitamina C ($EC_{50}=11,12\pm 0,62$ $\mu\text{g/ml}$) je dvostruko veća u odnosu na ekstrakt sa najvećom antioksidantnom aktivnosti.

Antioksidantna aktivnost etarskih ulja herbe *M. longifolia* sušene na različite načine utvrđena merenjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH radikale, prikazana je u tabeli 28 i na slici 34.

Tabela 28. Inhibitorni efekat etarskog ulja *M. longifolia* na DPPH radikal

Etarsko ulje ($\mu\text{l/ml}$)	Neutralizacija DPPH (%) ^a \pm SD	Neutralizacija DPPH (%) ^b \pm SD	Neutralizacija DPPH (%) ^c \pm SD
0,5	10,86 \pm 1,784	6,65 \pm 0,327	7,65 \pm 1,138
1	13,16 \pm 1,906	9,71 \pm 1,490	9,09 \pm 1,416
2,5	29,34 \pm 3,338	19,70 \pm 2,807	24,21 \pm 2,868
5	45,97 \pm 1,863	37,51 \pm 2,939	35,62 \pm 3,382
10	64,41 \pm 1,385	58,34 \pm 1,614	58,98 \pm 2,023
25	82,34 \pm 0,448	80,84 \pm 0,710	83,63 \pm 1,683
$EC_{50}(\mu\text{l/ml}) \pm$ SD	5,83\pm0,104	9,40\pm0,957	7,40\pm1,142

^a normalno sušena, ^b laboratorijski sušena, ^c niskotemperaturna sušara



Slika 34. Antioxiđantna aktivnost etarskih ulja herbe *M. longifolia*

Vrednosti antioksiđantne aktivnosti etarskih ulja izrađunate na osnovu eksperimentalnih podataka prikazane su u tabeli 29.

Tabela 29. Antioxiđantna aktivnost etarskih ulja *M. longifolia*

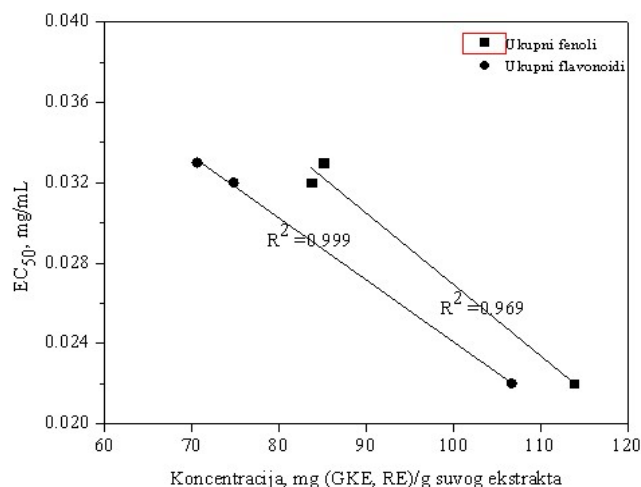
Način sušenja biljnog materijala	Antioxiđantna aktivnost		
	µmol Fe ²⁺ /ml± SD	EC ₅₀ , µl /ml± SD	ARP (1/EC ₅₀)
Prirodno sušenje	28,47±0,176	5,83±0,104	0,19
Laboratorijska sušnica	14,63±0,177	9,40±0,957	0,12
Niskotemperaturna sušara	22,03±0,686	7,40±1,142	0,15

Vrednosti su prikazane u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

Najveću antioksiđantnu aktivnost (određenu FRAP i DPPH testom) kao što se može videti iz tabele 29 pokazuje etarsko ulje dobijeno iz prirodno sušene biljke, dok ulja dobijena iz biljaka sušenih u laboratorijskoj i niskotemperaturnoj sušari pokazuju znatno slabiju antioksiđantnu aktivnost. Vrednost antioksiđantnog kapaciteta (određen FRAP testom) etarskog ulja dobijenog iz mente sušene prirodnim putem je dva puta veća u odnosu na dobijenu vrednost za biljku sušenu u laboratorijskoj sušnici. Vrednost EC₅₀ za etarska ulja dobijena iz biljke sušene u sušnici je za oko 50% veća nego za prirodno sušenu biljku.

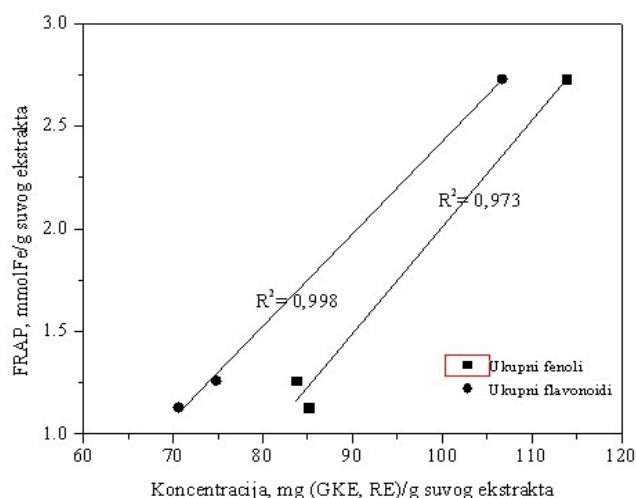
Upoređivanjem antioksiđantne aktivnosti etanolnih ekstrakata i etarskih ulja *M. longifolia* (Stanisavljević *et al.*, 2012) sušene na tri različita načina, možemo konstatovati da ekstrakti pokazuju znatno jači antioksiđantni potencijal. S' obzirom na

hemijski sastav etanolnih ekstrakata i etarskih ulja može se zaključiti da fenolna jedinjenja ekstrakata pokazuju znatnu veću RSC aktivnost u odnosu na terpenška jedinjenja – dominantne komponente etarskih ulja.



Slika 35. Korelacija, zavisnost EC_{50} od sadržaja fenola (flavonoida) za ekstrakt *M. longifolia*

Sa slike 35 se vidi dobra korelacija između EC_{50} i sadržaja fenola ($R^2=0,969$) odnosno flavonoida ($R^2=0,999$) što potvrđuje da su fenoli i flavonoidi, odgovorni za antioksidantnu aktivnost ekstrakata.



Slika 36. Korelacija, zavisnost FRAP od sadržaja fenola (flavonoida) za ekstrakt *M. longifolia*

Antioksidantna aktivnost ekstrakata izražena kao $mmol Fe^{2+}/g$ ekstrakta (slika 36) pokazuje dobru korelaciju sa sadržajem fenola ($R^2=0,973$) i flavonoida ($R^2=0,998$) što ukazuje na značaj načina sušenja na antioksidantni potencijal biljnog materijala.

3.3.10. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima *M. longifolia*

Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata mente sušene različitim tehnikama izvršena je primenom HPLC metode. Upoređivanjem hromatograma ekstrakata poređenjem retencionih vremena, utvrđeno da je većina komponenata prisutnih u ekstraktima mente sušene prirodnim putem prisutna i u ostala dva slučaja. Udeo prisutnih komponenata je dat u odnosu na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja. Registrovano je u proseku prisustvo 26 (prirodno sušenje), odnosno 18 komponenata (niskotemperaturna sušara), respektivno. Rezultati HPLC-DAD analize prikazani u tabeli 30, kao i na slikama 14-16 u prilogu rada pokazuju da je u svim slučajevima, nezavisno od tehnike sušenja dominantna fenolna komponenta kemferol 3-O-glukozid. Do sličnih rezultata došli su El-Desoky i saradnici koji su pored kemferol 3-O-ramnozid-7-O-glukozid u metanolnom ekstraktu nadzemnog dela *Mentha lavandulacea* identifikovali još tri flavonoida (El-Desoky *et al.*, 2001).

Tabela 30. Sadržaj neisparljivih supstanci u ekstraktima *M. longifolia*

Broj pika	Komponenta	P.S.	L.S.	NTKS
		Udeo %		
1	Kvercetin 3,7-O-diglukozid	0,53	-	0,69
2	Kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-glukozid	0,73	-	-
3	Kemferol 3-O-soforozid	1,50	-	1,51
4	Luteolin 5-O-glukozid	1,74	-	-
5	Kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-ramnozid	17,62	2,84	2,47
6	Apigenin 5-O-glukozid	7,72	3,16	6,32
7	Apigenin 4'-O-glukozid	0,83	3,89	-
8	Kemferol 3-O-glukozid	62,87	70,98	80,12
9	Genkvanin 5-O-glukozid	0,57	-	-
10	Kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)	0,87	1,38	0,93
11	Kemferol 3-O-ramnozid	-	10,32	-
12	Genkvanin 5-O-(6''-O-malonilglukozid)	-	3,74	-
13	Kemferol 7-O-ramnozid	1,78	1,75	1,65
14	Genkvanin 4'-O-glukozid	0,53	1,09	1,03

P.S.-prirodno sušena; L.S.- sušena u laboratorijskoj sušari; NTKS- sušena u niskotemperaturnoj sušari;

Sadržaj fenolnih jedinjenja zavisi od uslova sušenja. HPLC analizom ekstrakata dobijenih iz herbe sušene prirodnim putem osim flavonoidnog glikozida kemferol 3-O-

glukoziida identifikovano je veće prisustvo kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukoziid)-7-O-ramnoziida i apigenin 5-O-glukoziida. Takođe iz tabele se može videti da je koncentracija kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukoziid)-7-O-ramnoziid sedam puta veća u ekstraktu dobijenom iz herbe sušene prirodnim putem u odnosu na ekstrakt dobijen iz herbe sušene u niskotemperaturnoj sušari. Udeo apigenin 5-O-glukoziida u ekstraktima dobijenim pod dejstvom različitih tehnika sušenja opada sa porastom temperature sušenja. U ekstraktu dobijenom sušenjem u niskotemperaturnoj sušari pored kemferol 3-O-glukoziida kao dominantne komponente zastupljen je i apigenin 5-O-glukoziid, dok je u slučaju laboratorijskog sušenja ekstrakt najbogatiji komponentama kemferol 3-O-glukoziid, kemferol 3-O-ramnoziid, apigenin 4'-O-glukoziid i genkvanin 5-O-(6''-O-malonilglukoziid). Komponente kemferol 3-O-ramnoziid i genkvanin 5-O-(6''-O-malonilglukoziid) koje su prisutne u ekstraktu herbe sušene u laboratorijskoj sušnici nisu identifikovane u ostala dva slučaja.

3.3.11. Antimikrobna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja

Antibakterijska aktivnost ekstrakata i etarskih ulja ispitana na devet standardnih bakterijskih sojeva i na dva standardna soja gljivica prikazana je u tabelama 31-39. Primjenjene koncentracije ekstrakata i etarskih ulja, kao i antibiotici koji su korišćeni kao pozitivna kontrola, takođe su navedeni u istim tabelama.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja *S. kitaibelii* prema standardnim mikroorganizmima pokazuju da ispitivano etarsko ulje poseduje veoma dobru antimikrobnu aktivnost (Tabela 31).

Tabela 31. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *S. kitaibelii*

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC (μ /ml)	MIC (mg/ml)
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	Eu ^c	Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12,5 \pm 1,0	21,0 \pm 1,0	0	33,0	31,0	n.t.	3,12	0,81
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	24,5 \pm 1,5	28,5 \pm 2,5	0	36,0	n.t.	n.t.	12,5	1,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,0 \pm 2,0	16,0 \pm 1,5	0	26,0	25,0	n.t.	12,5	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	20,0 \pm 2,5	21,5 \pm 3,5	0	12,0	33,0	n.t.	6,25	1,62
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	19,0 \pm 1,0	22,0 \pm 2,0	0	16,0	23,0	n.t.	3,12	7,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	28,5 \pm 2,5	32,0 \pm 4,0	6,0	15,0	32,0	n.t.	1,56	3,25
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,0 \pm 1,0	22,0 \pm 1,0	10,0	18,0	30,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	28,0 \pm 0,5	28,5 \pm 1,5	0	23,0	25,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11,5 \pm 0,5	12,0 \pm 2,0	12,0	n.t.	30,0	n.t.	25,0	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	20,5 \pm 1,5	22,0 \pm 0	12,0	n.t.	n.t.	21,0	6,25	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	20,0 \pm 0	23,0 \pm 1,0	15,0	n.t.	n.t.	22,5	12,5	7,5

Eu-etarsko ulje, Eks – ekstrakt, ^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

Etarsko ulje *S. kitaibelii* je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) kada su u pitanju Gram (+) bakterije bilo najaktivnije prema *B. subtilis* (190,0%, odnosno 213,3% aktivnosti ampicilina), *S. epidermidis* (166,7%, odnosno 179,2% aktivnosti ampicilina) i *E. faecalis* (118,8%, odnosno 137,5% aktivnosti ampicilina, respektivno). Aktivnost etarskog ulja prema *B. subtilis* i *E. faecalis*, takođe je značajna u poređenju sa amikacinom (89,1%, odnosno 100,0% njegove aktivnosti) i (82,6%, odnosno 95,7% njegove aktivnosti, respektivno). Najveću osetljivost ispoljava Gram (-) bakterija *K. pneumoniae*. Aktivnost etarskog ulja prema *K. pneumoniae* je značajna u poređenju sa ampicilinom (121,7%, odnosno 123,9% njegove aktivnosti) i amikacinom (112,0%, odnosno 114,0% njegove aktivnosti, respektivno).

Ekstrakt herbe *S. kitaibelii* pokazuje priličnu neaktivnost prema većem broju mikroorganizama. Najveću aktivnost ispoljava prema Gram (-) bakteriji *E. coli* (55,6% od aktivnosti ampicilina). Ekstrakt ispoljava umerenu antifungalnu aktivnost prema

testiranim sojevima *C. albicans* (71,4%, odnosno 53,3% aktivnosti nistatina). MIC je definisana kao najniža koncentracija etarskog ulja pri kojoj nema vidljivog rasta bakterija. Na osnovu rezultata MIC testa može se zaključiti da su najveću osetljivost na etarsko ulje herbe *S.kitaibelii* pokazali sledeći bakterijski sojevi: *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*. Za pomenute bakterijske sojeve MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 1,56-3,12 $\mu\text{l/ml}$. Veću rezistentnost pokazao je bakterijski soj *P. aeruginosa* gde je MIC konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 25,0 $\mu\text{l/ml}$. Kada su u pitanju rezultati MIC testa ispitivanih ekstrakata može se zaključiti da su veliku osetljivost na ekstrakt herbe *S. kitaibelii* pokazali bakterijski sojevi *M.luteus*, *M. flavus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis* tako da je MIC za iste konstatovan pri koncentraciji ekstrakata od 0,81-3,25 mg/ml.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja *O. vulgare* prema standardnim mikroorganizmima prikazani su tabelom 32.

Tabela 32. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *O. vulgare*

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC	MIC
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	Eu ^c	Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	14,5±2,5	19,0±0	0	33,0	31,0	n.t.	3,12	3,25
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	17,0±10	25,0±0	0	36,0	n.t.	n.t.	25,0	1,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24,0±4,0	36,0±0	0	26,0	25,0	n.t.	25,0	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	21,0±3,0	26,5±2,5	0	12,0	33,0	n.t.	12,5	3,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20,0±0	22,0±2,0	0	16,0	23,0	n.t.	3,12	7,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25,5±0,5	27,5±2,5	0	15,0	32,0	n.t.	1,56	7,5
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,0±2,0	19,5±0,5	7,0	18,0	30,0	n.t.	12,5	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	10,0±0	13,0±1,0	0	23,0	25,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12,0±1,0	12,0±0	10,0	n.t.	30,0	n.t.	25,0	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	19,0±2,0	20,5±2,5	13,0	n.t.	n.t.	21,0	12,5	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	13,5±1,5	18,0±2,0	17,0	n.t.	n.t.	22,5	12,5	7,5

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

U poređenju sa standardnim antibioticima (ampicilin i amikacin), 2% i 4% rastvori etarskog ulja *O. vulgare* pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakterijama. Kada je u pitanju standardni antibiotik amikacin 2% i 4% rastvori etarskog ulja nisu pokazali antibakterijsku aktivnost prema *M. flavus*. Etarsko ulje je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (175,0%, odnosno 220,8% aktivnosti ampicilina), *B. subtilis* (170%, odnosno 183,3% aktivnosti ampicilina) i *E. faecalis* (125,0%, odnosno 157,5% aktivnosti ampicilina, respektivno). Aktivnost ulja prema *S. aureus* takođe je značajna u poređenju sa ampicilinom (92,3%, odnosno 138,5% njegove aktivnosti) i amikacinom (96,0%, odnosno 144,0% njegove aktivnosti, respektivno). Etarsko ulje je manje aktivno prema Gram (–) bakterijama, sa izuzetkom 2% i 4% rastvora ulja koji je aktivniji prema *E. coli* (83,3%, odnosno 108,3% aktivnosti ampicilina).

Ekstrakt herbe *O. vulgare* u većini slučajeva ne ispoljava nikakvu aktivnost prema standardnim sojevima bakterija u poređenju sa ampicilinom i amikacinom. Ispitivani ekstrakt pokazuje umerenu antifungalnu aktivnost (80,9% aktivnosti nistatina za *C. albicans* 24433, odnosno 57,8% za *C. albicans* 10259). Kada je u pitanju etarsko ulje za ispitivane bakterijske sojeve MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 1,56-25,0 µl/ml, dok je u slučaju ekstrakata MIC konstatovan pri koncentraciji od 1,62-7,5 mg/ml.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja herbe *A. alba* prema standardnim mikroorganizmima pokazuju da ispitivano etarsko ulje poseduje značajnu antimikrobnu aktivnost (Tabela 33).

U poređenju sa standardnim antibioticima (ampicilin i amikacin), 2% i 4% rastvori etarskog ulja pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakterijama. Etarsko ulje je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (283,3%, odnosno 300,0% aktivnosti ampicilina) i *B. subtilis* (143,3%, odnosno 186,7% aktivnosti ampicilina, respektivno).

Tabela 33. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *A. alba*

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC	MIC
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	(µl/ml) Eu ^c	(mg/ml) Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	28,5±1,5	33,0±1,0	0	33,0	31,0	n.t.	3,12	1,62
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	21,5±3,5	26,5±0,5	9,0	36,0	n.t.	n.t.	25,0	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,0±2,0	30,0±1,5	0	26,0	25,0	n.t.	12,5	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	34,0±1,5	36,0±0	10,0	12,0	33,0	n.t.	3,12	3,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	19,0±3,0	25,0±1,0	10,0	16,0	23,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	21,5±1,5	28,0±3,0	0	15,0	32,0	n.t.	3,12	7,5
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,0± 2,0	20,5±1,5	0	18,0	30,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	24,0±1,0	27,0±1,5	6,0	23,0	25,0	n.t.	12,50	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,5±1,5	17,5±0,5	6,0	n.t.	30,0	n.t.	25,0	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	19,5±0,5	26,0±1,0	12,0	n.t.	n.t.	21,0	25,0	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	19,0±1,0	19,5±0,5	16,0	n.t.	n.t.	22,5	25,0	7,5

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

Aktivnost ulja prema *S. aureus* je značajna u poređenju sa ampicilinom (103,9%, odnosno 115,4% njegove aktivnosti) i amikacinom (108,0%, odnosno 120,0% njegove aktivnosti, respektivno). Aktivnost etarskog ulja prema *E. faecalis*, takođe je značajna u poređenju sa ampicilinom (118,8%, odnosno 156,3% njegove aktivnosti) i amikacinom (82,6%, odnosno 108,7% njegove aktivnosti, respektivno). Etarsko ulje je manje aktivno prema Gram (-) bakterijama u odnosu na Gram (+) bakterije, ali je i u navedenom slučaju aktivnost ulja prema *K. pneumoniae* značajna u poređenju sa ampicilinom (104,4%, odnosno 117,4% njegove aktivnosti) i amikacinom (96,0%, odnosno 108,0% njegove aktivnosti, respektivno). Etarsko ulje ispoljava visoku antifungalnu aktivnost prema testiranim sojevima *C. albicans*. U obe primenjene koncentracije bilo je najaktivnije prema *C. albicans* ATCC 10259 (92,9%, odnosno 123,8% aktivnosti nistatina, respektivno). Aktivnost ekstrakta prema *M. flavus* i *E. faecalis* u poređenju sa ampicilinom je umerena i međusobno vrlo slična (od 75,0% do

62,5% aktivnosti ampicilina). Ekstrakti, takođe, poseduju antifungalnu aktivnost. Najveću aktivnost ekstrakt herbe pokazuje prema *C. albicans* 24433 (76,2% aktivnosti nistatina). Minimalne inhibitorne koncentracije etarskog ulja i ekstrakta protiv bakterija se kreću od 3,12–25,0 µl/ml i 0,81–7,5 mg/ml, respektivno i 25,0 µl/ml, odnosno 7,5 mg/ml protiv gljivica *C. albicans*.

Prethodna istraživanja su pokazala da oksidovani monoterpeni, kao što su 1,8-cineol, kamfor, terpinen-4-ol, linalool, α -terpineol i borneol, koji su reprezentativne komponente u nekim ispitivanim uljima *Artemisia* vrsta, pokazuju antimikrobnu aktivnost (Pattnaik *et al.*, 1997). Za druga *Artemisia* ulja bogata kamforom i 1,8-cineolom je ranije dokazano da imaju moćne antimikrobne aktivnosti *in vitro* (Kordali *et al.*, 2005a; Kordali *et al.*, 2005b).

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja herbe *Nepeta nuda* prikazani su tabelom 34.

Tabela 34. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *N. nuda*

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC	MIC
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	(µl/ml) Eu ^c	(mg/ml) Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12,5±1,5	15,0±0	0	33,0	31,0	n.t.	6,25	1,62
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	30,0±4,0	36,0±0	15,0	36,0	n.t.	n.t.	12,5	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18,0±2,0	20,0±0	0	26,0	25,0	n.t.	25,0	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	11,5±3,0	18,0±2,5	0	12,0	33,0	n.t.	12,5	3,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	15,5±0,5	20,5±1,5	10,0	16,0	23,0	n.t.	12,5	7,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11,5±1,5	18,5±1,5	6,0	15,0	32,0	n.t.	3,12	3,25
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17,5±2,5	19,5±0,5	7,0	18,0	30,0	n.t.	25,0	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	11,5±2,5	17,5±2,5	10,0	23,0	25,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10,0±1,0	10,5±0,5	6,0	n.t.	30,0	n.t.	12,5	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	10,0±0	19,0±1,0	11,0	n.t.	n.t.	21,0	25,0	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	12,0±1,5	16,0±2,0	13,0	n.t.	n.t.	22,5	25,0	7,5

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

Pregledom dostupnih literaturnih podataka, nisam našla potvrdu da je do sada ispitivana antibakterijska aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *N. nuda*. Stoga je ekstrakt i etarsko ulje ove vrste ušlo u fokus mog naučnog interesovanja, a rezultati su prikazani u tabeli 34. Etarsko ulje je i u ovom slučaju, kao i u prethodnim bilo najaktivnije prema G (+) bakterijama u poređenju sa ampicilinom i to prema *S. epidermidis* (95,8%, odnosno 150,0% njegove aktivnosti), *E. faecalis* (96,9%, odnosno 128,1% njegove aktivnosti) i *B. subtilis* (76,7%, odnosno 123,3% njegove aktivnosti). Aktivnost etarskog ulja prema *S. aureus* ATCC 25923, takođe je značajna u poređenju sa ampicilinom (69,2%, odnosno 76,9% njegove aktivnosti) i amikacinom (72,0%, odnosno 80,0% njegove aktivnosti). Etarsko ulje je manje aktivno prema Gram (-) bakterijama, sa izuzetkom rastvora ulja koji je aktivniji prema *E. coli* (97,2%, odnosno 108,3% aktivnosti ampicilina). Kada je u pitanju antifungalna aktivnost najaktivniji je 4% rastvor etarskog ulja prema *C. albicans* ATCC 10259 i *C. albicans* ATCC 24433 (90,5% i 71,1% aktivnosti nistatina).

Ekstrakt herbe pokazuje najveću aktivnost prema Gram (+) bakteriji *M. flavus* (125,0% od aktivnosti ampicilina), a umerenu prema Gram (+) bakteriji *E. faecalis* (62,5% od aktivnosti ampicilina). Antifungalna aktivnost rastvora ekstrakta herbe *N. nuda* prema *C. albicans* 24433 jednaka je 61,9% aktivnosti nistatina.

Upotrebom mikrodilucione metode određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Na osnovu rezultata MIC testa može se zaključiti da su najveću osetljivost na etarsko ulje *Nepete* pokazali sledeći bakterijski sojevi: *B. subtilis*, *M. luteus*, *K. pneumoniae*. Za pomenute bakterijske sojeve MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 3,12-6,25 µl/ml. Kada je u pitanju ekstrakt najveću osetljivost su pokazali sledeći bakterijski sojevi: *M. flavus*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, za koje je MIC konstatovan pri koncentraciji ekstrakta od 0,81-3,25 mg/ml. Znatno veću rezistentnost pokazali su ostali bakterijski sojevi gdje je MIC konstatovan pri koncentraciji ekstrakta od 7,5 mg/ml.

Rezultati ispitane antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja *Thymus serpyllum* dati su u tabeli 35.

U poređenju sa ostalim etarskim uljima i ekstraktima (tabela 35) primećujemo da je aktivnost etarskog ulja *Thymusa* prema ispitivanim sojevima mikroorganizama znatno slabija. Najveću aktivnost etarsko ulje ispoljava prema Gram (+) bakteriji *S. aureus* (144,2%, odnosno 148,1% od aktivnosti ampicilina i od 150,0%, odnosno 154,0% aktivnosti amikacina) i prema Gram (-) bakteriji *E. coli* (94,4%, odnosno 133,3% od aktivnosti ampicilina).

Koristeći mikrodilucionu metodu MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja *Thymusa* od 1,56-12,5 µl/ml. Najveću osetljivost su pokazali sledeći bakterijski sojevi: *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis*, a za koje je MIC konstatovan pri koncentracijama etarskog ulja od 1,56 do 3,12 µl/ml. U slučaju ekstrakta najveću osetljivost su pokazali sledeći bakterijski sojevi: *M. flavus*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* za koje je MIC konstatovan pri koncentraciji ekstrakta od 0,81-3,25 mg/ml.

Tabela 35. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *T. serpyllum*

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC	MIC
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	(µl/ml) Eu ^c	(mg/ml) Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	0	0	33,0	31,0	n.t.	3,12	0,81
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	0	0	0	36,0	n.t.	n.t.	6,25	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	37,5±0,5	38,5±2,5	15,0	26,0	25,0	n.t.	6,25	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	0	0	0	12,0	33,0	n.t.	6,25	3,25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0	0	0	16,0	23,0	n.t.	3,12	7,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	15,0	32,0	n.t.	1,56	7,5
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17,0±1,0	24,0±1,0	0	18,0	30,0	n.t.	12,5	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	0	0	0	23,0	25,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15,0±2,0	22,0±2,0	12,0	n.t.	30,0	n.t.	12,5	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	0	0	8,0	n.t.	n.t.	21,0	6,25	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	0	0	10,0	n.t.	n.t.	22,5	6,25	7,5

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja herbe *M. longifolia* Huds. sušene na tri različita načina prema standardnim mikroorganizmima pokazuju da ispitivano etarsko ulje poseduje značajnu antimikrobnu aktivnost (Tabela 36-38). U poređenju sa standardnim antibioticima (ampicilin i amikacin), 2% i 4% rastvori etarskog ulja *M. longifolia* normalno sušenoj pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakterijama. Etarsko ulje je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (208,3%, odnosno 216,7% aktivnosti ampicilina), *B. subtilis* (110,0%, odnosno 126,7% aktivnosti ampicilina) i *E. faecalis* (109,4%, odnosno 121,9% aktivnosti ampicilina, respektivno). Najveću osetljivost ispoljavaju Gram (–) bakterije *K. pneumoniae* i *E. coli*. U obe primenjene koncentracije (2% i 4% rastvori), etarsko ulje *Mentha longifolia* pokazuje 116,7% od aktivnosti ampicilina prema *E. coli*, odnosno 80,4% i 106,5% aktivnosti ampicilina prema *K. pneumoniae*, respektivno.

Tabela 36. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *M. longifolia* normalno sušenoj

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC (µl/ml)	MIC (mg/ml)
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	Eu ^c	Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	15,0±0	16,0±1,0	0	33,0	31,0	n.t.	12,5	0,81
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	19,0±1,0	23,5±1,5	15,0	36,0	n.t.	n.t.	25,0	1,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17,0±0	17,5±0,5	0	26,0	25,0	n.t.	50,0	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	25,0±1,5	26,0±0	4,0	12,0	33,0	n.t.	25,0	1,62
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	17,5±1,5	19,5±0,5	9,0	16,0	23,0	n.t.	12,5	15,0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16,5±1,5	19,0±0	0	15,0	32,0	n.t.	1,56	7,5
Gram (–) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21,0±0	21,0±0	8,0	18,0	30,0	n.t.	25,0	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	18,5±0,5	24,5±1,5	0	23,0	25,0	n.t.	12,5	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20,5±0,5	22,0±0	5,0	n.t.	30,0	n.t.	25,0	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	19,0±1,0	21,5±1,5	9,0	n.t.	n.t.	21,0	50,0	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	22,5±1,5	23,5±0,5	9,0	n.t.	n.t.	22,5	25,0	15,0

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

Etarsko ulje ispoljava visoku antifungalnu aktivnost prema testiranom soju *C. albicans* ATCC 10259 i *C. albicans* ATCC 24433. U obe primenjene koncentracije (2% i 4% rastvori), etarsko ulje *M. longifolia* pokazuje 90,5% i 102,4% od aktivnosti nistatina prema *C. albicans* ATCC 10259, odnosno 100,0% i 104,5% aktivnosti nistatina prema *C. albicans* ATCC 24433, respektivno.

Aktivnost ekstrakta herbe *M. longifolia* na bakterije je u manjoj meri izražena. Rastvori ispoljavaju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakteriji *M. flavus* (125,0% aktivnosti ampicilina). Aktivnost ekstrakta prema *E. faecalis* u poređenju sa ampicilinom je umerena (56,3% aktivnosti ampicilina). Ispitivani ekstrakti pokazuju slabiju antifungalnu aktivnost prema standardnim sojevima gljivica *C. albicans* 10259 i *C. albicans* 24433.

Na osnovu rezultata MIC testa može se zaključiti da su najveću osetljivost na etarsko ulje *M. longifolia* normalno sušenoj pokazali sledeći bakterijski sojevi: *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*. Za pomenute bakterijske sojeve MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 1,56–12,5 µl/ml. Znatno veću rezistentnost pokazali su bakterijski sojevi: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. flavus*, *P. aeruginosa* i *E. coli* gdje je MIC konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 25,0–50,0 µl/ml. Pri koncentracijama ekstrakta od 0,81 do 1,62 mg/ml ispitivanjem dilucionom metodom, ekstrakt je inaktivirao bakterijske sojeve *M. luteus*, *M. flavus*, *S. aureus* i *S. epidermidis*. MIC ekstrakta za Gram negativne bakterije i gljivice kretao se od 7,5 do 15,0 mg/ml.

Tabela 37. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *M. longifolia* sušenoj u laboratorijskoj sušari

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC	MIC
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	(µl/ml) Eu ^c	(mg/ml) Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	20,0±0	25,0±0	0	33,0	31,0	n.t.	6,25	0,81
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	20,0±0	21,5±0,5	12,0	36,0	n.t.	n.t.	25,0	1,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20,0±0	23,0±0	0	26,0	25,0	n.t.	50,0	3,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	24,0±0,5	28,5±1,5	0	12,0	33,0	n.t.	50,0	1,62
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	17,0±0	19,5±0,5	9,0	16,0	23,0	n.t.	6,25	7,5

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	18,5±1,5	17,0±0	12,0	15,0	32,0	n.t.	1,56	7,5
Gram (–) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19,5±1,5	21,5±1,5	7,0	18,0	30,0	n.t.	25,0	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	21,5±1,5	21,0±0	6,0	23,0	25,0	n.t.	25,0	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,5±0,5	17,0±1,0	9,0	n.t.	30,0	n.t.	50,0	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	17,5±2,5	23,0±1,0	10,0	n.t.	n.t.	21,0	50,0	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	19,5±0,5	25,5±0,5	13,0	n.t.	n.t.	22,5	25,0	7,5

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

Kao i u prethodnom slučaju u poređenju sa standardnim antibioticima (ampicilin i amikacin), 2% i 4% rastvori etarskog ulja *M. longifolia* sušenoj u laboratorijskoj sušari pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakterijama. Etarsko ulje je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (200,0%, odnosno 237,5% aktivnosti ampicilina), *B. subtilis* (123,3%, odnosno 113,3% aktivnosti ampicilina) i *E. faecalis* (106,3%, odnosno 121,9% aktivnosti ampicilina, respektivno). Etarsko ulje je manje aktivno prema Gram (–) bakterijama. Međutim aktivnost ulja prema *E. coli*, takođe je značajna u poređenju sa ampicilinom (108,3%, odnosno 119,4% njegove aktivnosti), kao i prema *K. pneumoniae* u poređenju sa ampicilinom (93,5%, odnosno 91,3% njegove aktivnosti) i amikacinom (86,0%, odnosno 84,0% njegove aktivnosti, respektivno). Etarsko ulje ispoljava visoku antifungalnu aktivnost prema testiranim sojevima. Najaktivniji je 4% rastvor etarskog ulja prema *C. albicans* ATCC 10259 i *C. albicans* ATCC 24433 (109,5%, odnosno 113,3% aktivnosti nistatina, respektivno).

Ekstrakt herbe *M. longifolia* sušenoj u laboratorijskoj sušari pokazuje najveću aktivnost prema Gram (+) bakteriji *M. flavus* (100,0% od aktivnosti ampicilina) i umerenu aktivnost prema Gram (+) bakteriji *E. faecalis* (56,3% od aktivnosti ampicilina). Na osnovu rezultata MIC testa može se zaključiti da su najveću osetljivost na etarsko ulje *M. longifolia* pokazali sledeći bakterijski sojevi: *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*. Za pomenute bakterijske sojeve MIC je konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 1,56-6,25 µl/ml. Znatno veću rezistentnost pokazali su bakterijski sojevi: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *E. coli* gdje je MIC

konstatovan pri koncentraciji etarskog ulja od 25-50 μ l/ml. MIC ekstrakta ispitivane herbe se kretao od 0,81 do 7,5 mg/ml.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja herbe *M. longifolia* Huds. sušenoj u niskotemperaturnoj sušari dati su u tabeli 38.

Tabela 38. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *M. longifolia* sušenoj u niskotemperaturnoj sušari

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC (μ l/ml)	MIC (mg/ml)
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	Eu ^c	Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	24,5 \pm 0,5	27,5 \pm 2,5	0	33,0	31,0	n.t.	12,5	0,81
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	16,0 \pm 0	20,0 \pm 0	0	36,0	n.t.	n.t.	50,0	1,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17,5 \pm 2,5	28,5 \pm 1,5	0	26,0	25,0	n.t.	50,0	1,62
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	20,0 \pm 0	26,0 \pm 1,0	9	12,0	33,0	n.t.	25,0	1,62
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	18,0 \pm 2,0	25,0 \pm 0	12	16,0	23,0	n.t.	12,5	15,0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	21,5 \pm 3,5	27,5 \pm 0,5	0	15,0	32,0	n.t.	3,12	7,5
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20,5 \pm 0,5	29,0 \pm 1,0	0	18,0	30,0	n.t.	25,0	7,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	28,5 \pm 1,5	32,0 \pm 0	0	23,0	25,0	n.t.	6,25	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,5 \pm 0,5	18,5 \pm 0,5	10,0	n.t.	30,0	n.t.	25,0	7,5
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	20,0 \pm 0	24,5 \pm 0,5	10,0	n.t.	n.t.	21,0	50,0	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	18,0 \pm 2,0	26,0 \pm 0	11,0	n.t.	n.t.	22,5	50,0	7,5

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

U poređenju sa standardnim antibioticima (ampicilin i amikacin), 2% i 4% rastvori etarskog ulja pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakterijama. Etarsko ulje je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (166,7%, odnosno 216,7% aktivnosti ampicilina) i *B. subtilis* (143,3%, odnosno 183,3% aktivnosti ampicilina, respektivno). Aktivnost ulja prema *E. faecalis* takođe je značajna u poređenju sa ampicilinom (112,5%, odnosno 156,3% njegove aktivnosti) i amikacinom (78,3%, odnosno 108,7% njegove aktivnosti, respektivno). Kada je u pitanju standardni antibiotik amikacin 2% i 4% rastvori etarskog ulja nisu

pokazali antibakterijsku aktivnost prema *M. flavus*. Etarsko ulje je manje aktivno prema Gram (–) bakterijama u odnosu na Gram (+) bakterije, ali je i u navedenom slučaju aktivnost ulja prema *E. coli* značajna u poređenju sa ampicilinom (113,9%, odnosno 161,1% njegove aktivnosti). Aktivnost ulja prema *K. pneumoniae*, takođe je značajna u poređenju sa ampicilinom (123,9%, odnosno 139,1% njegove aktivnosti) i amikacinom (114,0%, odnosno 128,0% njegove aktivnosti, respektivno). Etarsko ulje ispoljava visoku antifungalnu aktivnost prema testiranim sojevima *C. albicans*. Najaktivniji je 4% rastvor etarskog ulja prema *C. albicans* ATCC 10259 i *C. albicans* ATCC 24433 (116,7%, odnosno 115,6% aktivnosti nistatina, respektivno). Aktivnost ekstrakta prema *E. faecalis* u poređenju sa ampicilinom i amikacinom je umerena i međusobno vrlo slična (75,0% aktivnosti ampicilina, odnosno 52,2% aktivnosti amikacina, respektivno). Ekstrakti, takođe, poseduju antifungalnu aktivnost. Najveću aktivnost ekstrakt herbe pokazuje prema *C. albicans* 24433 (52,4% aktivnosti nistatina). Etanolni ekstrakt *M. longifolia* sušene u niskotemperaturnoj sušari pokazao je najslabije antibakterijsko dejstvo. Minimalne inhibitorne koncentracije etarskog ulja protiv bakterija i gljivica se kreću od 3,12–50,0 µl/ml. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta protiv bakterija i gljivica se kreću od 0,81-15,0 mg/ml.

Najjače antibakterijsko dejstvo ekstrakti *M. longifolia* L. sušene prirodnim putem i u laboratorijskoj sušari su ispoljili na sojeve: *S. epidermidis*, *E. faecalis* i *B. subtilis*. Ovo se može objasniti činjenicom da se radi o gram-pozitivnim bakterijama kroz čiji ćelijski zid hidrofilni ekstrakti lakše difunduju za razliku od gram-negativnih bakterija.

Značajno je naglasiti da ekstrakti sve tri mente nisu pokazali bakteriostatičko dejstvo na, inače jako rezistentnom soju, *P. aeruginosa*. Utvrđeno je da etarska ulja divlje nane sušene na različite načine ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na sve testirane sojeve, osim na bakteriju *M. flavus* u poređenju sa amikacinom i *P. aeruginosa* u poređenju sa ampicilinom. Gram-pozitivne bakterije osetljivije su na etarska ulja od gram-negativnih bakterija u sva tri slučaja. Značajna je antimikrobna aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija posebno *S. epidermidis*. Kada su u pitanju gram-negativne bakterije etarska ulja nane sušene na sva tri načina su pokazala snažnu antibakterijsku aktivnost protiv *E. coli* u poređenju sa ampicilinom.

Dobijeni rezultati su, uglavnom, u skladu sa rezultatima koji se mogu naći u dostupnoj referentnoj literaturi i koji potvrđuju da su gram (+) bakterije osetljivije na

biljna ulja od gram (-) bakterija (Cosentino *et al.*, 1999, Karaman *et al.*, 2003, Sahin *et al.*, 2002). Za veliki broj etarskih ulja se zna da poseduju antimikrobna svojstva i da je u mnogim slučajevima ova aktivnost posledica prisustva različitih klasa monoterpena (Bakkali *et al.*, 2008), što je i u ovom ispitivanju potvrđeno. Ovaj rezultat se može objasniti visokim sadržajem piperitona (50,84%, 43,05% i 71,71%), karvona, (20,03%, 2,85%, 4,97%), 1,8-cineola (3,94%, 3,56%, 3,50%) i limonena (6,27%, 1,59% i 2,36%) u etarskom ulju *M. longifolia* (Stanisavljević *et al.*, 2010). Antibakterijske i antifungalne aktivnosti ovih supstanci su iskazane u prethodnim studijama (Karaman *et al.*, 2003; Sahin *et al.*, 2002).

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakta i etarskog ulja herbe *H. officinalis* prema standardnim mikroorganizmima dati su tabelom 39.

Tabela 39. Antimikrobna aktivnost ekstrakta i etarskog ulja *H. officinalis*

Mikroorganizmi	Zona inhibicije (mm) ^a						MIC (µl/ml)	MIC (mg/ml)
	Eu ^b 2%	Eu ^b 4%	Eks ^c	AMP	AMK	N	Eu ^c	Eks ^c
Gram (+) bakterije								
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	19,0±0	19,5±0,5	0	33,0	31,0	n.t.	6,25	3,25
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	22,5±2,5	23,5±2,5	12	36,0	n.t.	n.t.	25,0	1,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21,0±3,0	27,0±0	0	26,0	25,0	n.t.	50,0	3,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	24,5±0,5	25,5±0,5	0	12,0	33,0	n.t.	50,0	1,62
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	21,5±0,5	22,5±0,5	9	16,0	23,0	n.t.	12,5	3,25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,0±0	12,0±0	0	15,0	32,0	n.t.	3,12	1,62
Gram (-) bakterije								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19,0±1,0	25,0±1,0	0	18,0	30,0	n.t.	12,5	3,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	26,0±2,0	27,0±1,0	0	23,0	25,0	n.t.	25,0	3,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	17,0±1,5	18,0±0	6,0	n.t.	30,0	n.t.	50,0	3,25
Gljivice								
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	22,0±2,0	23,0±1,5	10,0	n.t.	n.t.	21,0	25,0	1,62
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	27,0±1,5	28,0±2,0	14,0	n.t.	n.t.	22,5	12,5	1,62

^a Prosečne vrednosti, ^b % (v/v) u apsolutnom etanolu, ^c DMSO, n.t. = nije testirano

U poređenju sa standardnim antibioticima (ampicilin i amikacin), 2% i 4% rastvori etarskog ulja *H.officinalis* pokazuju najveću antibakterijsku aktivnost prema Gram (+) bakterijama. Etarsko ulje je u obe primenjene koncentracije (2% i 4%) bilo najaktivnije prema *S. epidermidis* (204,2%, odnosno 212,5% aktivnosti ampicilina) i *E. faecalis* (134,4%, odnosno 140,6% aktivnosti ampicilina, respektivno). Najveću osetljivost prema etarskom ulju *H. officinalis* ispoljavaju Gram (-) bakterije *K. pneumoniae* (113,0%, odnosno 117,4% aktivnosti ampicilina) i *E. coli* (105,6% i 138,9% aktivnosti ampicilina). Etarsko ulje ispoljava visoku antifungalnu aktivnost prema testiranim sojevima *C. albicans* ATCC 10259 (104,8% i 109,5% aktivnosti nistatina) i *C.albicans* ATCC 24433 (120,0% i 124,4% aktivnosti nistatina).

Što se tiče ekstrakta *H.officinalis* kada je u pitanju antimikrobna aktivnost ista je prilično manja u odnosu na etarska ulja. Aktivnost ekstrakta prema *M. flavus* je izražena i iznosi 100,0% aktivnosti ampicilina. Ispitivani ekstrakt pokazuje umerenu antifungalnu aktivnost prema testiranom soju *C.albicans* 24433, odnosno 66,7% aktivnosti nistatina. Takođe, etarska ulja pokazala su veći antimikrobni potencijal prema sojevima Gram pozitivnih bakterija, u odnosu na Gram negativne, što se objašnjava prisustvom spoljašnje i plazmalne membrane kod Gram negativne bakterije, pri čemu spoljašnja membrana verovatno predstavlja barijeru za ispoljavanje antimikrobnog efekta etarskih ulja.

Etarsko ulje je delovalo na sve testirane sojeve u intervalu od 3,12–50,0 µl/ml MIC-a. MIC ekstrakta ispitivane herbe se kretao od 1,62 do 3,25 mg/ml.

3.3.12. Karakterizacija formulisanih gotovih proizvoda

Nakon izvršenih hemijskih i bioloških ispitivanja etanolno-vodenih ekstrakata i etarskih ulja odabrali smo kvalitetniji izolat koji smo testirali za moguću primenu u izradi **bezalkoholnih i alkoholnih pića**.

Rezultati pokazuju da ispitivani izolati poseduju značajnu antioksidantnu aktivnost. Najveću antioksidantnu aktivnost ispoljavaju ekstrakti, a zatim etarska ulja, što je i očekivano pa su se isti koristili u daljim ispitivanjima, odnosno u izradi gotovog proizvoda koji se kao takav testirao na senzorne karakteristike i antioksidantnu aktivnost.

3.3.12.1. Senzorna ocena kvaliteta gotovih proizvoda

Ocena senzornog kvaliteta pića je data u tabelama 40-49.

Senzorna ocena ledenog čaja sa ekstraktom čubra

Rezultati senzorne ocene kvaliteta ispitivanih uzoraka ledenog čaja sa različitim koncentracijama ekstrakta čubra prikazani su u tabeli 40.

Tabela 40. Senzorna ocena kvaliteta ledenog čaja sa ekstraktom čubra

Redni broj uzorka	Koncentracija ekstrakta čubra (g/l)	Boja Max. 4	Homogenost Max. 4	Miris Max. 5	Ukus Max. 7	Ukupno Max.20
1.	0,5	3,00	3,21	3,25	5,20	14,66
2.	0,75	3,30	3,36	3,60	5,70	15,96
3.	1,0	3,45	3,43	3,96	5,96	16,80
4.	1,25	3,40	3,38	3,75	5,85	16,38
5.	1,5	3,25	3,30	3,55	5,55	15,65

Rezultati iz tabele 40 pokazuju da je prosečna senzorna ocena odabranog uzorka pod rednim brojem 3 značajno bolja od prosečnih ocena svih drugih uzoraka. Ovaj uzorak je oplemenjen ekstraktom čubra u koncentraciji od 1,00 g/l, svetlo-zelene je boje i bistar. Tipičnog je prijatnog mirisa, harmoničnog ukusa sa jedva primetnim raslojavanjem. Osvojio je 16,80 poena što je 84,00% od od maksimalno mogućeg kvaliteta.

Osnovni statistički parametri za njegova senzorna svojstva su prikazani tabelom 41 i histogramom (slika 37).

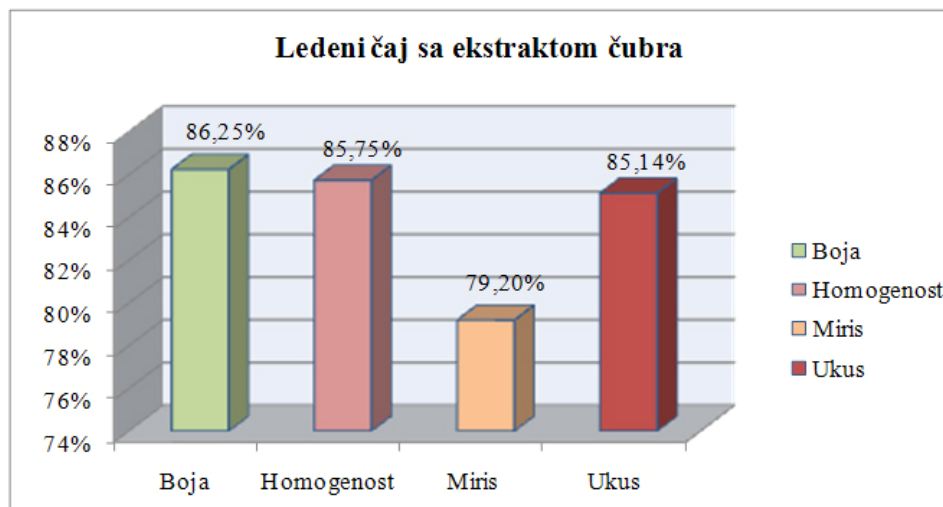
Tabela 41. Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva ledenog čaja sa ekstraktom čubra

Senzorni parametri	Srednja vrednost	Min.	Max.	V	SD	KV	SG
Boja	3,45	3,0	4,0	0,164	0,405	11,74	0,105
Homogenost	3,43	3,0	3,8	0,052	0,228	6,65	0,059
Miris	3,96	3,4	4,8	0,225	0,475	11,99	0,123
Ukus	5,96	5,6	6,4	0,075	0,275	4,61	0,071

V - varijansa, SD - standardna devijacija, KV - koeficijent varijacije, SG - standardna greška

Najveći koeficijent varijacije je zabeležen kod procene boje i mirisa (11,74 i 11,99), a najmanji kod numerizacije kvaliteta ukusa (4,61).

Ocena senzornog kvaliteta Ledenog čaja sa dodatkom čubra je prikazana histogramom (slika 37).



Slika 37. Odnos postignutih senzornih ocena u odnosu na idealni kvalitet

Od maksimalno mogućih 5 poena ledeni čaj sa ekstraktom čubra za miris je dobio $\bar{x}=3,96$, što je 79,20% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Najveću pojedinačnu ocenu ($\bar{x}=3,45$) uzorak je dobio za boju - što je 86,25% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Za homogenost (bistrinu) dobio je prosečnu ocenu $\bar{x}=3,43$, što je 85,75% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Svojtvo analiziranog parametra kvaliteta – ukus od maksimalnih 7 dobilo je $\bar{x}=5,96$ poena što je 85,14% od idealne vrednosti.

Očigledno je da najbolje ocenjeni uzorak ledenog čaja relativno dobro zadovoljava ukus, boju i opšti izgled, ali nije najbolje prihvaćen sa stanovišta mirisa. Međutim, pojedini ocenjivači su dali i za ovaj parametar visoke ocene što može da ukaže pre svega na nerazumevanje mirisa, na njegovo neprepoznavanje kod ocenjivača. Sa dobrim marketingom i pre svega edukacijom potrošača može se očekivati da i ovakav proizvod bude bolje prihvaćen.

Senzorna ocena ledenog čaja sa ekstraktom vranilove trave

Rezultati senzorne ocene kvaliteta ledenog čaja sa dodatkom ekstrakta vranilove trave dati su u tabeli 42.

Tabela 42. Senzorna ocena kvaliteta ledenog čaja sa ekstraktom vranilove trave

Redni broj uzorka	Koncentracija ekstrakta vranilove trave (g/l)	Boja Max. 4	Homogenost Max. 4	Miris Max. 5	Ukus Max. 7	Ukupno Max.20
1.	0,5	3,00	2,65	4,45	5,25	15,35
2.	0,75	3,25	2,80	4,65	5,60	16,30
3.	1,0	3,41	3,00	4,82	5,92	17,15
4.	1,25	3,35	2,90	4,80	5,70	16,75
5.	1,5	3,20	2,75	4,60	5,55	16,10

Uzorak pod rednim brojem 3 u kome je dodat ekstrakt vranilove trave u koncentraciji 1,00 g/l poseduje intenzivnu svetlo-braon boju, izrazito je prijatnog mirisa, harmoničnog je ukusa i pokazuje jedva primetnu nestabilnost (raslojavanje). Ocenjen je kao najbolji sa 17,15 poena, što je 85,75% od maksimalne vrednosti.

Osnovni statistički parametri za njegova senzorna svojstva su prikazani tabelom 43 i histogramom (slika 38).

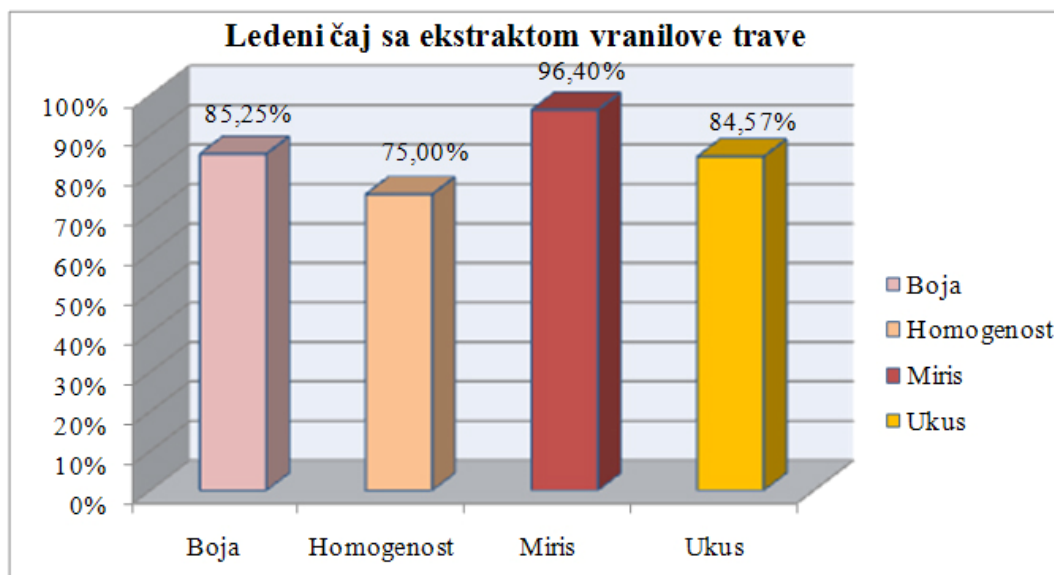
Tabela 43. Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva najbolje ocenjenog ledenog čaja sa ekstraktom vranilove trave

Senzorni parametri	Srednja vrednost	Min.	Max.	V	SD	KV	SG
Boja	3,41	3,0	3,9	0,126	0,354	10,38	0,091
Homogenost	3,00	2,5	3,5	0,107	0,327	10,90	0,084
Miris	4,82	4,2	5,0	0,060	0,246	5,10	0,064
Ukus	5,92	5,3	6,5	0,145	0,380	6,42	0,098

V - varijansa, SD - standardna devijacija, KV - koeficijent varijacije, SG - standardna greška

Najveći koeficijent varijacije kod ovog uzorka je ostvaren kod ocenjivanja boje i homogenosti. Pri ocenjivanju mirisa pića ocenjivači su imali najmanje dilema i suprotstavljenih mišljenja. To se može videti i na histogramu sa slike 38.

Ocena senzornog kvaliteta Ledenog čaja sa dodatkom **vranilove trave** je prikazana histogramom (slika 38).



Slika 38. Odnos postignutih senzornih ocena u odnosu na idealni kvalitet

Iako je odabrani ledeni čaj iz grupe analiziranih sa najboljim karakteristikama, isti još uvek ima izvesnih nedostataka koje treba otkloniti.

Kod ovog uzorka je bolje ocenjena prihvatljivost mirisa, a što je i za očekivanje, najniže je procenjena prihvatljivost opšteg izgleda (homogenost tj. opalescentnost rastvora).

Ocena za boju ovog ledenog čaja iznosi 85,25% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Uzorak je najnižu pojedinačnu ocenu ($\bar{X}=3,00$) dobio za senzorno svojstvo kvaliteta – homogenost - što je 75,00% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Prosečna ocena za miris ovog uzorka značajno je bolja od prosečne ocene prethodnog uzorka ledenog čaja i iznosila je 96,40% od maksimalno moguće. Od maksimalne ocene 7 za ukus dobio je $\bar{X}=5,92$ što je 84,57% od maksimalne idealne vrednosti 100%.

Senzorna ocena sirupa sa ekstraktom majkine dušice

Rezultati senzorne ocene kvaliteta ispitivanog uzorka sirupa sa različitim koncentracijama ekstrakta majkine dušice prikazani su u tabeli 44.

Tabela 44. Senzorna ocena kvaliteta sirupa sa ekstraktom majkine dušice

Redni broj uzorka	Koncentracija ekstrakta majkine dušice (g/l)	Boja Max. 4	Homogenost Max. 4	Miris Max. 5	Ukus Max. 7	Ukupno Max.20
1.	1,0	3,15	3,30	4,25	4,50	15,20
2.	2,0	3,30	3,40	4,35	4,60	15,65
3.	3,0	3,40	3,45	4,40	4,70	15,95
4.	4,0	3,53	3,69	4,64	5,24	17,10
5.	5,0	3,45	3,55	4,52	4,80	16,32

Najbolje se pokazao sirup sa dodatkom ekstrakta majkine dušice u koncentraciji (4,0 g/l). Na osnovu rezultata iz tabele se vidi da je prosečna senzorna ocena odabranog uzorka pod rednim brojem 4 značajno bolja od prosečnih ocena svih drugih uzoraka. Uzorak sirupa sa dodatim ekstraktom majkine dušice u koncentraciji od 4,00 g/l osvojio je 17,10 poena što je 85,50% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Ovaj uzorak pripremljen dodatkom ekstrakta herbe majkine dušice karakterišu sledeća svojstva: tipična intenzivna boja, izrazito prijatan miris, tipičan ukus, potpuna ujednačenost. U sirupu nije bilo pojave taloga ili kristalizacije šećera.

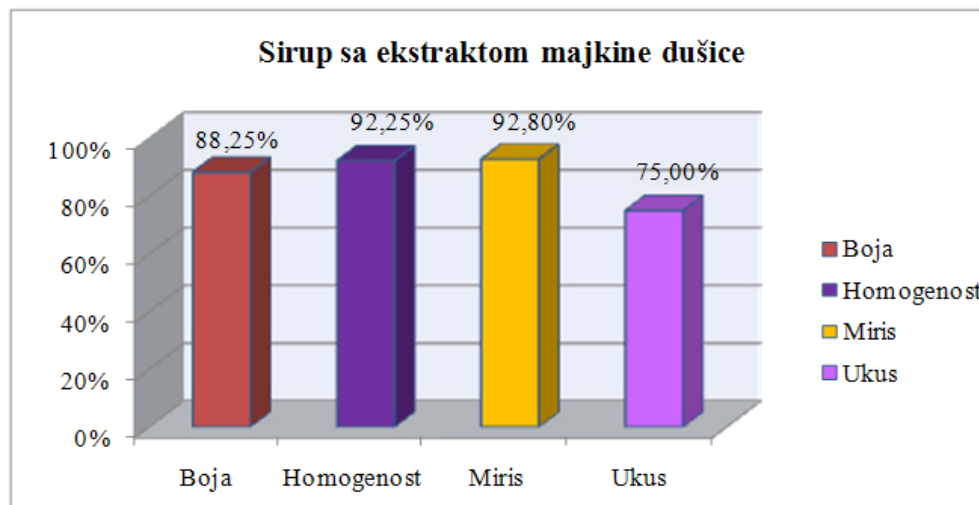
Najbolje ocenjeni proizvod je dobro prihvaćen od strane svih ocenjivača, a izračunate vrednosti osnovnih statističkih parametara za senzorna svojstva odabranog proizvoda su date tabelom 45 i histogramom (slika 39).

Tabela 45. Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva sirupa sa ekstraktom majkine dušice

Senzorni parametri	Srednja vrednost	Min.	Max.	V	SD	KV	SG
Boja	3,53	3,1	4,0	0,088	0,297	8,41	0,077
Homogenost	3,69	3,3	4,0	0,056	0,237	6,42	0,061
Miris	4,64	4,1	5,0	0,114	0,338	7,28	0,087
Ukus	5,24	4,5	6,0	0,323	0,568	10,84	0,147

V - varijansa, SD - standardna devijacija, KV - koeficijent varijacije, SG - standardna greška

Ocenjivači su najviše pokazali nejedinstvo pri oceni ukusa kada je koeficijent varijacije bio 10,84, ali su dosta bili usaglašeni pri oceni stabilnosti sirupa.



Slika 39. Odnos postignutih senzornih ocena u odnosu na idealni kvalitet

Iako je najbolje ocenjen, ovaj uzorak sirupa još uvek ima nekih nedostataka koje treba otkloniti. Pre svega je dobio mali broj poena za senzorno svojstvo kvaliteta – ukus. Dobijena ocena za ukus $\bar{X}=5,24$ (od maksimalne 7) je ustvari 75,00% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Senzorna svojstva kvaliteta – boja, homogenost i miris su ocenjeni značajno višom ocenom u odnosu na analizirani parametar – ukus i iznosile su 88,25% - boja, 92,25%-homogenost i 92,80%-miris od od maksimalno mogućeg kvaliteta.

Senzorna ocena soka sa ekstraktom divlje nane

Kod soka smo imali pet uzoraka sa različitim koncentracijama ekstrakta herbe divlje nane. Rezultati pokazuju da ekstrakt herbe *M. longifolia* sušene prirodnim putem generalno poseduje najbolje karakteristike u odnosu na ostala dva, pa se isti i koristio u pripremi gotovog proizvoda. Zbirna senzorna ocena kvaliteta soka data je u tabeli 46.

Tabela 46. Senzorna ocena kvaliteta soka sa ekstraktom divlje nane

Redni broj uzorka	Koncentracija ekstrakta divlje nane (g/l)	Boja Max. 4	Homogenost Max. 4	Miris Max. 5	Ukus Max. 7	Ukupno Max. 20
1.	0,6	2,90	3,25	3,20	5,35	14,70
2.	0,7	3,20	3,70	3,70	5,45	16,05
3.	0,8	3,49	3,61	4,21	5,94	17,25
4.	1,0	3,35	3,80	3,85	5,50	16,50
5.	1,2	3,10	3,55	3,40	5,40	15,45

Na osnovu rezultata iz tabele vidi se da je uzorak soka sa dodatkom ekstrakta divlje nane u koncentraciji od 0,8 g/l značajno bolji od ostalih ispitivanih uzoraka. Uzorak oplemenjen ekstraktom u ovoj koncentraciji osvojio je 17,25 poena što je 86,25% od maksimalne idealne vrednosti 100%.

Najbolje ocenjeni proizvod je dobro prihvaćen od strane svih 15 ocenjivača. Sok pripremljen od pomenute herbe je prijatne svetlo-žute boje i homogen. Harmoničnog je ukusa, tipičnog, prijatnog mirisa.

Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva negaziranog osvežavajućeg bezalkoholnog pića (soka) napravljenog od herbe *M. longifolia* dat je u tabeli 47.

Tabela 47. Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva soka sa ekstraktom divlje nane

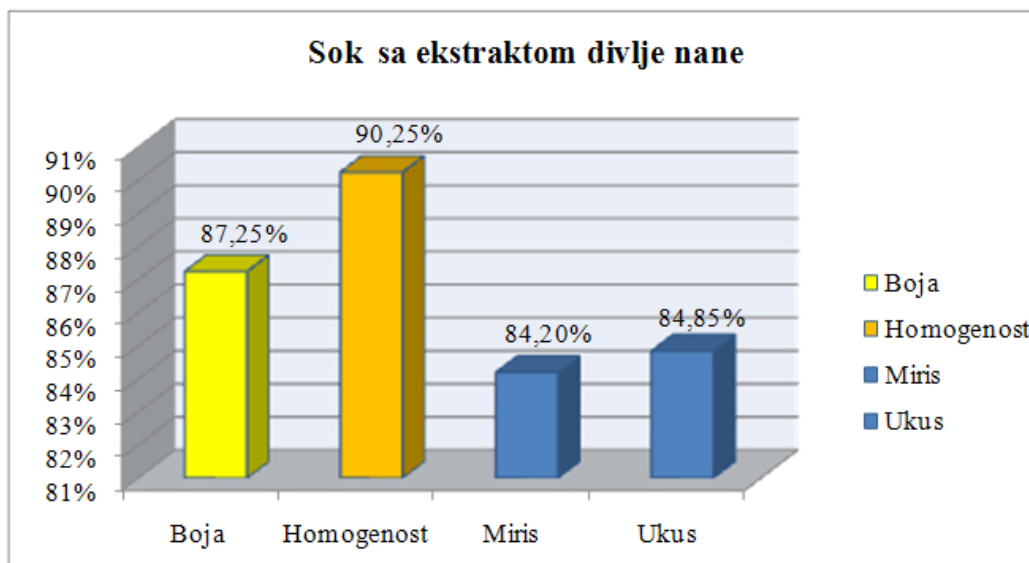
Senzorni parametri	Srednja vrednost	Min.	Max.	V	SD	KV	SG
Boja	3,49	3,1	4,0	0,087	0,295	8,45	0,076
Homogenost	3,61	3,2	4,0	0,054	0,233	6,45	0,060
Miris	4,21	3,5	5,0	0,334	0,578	13,73	0,149
Ukus	5,94	5,4	6,4	0,071	0,267	4,49	0,069

V - varijansa, SD - standardna devijacija, KV - koeficijent varijacije, SG - standardna greška

Koeficijent varijacije je vrednosti od 4,49 do 13,73. Ocenjivači su najviše pokazali nejedinstvo pri oceni mirisa kada je koeficijent varijacije bio 13,73, ali su dosta bili usaglašeni pri oceni ukusa soka.

Ocena senzornog kvaliteta soka sa dodatkom divlje nane je prikazana histogramom (slika 40).

U kategoriji ocenjivanih najbolji je od prisutnih, ali i kod njega ima izvesnih nedostataka koje treba otkloniti. Najveću pojedinačnu ocenu ($\bar{X}=3,61$) dobio je za senzorno svojstvo kvaliteta - homogenost - što je 90,25% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Boja kao analizirani pokazatelj senzornog kvaliteta proizvoda je dobila ocenu $\bar{X}=3,49$ od maksimalno moguće 4, što je 87,25% od maksimalno mogućeg kvaliteta. Senzorna svojstva kvaliteta - miris i ukus, za analizirani proizvod su dobila $\bar{X}=4,21$ i $\bar{X}=5,94$ poena od maksimalno mogućih 5 i 7 poena, tj. 84,20% za miris i 84,85% za ukus od maksimalno mogućeg kvaliteta.



Slika 40. Odnos postignutih senzornih ocena u odnosu na idealni kvalitet

Uzimajući u obzir ocene analiziranih parametara senzornog kvaliteta proizvoda ledeni čaj sa dodatkom vranilove trave i negazirano osvežavajuće bezalkoholno piće (sok) napravljeno od herbe *M. longifolia* može se predložiti za dalju komercijalnu upotrebu.

Senzorna ocena likera sa ekstraktom rudinskog pelena

Sastojci ekstrakta i seskviterpenska jedinjenja prisutna u herbi pelena su gorkog ukusa, zbog čega se proverila i pogodnost za dobijanje specifičnih pića za uživanje, kao što je liker (Stanisavljević *et al.*, 2012). Liker je oplemenjen ekstraktom u količini koja zadovoljava senzorne karakteristike.

Kod likera smo imali pet uzoraka sa različitim koncentracijama herbe rudinskog pelena. Rezultati senzorne ocene kvaliteta ispitivanog uzorka sa dodatkom ekstrakta pelena prikazani su u tabeli 48.

Najbolje se pokazao liker sa dodatkom ekstrakta rudinskog pelena u koncentraciji (1,0 g/l). Koncentracija ekstrakta se pokazala senzorno najprihvatljivijom jer se zbog dobro ukomponovane gorčine i prijatnog mirisa najbolje uklopila u senzorne karakteristike ovog proizvoda.

Tabela 48. Senzorna ocena kvaliteta likera sa ekstraktom rudinskog pelena

Redni broj uzorka	Koncentracija ekstrakta pelena (g/l)	Bistrina Max. 1	Boja Max. 1	Tipičnost Max 2	Miris Max 6	Ukus Max.10	Ukupno Max.20
1.	0,50	0,85	0,70	1,00	3,85	7,80	14,20
2.	0,75	0,90	0,85	1,30	4,20	8,65	15,90
3.	1,00	0,97	0,95	1,50	4,43	9,19	17,04
4.	1,25	0,95	0,90	1,40	4,35	8,85	16,45
5.	1,50	0,85	0,80	1,20	4,15	8,55	15,55

Na osnovu rezultata iz tabele se vidi da je prosečna senzorna ocena odabranog uzorka pod rednim brojem 3 značajno bolja od prosečnih ocena svih drugih uzoraka. Uzorak oplemenjen ekstraktom u koncentraciji od 1,00 g/l osvojio je 17,04 poena što je 85,20% od maksimalne idealne vrednosti. Dobijeni rezultati ukazuju da je najbolje ocenjeni proizvod dobro prihvaćen od strane svih 15 ocenjivača. Ovaj liker je svetlo-slamaste žute boje i bistar. Miris je aromatičan i diskretan, a ukus je pun i harmoničan sa naknadnim (retronazalnim) ukusom blage gorčine.

Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva likera dati su u tabeli 49.

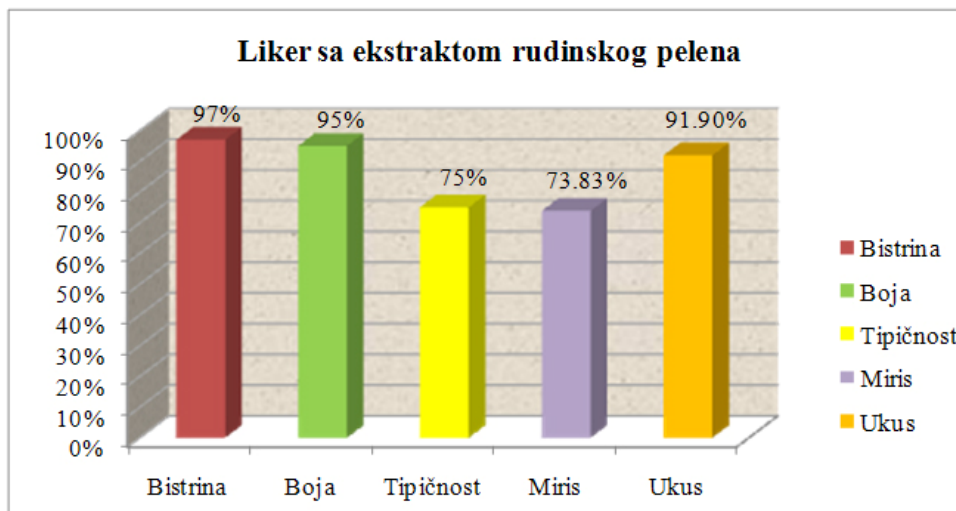
Tabela 49. Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva likera sa ekstraktom rudinskog pelena

Senzorni parametri	Srednja vrednost	Min.	Max.	V	SD	KV	SG
Bistrina	0,97	0,9	1,00	0,002	0,049	5,05	0,013
Boja	0,95	0,8	1,00	0,006	0,074	7,79	0,019
Tipičnost	1,50	1,00	2,00	0,143	0,378	25,2	0,098
Miris	4,43	4,00	5,00	0,118	0,344	7,77	0,089
Ukus	9,19	8,00	9,60	0,177	0,421	4,58	0,109

V - varijansa, SD - standardna devijacija, KV - koeficijent varijacije, SG - standardna greška

Varijabilitet dodeljenih ocena kvantifikovan preko koeficijenta varijacije pokazuje da je najveći koeficijent varijacije zabeležen kod procene tipičnosti (25,2), a najmanji kod numerizacije kvaliteta ukusa (4,58).

Ocena senzornog kvaliteta likera sa dodatkom rudinskog pelena je prikazana i histogramom (slika 41).



Slika 41. Odnos postignutih senzornih ocena u odnosu na idealni kvalitet

Iako je najbolji od prisutnih, on još uvek ima nekih nedostataka koje treba otkloniti. Pre svega je dobio mali broj poena za miris (73,83% od maksimalno mogućeg kvaliteta). Od maksimalne ocene 2 za tipičnost dobio je $\bar{X}=1,5$ što je 75% od idealne vrednosti. Vrednosti dobijene za parametre bistrina, boja i ukus su bile preko 90%, odnosno približne idealnim za ovu vrstu pića.

3.3.12.2. Hemijska analiza gotovih proizvoda

Rezultati ispitivanih parametara kvaliteta gotovog proizvoda dati su u tabeli 50.

Tabela 50. Parametri kvaliteta gotovog proizvoda

Gotov proizvod	Suva materija %	Indeks refrakcije	Sadržaj etanola v/v (%)
Ledeni čaj sa ekstraktom čubra	6,5	1,3440	0,13
Ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave	7,0	1,3450	0,12
Sirup sa ekstraktom majkine dušice	66,1	1,4456	0,4
Sok sa ekstraktom divlje nane	13,9	1,3454	0,13
Liker sa ekstraktom rudinskog pelena	16,3	1,3458	28,18

Kao što se može videti iz prikazane tabele 50 gotovi proizvodi ispunjavaju zahteve kvaliteta propisane navedenim Pravilnicima.

3.3.12.3. Ukupna fenolna jedinjenja i flavonoidi gotovih proizvoda

Kako se smatra da antioksidantna aktivnost gotovog proizvoda u velikoj meri zavisi od ukupnog sadržaja fenolnih i flavonoidnih komponenti, prirodnih proizvoda sa velikim antioksidantnim potencijalom, odredili smo njihov ukupni sadržaj i rezultate prikazali tabelom 51.

Tabela 51. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida gotovog proizvoda ^{a,b}

Gotov proizvod	Ukupni fenoli, mg GK/ml pića	Ukupni flavonoidi, mg rutina/ml pića
Ledeni čaj sa ekstraktom čubra	0,640±0,016 b	0,235±0,002 b
Ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave	1,010±0,020 c	0,497±0,005 c
Sirup sa ekstraktom majkine dušice	0,458±0,007 a	0,340±0,006 d
Sok sa ekstraktom divlje nane	0,536±0,007 d	0,398±0,007 e
Liker sa ekstraktom rudinskog pelena	0,460±0,019 a	0,435±0,003 a

^a Vrednosti prikazane u tabeli date su u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

^b Različitim slovima u koloni su obeležene vrednosti koje se značajno razlikuju (p<0,05, Scheffé test)

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u gotovim proizvodima, pripremljenim kao što je opisano u poglavlju 3.2.7., prikazani su u tabeli 51.

Sadržaj ukupnih fenola u gotovim proizvodima se kretao od 0,458 do 1,010 mg galne kiseline/ml pića, pri čemu Ledeni čaj - vranilova trava karakteriše najveći sadržaj ukupnih fenola.

Sadržaj ukupnih flavonoida u gotovim proizvodima se kretao od 0,235 do 0,497 mg rutina/ml pića, pri čemu je Ledeni čaj - vranilova trava bio najbogatiji flavonoidima, dok je Ledeni čaj - čubar imao najmanji sadržaj.

Ukoliko se sadržaj ukupnih fenola i flavonoida razmatra na nivou biljnog uzorka, svojim najvećim sadržajem se ističe vranilova trava.

3.3.12.4. Antioksidantna aktivnost gotovih proizvoda

Nakon izvršene hemijske karakterizacije etanolnih ekstrakata i etarskih ulja ispitivanih herbi, pomoću *in vitro* testova, odredio se njihov antioksidantni kapacitet i antimikrobna aktivnost. Na osnovu dobijenih rezultata odabrao se biološki vredniji

izolat i napravio funkcionalni napitak koji ispoljava prihvatljive senzorne karakteristike, nakon čega je ispitana njegova antioksidantna aktivnost. Antioksidantna aktivnost krajnjeg proizvoda je vrednovana i utvrđena najbolja receptura za njegovo dobijanje.

Osnovne sirovine za proizvodnju pića sa izolatima lekovitog i aromatičnog bilja su voda, šećer, limunska kiselina, etanol. Od pomenutih sastojaka pripremljena je baza (sve bez ekstrakta) i ista testirana na antioksidantnu aktivnost (tabela 52).

Tabela 52. Antioksidantna aktivnost baza određena DPPH testom

Baza (µl/ml)	Čaj ^a	Sirup	Sok	Liker
10	5,31±1,119	5,32±1,116	7,63±0,528	6,23±0,530
50	9,61±1,202	11,68± 1,979	8,99±1,693	7,45±0,513
100	10,12±1,530	13,59±1,351	10,20±2,127	12,03±0,708
500	26,43±1,395	15,04± 1,763	19,45±2,733	12,43±0,669
1000	33,61±2,393	17,81±2,720	36,69±1,583	20,42±1,322

^aBaza za ledeni čaj satureja i origanum je ista.

Vrednosti za EC₅₀ baza nisu mogle biti izračunate jer vrednosti procenta neutralizacije DPPH radikala nisu prešle 50 procenata. Nakon izvršenih ispitivanja i odabira kvalitetnijeg izolata pripremljeni su različiti gotovi proizvodi, testirani na antioksidantnu aktivnost, a dobijeni rezultati su dati u tabelama 53-57.

Inhibitorni efekat ledenog čaja (*S. kitaibelli*) na DPPH radikal, izražen kao inhibicija I (%) i kao EC₅₀ vrednost dat je u tabeli 53.

Tabela 53. Inhibitorni efekat ledenog čaja sa ekstraktom čubra na DPPH radikal

Ledeni čaj sa ekstraktom čubra (µl/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ± SD
10	17,49 ± 1,120
50	79,19 ± 1,702
100	91,94 ± 0,412
500	93,39 ± 0,295
1000	94,46 ± 2,933
EC₅₀ (µl/ml) ± SD	22,50±1,16

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala maksimalno dostiže 33,61% za bazu ledenog čaja, 94,46 % za ledeni čaj sa dodatkom ekstrakta čubra, dok je izračunata vrednosti za EC₅₀ kod finalnog proizvoda iznosila (EC₅₀=22,50±1,16 µl/ml).

Inhibitorni efekat ledenog čaja (*O. vulgare*) na DPPH radikal, izražen kao inhibicija I (%) i kao EC₅₀ vrednost dat je u tabeli 54.

Tabela 54. Inhibitorni efekat ledenog čaja sa ekstraktom vranilove trave na DPPH radikal

Ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave (µl/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ± SD
10	37,34±3,248
50	90,84±0,286
100	92,96±0,341
500	93,98±0,000
1000	93,67±6,079
EC₅₀ (µl/ml) ± SD	12,59±0,73

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala maksimalno dostiže 33,61% za bazu ledenog čaja, 93,67% za ledeni čaj sa dodatkom ekstrakta vranilove trave, a izračunata vrednost za EC₅₀, kod finalnog proizvoda (EC₅₀=12,59±0,73 µl/ml).

Inhibitorni efekat sirupa (*T. serpyllum*) na DPPH radikal, izražen kao inhibicija I (%) i kao EC₅₀ vrednost dat je u tabeli 55.

Tabela 55. Inhibitorni efekat sirupa sa ekstraktom majkine dušice na DPPH radikal

Sirup sa ekstraktom majkine dušice (µl/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ± SD
10	33,19±3,476
50	64,56±3,426
100	82,38±0,683
500	93,40±0,389
1000	93,74±1,184
EC₅₀ (µl/ml) ± SD	23,00±1,00

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala maksimalno dostiže 17,81% za bazu sirupa, 93,74% za sirup, a izračunata vrednosti za EC₅₀ kod finalnog proizvoda iznosi (EC₅₀=23,00±1,00µl/ml).

Inhibitorni efekat soka (*M. longifolia*) na DPPH radikal, izražen kao inhibicija I (%) i kao EC₅₀ vrednost dat je u tabeli 56.

Tabela 56. Inhibitorni efekat soka sa ekstraktom divlje nane na DPPH radikal

Sok sa ekstraktom divlje nane (µl/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ± SD
10	41,05±4,963
50	84,54±0,975
100	92,92±0,178
500	92,30±0,979
1000	93,58±1,749
EC₅₀ (µl/ml) ± SD	14,00±3,00

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala maksimalno dostiže 36,69% za bazu soka, 93,58% za sok, a izračunata vrednost za EC₅₀, kod finalnog proizvoda (EC₅₀=14,00±3,00 µl/ml).

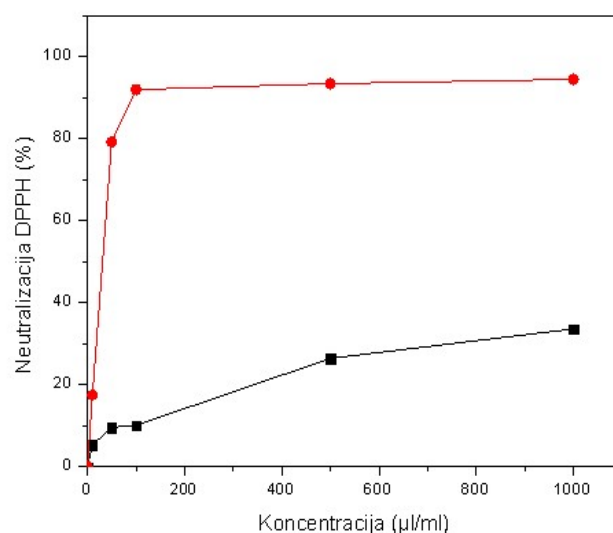
Inhibitorni efekat likera (*A. alba*) na DPPH radikal, izražen kao inhibicija I (%) i kao EC₅₀ vrednost dat je u tabeli 57.

Tabela 57. Inhibitorni efekat likera sa ekstraktom rudinskog pelena na DPPH radikal

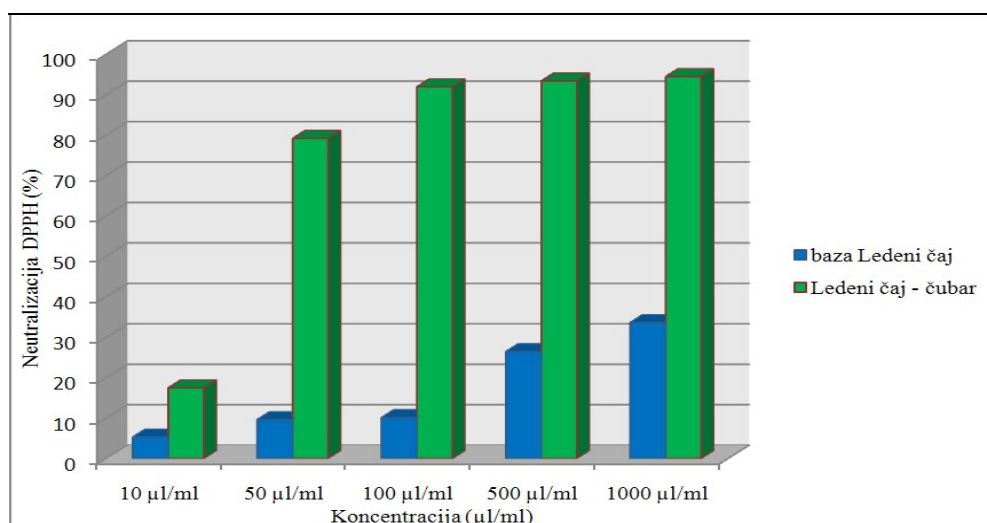
Liker sa ekstraktom rudinskog pelena (µl/ml)	Neutralizacija DPPH (%) ± SD
10	16,63±0,579
50	58,69±1,656
100	72,57±7,598
500	83,33±1,588
1000	84,51±2,795
EC₅₀ (µl/ml) ± SD	36,51±2,43

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala maksimalno dostiže 20,42% za bazu likera, 84,51% za liker, a izračunata vrednost za EC_{50} kod finalnog proizvoda iznosi ($EC_{50}=36,51\pm 2,43 \mu\text{l/ml}$). Prema podacima iz literature (Karabegović *et al.*, 2012) vrednost EC_{50} komercijalnog biljnog likera „Bitter 54“ sastavljenog od više vrsta lekovitog i aromatičnog bilja iznosila je $25,1\pm 0,48 \mu\text{l}$ bittera/ml rastvora što je u skladu sa rezultatima ispitivanja u ovom radu.

Na slikama 42–51 su date antioksidantne aktivnosti baza pripremljenih gotovih proizvoda i gotovih proizvoda sa dodatkom ispitivanih ekstrakata.



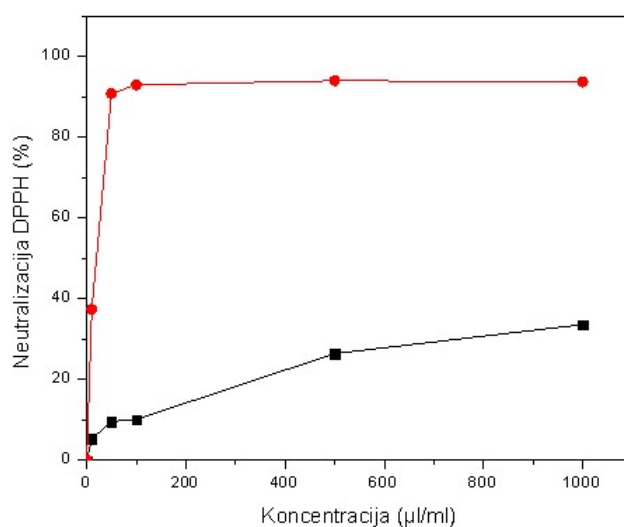
Slika 42. Antioksidantna aktivnost baze ledenog čaja i ledenog čaja sa dodatkom ekstrakta čubra



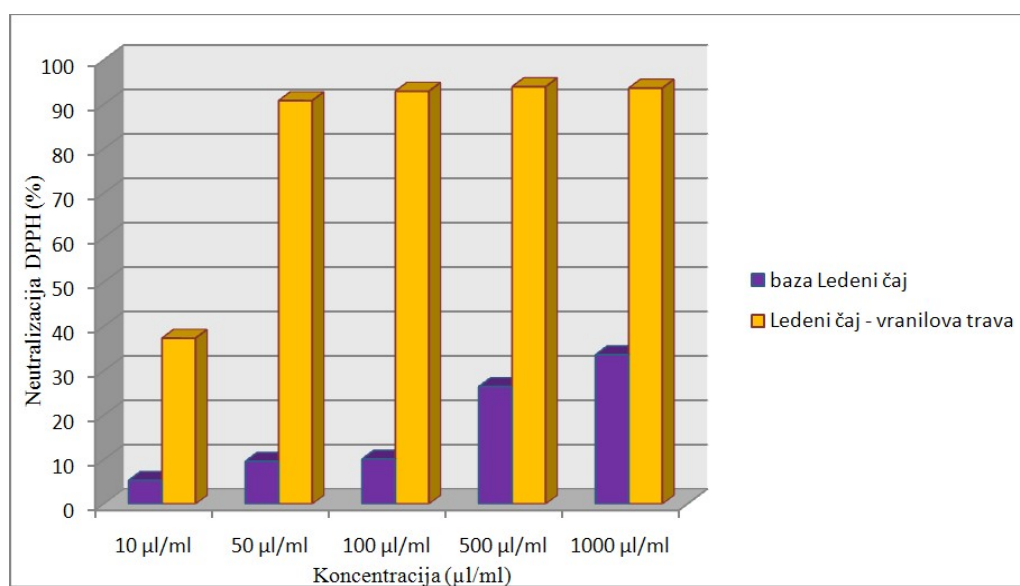
Slika 43. Neutralizacija DPPH radikala baze ledenog čaja i čaja sa dodatkom ekstrakta čubra

Dobijeni rezultati ukazuju na to da i sama baza ledenog čaja čubra poseduje izvesnu antioksidantnu aktivnost koja je u poređenju sa ledenim čajem kao gotovim proizvodom neuporedivo manja, što ujedno ukazuje i potvrđuje doprinos ekstrakta čubra u ukupnoj antioksidantnosti pripremljenog proizvoda (slika 42 i 43).

Antioksidantna aktivnost baze ledenog čaja i ledenog čaja kao gotovog proizvoda sa dodatkom ekstrakta vranilove trave data je na slikama 44 i 45.



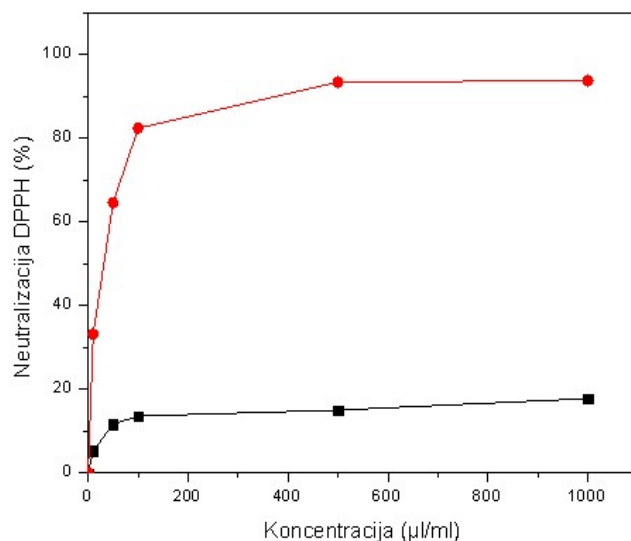
Slika 44. Antioksidantna aktivnost baze ledenog čaja i ledenog čaja sa dodatkom ekstrakta vranilove trave



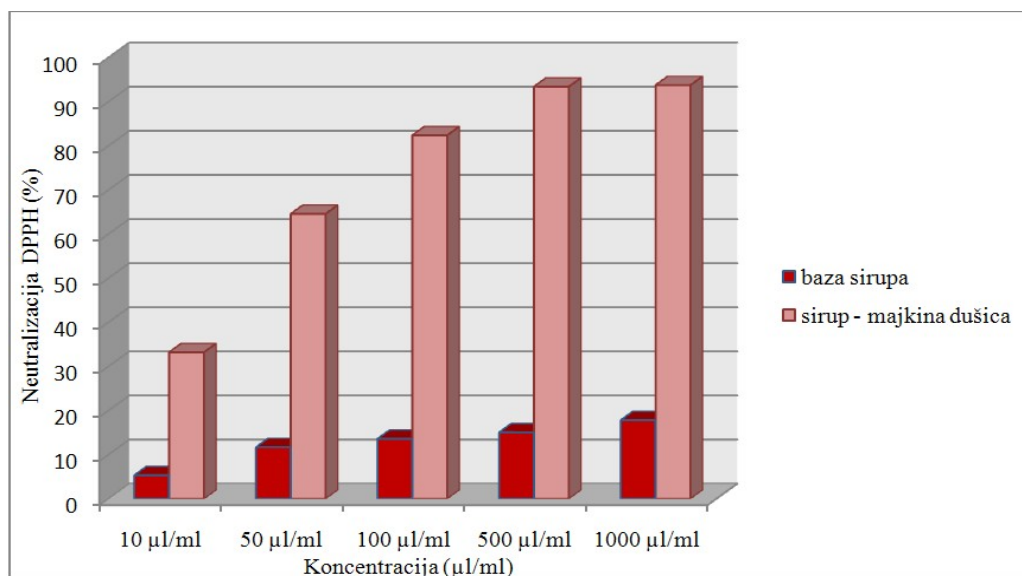
Slika 45. Neutralizacija DPPH radikala baze ledenog čaja i čaja sa dodatkom ekstrakta vranilove trave

Antioksidantna aktivnost ledenog čaja kao gotovog proizvoda je kao što vidimo sa slike 44 i 45 vidno veća u odnosu na antioksidantnu aktivnost njegove baze. Ovo se može pripisati dodatkom ekstraktu vranilove trave koji je u svim primenjenim testovima pokazao značajnu antioksidantnu aktivnost.

Antioksidantna aktivnost baze sirupa i sirupa kao gotovog proizvoda sa dodatkom ekstrakta majkine dušice data je na slikama 46 i 47.



Slika 46. Antioksidantna aktivnost baze sirupa i sirupa sa dodatkom ekstrakta majkine dušice

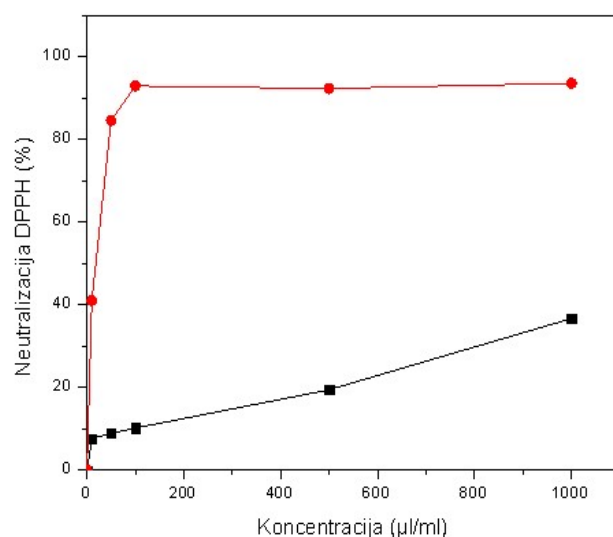


Slika 47. Neutralizacija DPPH radikala baze sirupa i sirupa sa dodatkom ekstrakta majkine dušice

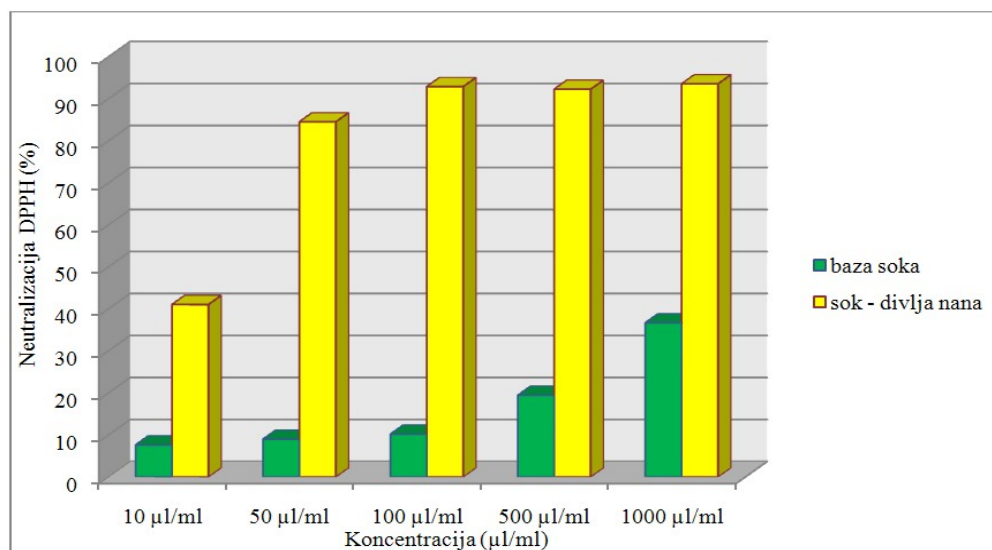
Ekstrakt majkine dušice poseduje antioksidantnu aktivnost utvrđenu prethodnim ispitivanjima. Dodatak ovog ekstrakta, upravo proporcionalno njegovom sadržaju,

povećava antioksidantnu aktivnost sirupa kao gotovog proizvoda u odnosu na njegovu bazu (slika 46 i 47).

Antioksidantna aktivnost baze soka i soka kao gotovog proizvoda sa dodatkom ekstrakta divlje nane data je na slikama 48 i 49.



Slika 48. Antioksidantna aktivnost baze soka i soka sa dodatkom ekstrakta divlje nane

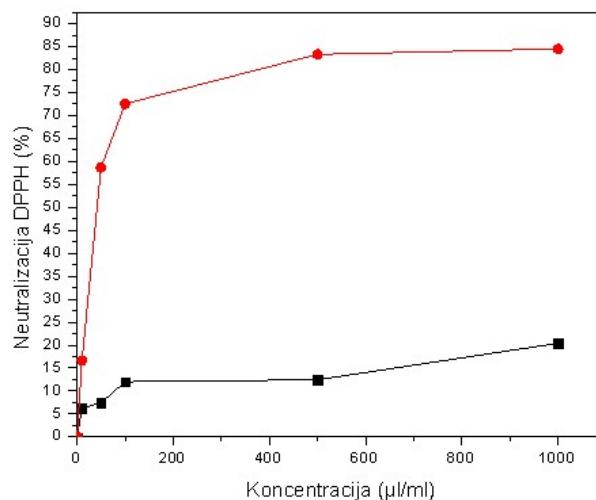


Slika 49. Neutralizacija DPPH radikala baze soka i soka sa dodatkom ekstrakta divlje nane

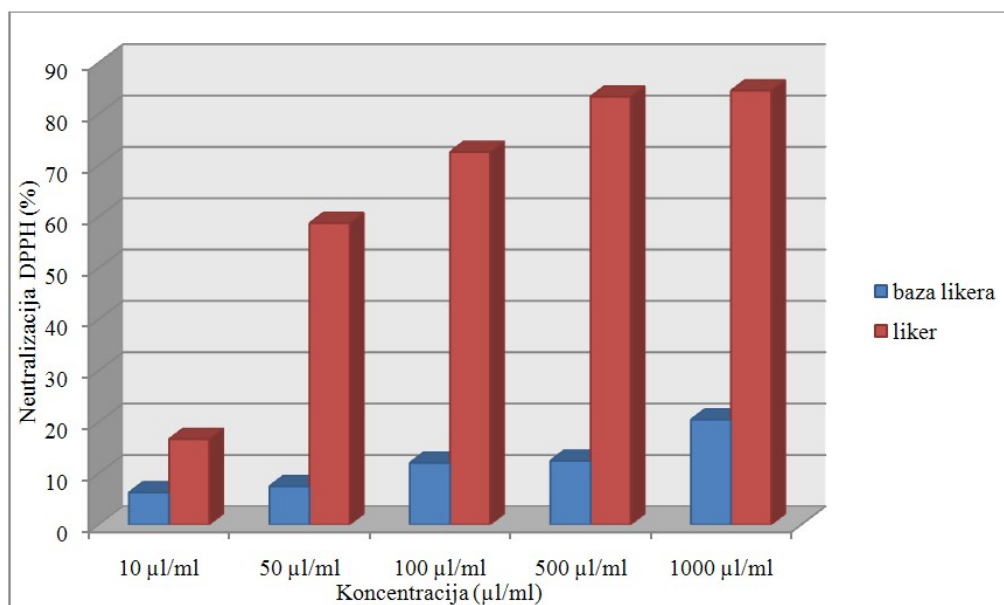
Ekstrakt divlje nane sušene prirodnim putem u odnosu na druga dva ekstrakta nane sušene u laboratorijskoj i niskotemperaturnoj sušnici poseduje najveću antioksidantnu aktivnost u svim primenjenim testovima. Dodatak ekstrakta soku kao gotovom

proizvodu, dovodi do povećanja njegove antioksidantne aktivnosti u odnosu na pripremljenu bazu (slika 48 i 49).

Antioksidantna aktivnost baze likera i likera kao gotovog proizvoda sa dodatkom ekstrakta rudinskog pelena data je na slikama 50 i 51.



Slika 50. Antioksidantna aktivnost baze likera i likera sa dodatkom ekstrakta rudinskog pelena



Slika 51. Neutralizacija DPPH radikala baze likera i likera sa dodatkom ekstrakta rudinskog pelena

Kao što se vidi sa slike 50 i 51 i kod likera kao i kod ostalih pripremljenih gotovih proizvoda dodatak ekstrakta rudinskog pelena, upravo proporcionalno primenjenoj

koncentraciji, dovodi do povećanja njegove antioksidantne aktivnosti u odnosu na pripremljenu bazu.

Antioksidantna aktivnost krajnjeg proizvoda vrednovana FRAP i DPPH testom je prikazana u tabeli 58.

Tabela 58. Antioksidantno dejstvo gotovog proizvoda ^{a,b}

Gotov proizvod	FRAP μmol Fe ²⁺ / ml pića	DPPH μl/ml
Ledeni čaj sa ekstraktom čubra	6,97±0,150b	22,50±1,16b
Ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave	15,79±0,318c	12,59±0,73c
Sirup sa ekstraktom majkine dušice	6,17±0,177d	23,00±1,00b
Sok sa ekstraktom divlje nane	9,09±0,173e	14,00±3,00c
Liker sa ekstraktom rudinskog pelena	4,11±0,119a	36,51±2,43a

^a Vrednosti prikazane u tabeli date su u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

^b Različitim slovima u koloni su obeležene vrednosti koje se značajno razlikuju (p<0,05, Scheffé test)

Analizom gotovih proizvoda, od kojih su svi sem sirupa u obliku u kome se konzumiraju, pokazano je da daleko najbogatiji fenolima jedinjenjima ledeni čaj *Origanum*, koji ujedno ima najveći sadržaj flavonoida i pokazuje najjaču antioksidantnu aktivnost. Ovaj zaključak potkrepljen je uporednim testom jednofaktorske analize varijanse.

Poređenjem ledenih čajeva, ledeni čaj *Origanum* sadrži više bioaktivnih jedinjenja i pokazuje jaču antioksidantnu aktivnost, pri čemu su te razlike statistički značajne na nivou poverenja od 95% (Scheffé test). Ovakvi rezultati su očekivani i u skladu sa rezultatima analize čistih ekstrakata, gde je već pokazano da je ekstrakt biljne vrste *Origanum* bogatiji fenolima i flavonoidima i da pokazuje najizraženiju antioksidantnu aktivnost.

Rezultati analize gotovih proizvoda pokazali su da je razlika u sadržaju ukupnih flavonoida i antioksidantne aktivnosti određene DPPH testom statistički značajna (p > 0,05; Scheffé test), dok je istim testom pokazano samo da nema statistički značajne razlike u sadržaju ukupnih fenola između likera i soka.

Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida nije statistički značajno korelisan sa antioksidantnom aktivnošću određenom obema tehnikama (p < 0,05), što upućuje na zaključak da antioksidantna aktivnost ne potiče samo od ovih grupa jedinjenja.

Dobra korelacija ukupnog sadržaja fenola i antioksidantnog dejstva pokazana je u slučaju različitih likera od kokosa (Redovniković *et al.*, 2009) i nekih komercijalnih

biljnih likera (Imark *et al.*, 2001), dok su ovakvi rezultati u suprotnosti sa rezultatima objavljenim od strane Heinonen i saradnika koji su pokazali da nema dobre korelacije u sadržaju fenola i antioksidantnom dejstvu kod likera i voćnih vina pripremljenih korišćenjem bobičastog voća (Heinonen *et al.*, 1998).

Preko 20 uzoraka različitih alkoholnih i bezalkoholnih pića testirali su Tabart i saradnici 2009 godine na sadržaj fenola, flavonoida i antioksidantnu aktivnost, pri čemu je utvrđeno da najveći sadržaj bioaktivnih jedinjenja, a samim tim i najveću antioksidantnu aktivnost pokazuje crveno vino i sok od narandže. Najmanji sadržaj bioaktivnih jedinjenja i najslabija antioksidantna aktivnost zabeležena je kod soka od jabuke i soka od povrća, dok se analizom korejskog likera od cvetova i listova lotosa utvrdilo da on sadrži 1063 µg polifenolnih jedinjenja/ml, što je manje kada se izvrši poređenje sa crvenim vinima (1000-4000 µg polifenola/ml), ali mnogostruko više u poređenju sa sadržajem pomenutih jedinjenja u belim vinima (200-300 µg polifenola/ml) (Lee *et al.*, 2005). Sadržaj fenolnih jedinjenja određen ispitivanjem komercijalnog biljnog likera „Bitter 54“ ($412,7 \pm 4,7$ µg galne kiseline/ml) se nalazi u granicama od 91 do 1820 µg galne kiseline/ml određenim analizom 44 različitih voćnih vina i likera (Heinonen *et al.*, 1998), što je u skladu sa rezultatima ispitanog likera u ovom radu (460 ± 19 µg galne kiseline /ml likera).

Konačno, uvažavajući rezultate oba testa, može se zaključiti da dodatak ekstrakata ispitanog biljnog materijala, upravo proporcionalno primenjenoj koncentraciji, dovodi do povećanja antioksidantne aktivnosti pripremljenih gotovih proizvoda. Rezultati dakle pokazuju da se ekstrakti ispitanih herbi mogu koristiti kao prirodni antioksidant i mogući dodatak osvežavajućim bezalkoholnim i alkoholnim pićima. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost primene ovih biljnih izolata u cilju proizvodnje pića, koji bi bili senzorno prihvatljivi od strane potrošača, a u isto vreme i potvrđeni u biološkim testovima kao funkcionalni.

4. ZAKLJUČAK

U okviru doktorske disertacije analizirani su ekstrakti i etarska ulja sedam odabranih lekovitih i aromatičnih biljaka, u cilju odabira najkvalitetnijeg izolata za inkorporiranja u bezalkoholna i alkoholna pića (ledeni čaj, sirup, sok, liker). Ispitivani su nadzemni delovi biljaka porodice Lamiaceae: *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff., čubar; *Origanum vulgare* L., vranilova trava; *Nepeta nuda* L., macina trava glatka; *Mentha longifolia* (L.) Hudson, dugolisna nana; *Thymus serpyllum* L., majkina dušica; *Hyssopus officinalis* L., izop, kao i *Artemisia alba* Turra, rudinski pelen iz porodice Asteraceae, sakupljeni u fenološkoj fazi cvetanja 2009. godine sa područja južne i jugoistočne Srbije.

Ukupan sadržaj ekstraktivnih materija kretao se u granicama od 8,9 do 16,5 g/100 g herbe. Prinos ekstrakta herbe *A. alba* bio je najveći. Po prinosu ekstraktivnih materija ističe se *M. longifolia* sušena PS (11,6 g/100g suvog biljnog materijala). Najveći sadržaj etarskog ulja utvrđen je u herbi *M. longifolia* sušenoj u NTKS (11 ml/kg), dok se kod ostalih vrsta sadržaj kretao od 3-10 ml/kg.

Analizom isparljivih frakcija ekstrakata i etarskih ulja sprovedenom GC-FID i GC-MS, utvrđeno je prisustvo različitih, uglavnom terpenkih komponenata. Dominantne komponente: ekstrakta herbe *S. kitaibelii* je neral, a etarskog ulja *trans*-geraniol; ekstrakta *Origanum vulgare* *trans*-kariofilen, a ulja γ -murolen; ekstrakta *A. alba* skopoletin, a ulja kamfor; u ekstraktu i etarskom ulju *N. nuda* 1,8-cineol; u ekstraktu *T. serpyllum* *para*-vinil-gvajakol, a u ulju timol; u ekstraktima *M. longifolia* piperiton i menton, a u etarskim uljima piperiton; u ekstraktu *H. officinalis* *cis*-pinokamfon, a u ulju 1,8-cineol.

Najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida prisutan je u ekstraktu *O. vulgare* (129,2±12,71 mg GK/g suvog ekstrakta i 110,7±2,47 mg rutina/g suvog ekstrakta), dok je najniži sadržaj ovih jedinjenja detektovan u ekstraktu *N. nuda* (40,9±1,21 mg GK/g suvog ekstrakta i 20,0±0,6 mg rutina/g suvog ekstrakta).

Analizom neisparljivih frakcija ekstrakata sprovedenom HPLC uz korišćenje standardnih supstanci, utvrđeno je prisustvo različitih fenolnih sastojaka. Dominantna komponenta u ekstraktu *S. kitaibelii* je kemferol 3-O glukozid; *O. vulgare* su kemferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid i luteolin 5-O-glukozid; *A. alba* kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-ramnozid; *N. nuda* kemferol 3-O-(6''-O-acetilglukozid)-7-O-ramnozid i hlorogena kiselina; *T. serpyllum* luteolin 5-O-(6''-O-malonilglukozid) i kemferol 3-O-(6''-O-malonilglukozid)-7-O-ramnozid; *H. officinalis* hlorogenska kiselina; a u ekstraktima *M. longifolia* kemferol 3-O-glukozid.

Ekstrakti su ispoljili veću antioksidantnu aktivnost u odnosu na etarska ulja. Najveći ukupni antioksidantni potencijal meren FRAP testom pokazao je ekstrakt *O. vulgare* ($5,89 \pm 0,12$ mmol Fe^{2+}/g), a najmanji *N. nuda* ($0,86 \pm 0,07$ mmol Fe^{2+}/g). Najveću antioksidantnu aktivnost, ispitivanu DPPH testom, ispoljio je ekstrakt *O. vulgare*, dok je najmanju pokazao ekstrakt *N. nuda*. EC_{50} vrednosti ekstrakata varirale su u opsegu 4,77-86,24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a etarskih ulja 0,77-47,50 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Utvrđen je visok stepen korelacije antioksidantne aktivnosti sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja.

Način sušenja svežeg biljnog materijala *M. longifolia* uticao je i na biološku aktivnost njegovih izolata. Ekstrakt sušen PS, ima najveći sadržaj ukupnih fenola ($113,8 \pm 2,0$ mg galne kiseline/g suvog ekstrakta) i flavonoida ($106,7 \pm 0,3$ mg rutina/g suvog ekstrakta). Shodno sadržaju polifenola, ovaj ekstrakt pokazuje i najveću antioksidantnu aktivnost (FRAP test $2,76$ mmol Fe^{2+}/g suvog ekstrakta i DPPH test $21,00 \pm 2,00$ $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Etarska ulja ispitivanih herbi pokazala su jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte, što je posledica prisustva većeg broja različitih terpenkih jedinjenja. Sva ispitivana etarska ulja su pokazala jači antimikrobni efekat na Gram (+) bakterije, dok je efekat na Gram (-) bakterije bio znatno slabiji.

Zahvaljujući utvrđenom visokom antioksidantnom potencijalu ispitivanih ekstrakata, primena ovog biljnog izolata je moguća u proizvodnji osvežavajućih bezalkoholnih i alkoholnih pića. Proizvodi bi bili senzorno prihvatljivi od strane potrošača, a u isto vreme i obogaćeni vrednim biološkim sastojcima.

Kako osvežavajuća bezalkoholna i alkoholna pića moraju da ispunjavaju zahteve kvaliteta propisane Pravilnicima, pripremljeni su proizvodi koji su bili senzorno prihvatljivi od strane ocenjivača: ledeni čaj sa ekstraktom čubra, ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave, sirup sa ekstraktom majkine dušice, sok sa ekstraktom divlje nane i liker sa ekstraktom rudinskog pelena. Najbolju senzornu ocenu dobio je sok sa dodatim ekstraktom divlje nane, ledeni čaj u koji je dodat ekstrakt vranilove trave i liker sa dodatkom ekstrakta rudinskog pelena. S' obzirom da su u pitanju novi proizvodi iz grupe „pića za uživanje“, važna je podrška marketinga, jer iako svojim kvalitetom ne zaostaju za sličnim proizvodima, bez ove podrške male su šanse za proboj na tržište.

Uvažavajući rezultate FRAP i DPPH testa, može se zaključiti da dodatak ekstrakata ispitivanog biljnog materijala, dovodi do povećanja antioksidantne aktivnosti pripremljenih proizvoda. Dodatak ekstrakta gotovom proizvodu povećava njegovu antioksidantnu aktivnost u odnosu na pripremljenu bazu. Antioksidantna aktivnost gotovog proizvoda je opadala u nizu: ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave > sok sa ekstraktom divlje nane > ledeni čaj sa ekstraktom čubra > sirup sa ekstraktom majkine dušice > liker sa ekstraktom rudinskog pelena.

Analizom gotovih proizvoda, pokazano je da daleko najbogatiji fenolnim jedinjenjima ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave ($1,010 \pm 0,020$ mg galne kiseline/ml pića), koji ujedno ima najveći sadržaj flavonoida ($0,497 \pm 0,005$ mg rutina/ml pića) i pokazuje najjaču antioksidantnu aktivnost. Ovakvi rezultati su očekivani i u skladu sa rezultatima analize čistih ekstrakata, gde je već pokazano da je ekstrakt biljne vrste *O. vulgare* bogatiji fenolima i flavonoidima i ima najizraženiju antioksidantnu aktivnost.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su analizirani ekstrakti dobri prirodni antioksidanti. Uzimajući u obzir ocene analiziranog antioksidantnog kapaciteta, kao i parametara senzornog kvaliteta proizvoda, ledeni čaj sa ekstraktom vranilove trave i negazirano osvežavajuće bezalkoholno piće (sok) napravljeno dodatkom ekstrakta divlje nane sušene prirodnim putem može se predložiti za dalju komercijalnu upotrebu.

5. LITERATURA

- Acar, J.F., Goldstein, F.W., (1996): Disc susceptibility test. In: Lorian V. (Ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1–51.
- Acworth, I.N., (2003): The Handbook of Redox Biochemistry, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA.
- Adams, R.P., (2007): Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Ahmed, S.M., Abdelgaleil, S.A.M., (2005): Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. (*Magnoliaceae*), Internat. J. Agric., Biol., 7, 638-642.
- Al-Bayati F., (2009): Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq, Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 8, 20.
- Allegrini, J., S. de Buochberg M., Pellecuer, J., (1974.): Etude in vitro de l' activité antibactérienne et antifongique de l' essence de *Satureja montana* L. /Labiées/. J. Pharm., Belgique, 2, 137-144.
- Angelini, L.G., Carpanese, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchia, M., Flamini, G., (2003): Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors, J. Agric. Food Chem., 51, 6158-6164.
- Areias, F.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M. (2001): Phenolic fingerprint of peppermint leaves, Food Chem., 73, 307–311.
- Arsić, I., Đorđević, S., Ristić, M., Runjaić-Antić D., (2003): Lekovito bilje u proizvodnji funkcionalne hrane, Lekovite sirovine, vol XXII, бр. 23, Institut za proučavanje lekovitog bilja 'Dr Josif Pančić', Beograd, стр. 15-22.
- Asekuna, O.T., Grierson, D.S., Afolayan, A.J., (2007): Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis, Food. Chem., 101, 995–998.
- Асенов, И., Гусев, Ч., Кутанов, Г., Николов, С., Петков, Т., (1998.): Билкосъбирание, Издателство Билер, София.
- Azizi, A., Yan, F., Honermeier, B., (2009): Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply, Industrial crops and products 29, 554–561.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008): Biological effects of essential oils - A review, Food and Chemical Toxicology, 46 (2), 446-475.
- Banaeva, Y. A., Pokrovsky, L. M., Tkachev, A. V., (1998): Chemical Composition of the Essential Oil of *Thymus serpyllum* L.s.l. Growing Wild in Altai Region, Proceedings of the International Conference on Natural Product and Physiologically Active Substance (ICNPAS-98), Nov. 30-Dec. 6, Novosibirsk.
- Baranauskienė, R., Venskutonis, R.P., Demyttenaere, J.C., (2003): Sensory and instrumental evaluation of catnip (*Nepeta cataria* L.) aroma, Journal of Agricultural Food Chemistry, 51, 3840–3848.

- Barros, L., Heleno, A.S., Carvalho, A.M., Ferreira I.C.F.R., (2010): Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics, *LWT*, 43, 544–550.
- Bassiouny, S.S., Hassanién, F.R., Abd-El-Razik, A.F., El-Kayati, M., (1990): Efficiency of antioxidants from natural sources in bakery products, *Food Chem.*, (37), 297-305.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K., Saxena, D.B., (2001): Allelopathic effects of parthenin – a sesquiterpene lactone, on germination and early growth of mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) *PGRSA Quarterly*, 29, 81-91.
- Becker, E.M., Nissen, L.R., Skibsted, L.H., (2004): Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects, *Eur. Food Res. Tech. Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 219, 561-571.
- Benli, M., Kaya, I., Yigit, N., (2007): Screening antimicrobial activity of various extracts of *Artemisia dracunculus* L., *Cell Biochem. Funct.*, 25 (6), 681-686.
- Blagojević, P.D., Jovanović, M.M., Palić, R.M. and Stojanović, G.S., (2009): Changes in the Volatile Profile of the *Artemisia lobelii* All. During Prolonged Plant Material Storage (Article), *J. Essent. Oil Res.*, 21, 497-500.
- Bogosavljević, S., Zlatković, B., Randelović, V., (2007): Flora klisure Svrliškog Timoka, 9th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Niš (Serbia), September 01-03.
- Boik, J., (2001): Natural compounds in cancer therapy, Oregon Medical Press, LLC, Princeton, USA.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F., Felinger, A., (2010): Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species, *Journal of Chromatography A.*, 1217, 7972–7980.
- Božin, B., Mimica-Đukić, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007): Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 7879-7885.
- Božin, B., (2009): Biohemijaska i farmakološka ispitivanja vrsta roda *Allium* L. (Sect. *Allium*). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Brkić, D., (2001): Funkcionalna hrana: naučni koncept i naša iskustva, Zbornik izvoda, “Dani lekovitog bilja”, Beograd.
- Burt, S., (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Cal, K., (2006): Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles, *Planta Med.*, 72, 311-316.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, A., (2003): Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220.
- Capasso, F., Gaginella, T.S., Grandolini, G., Izzo, A.A., (2005): Fitoterapija – Priručnik biljne medicine, Prometej, Novi Sad.
- Carson, C.F., Riley, T.V., (1995): Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, [http://biomednet.com/db/medline?Format=HTML &RecID10=95247604&Command=View+Selected](http://biomednet.com/db/medline?Format=HTML&RecID10=95247604&Command=View+Selected)

- Carvalho, I.S., Cavaco, T., Brodelius, M., (2011): Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species, *Industrial Crops and Products* 33, 382–388.
- Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., & Cestaro, B., (2000): Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts, *Journal of Food Biochemistry*, 24, 453–465.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002): Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (3), 178-182.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Dangles, O. (2007): Essential oils as antioxidants, *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1 (1), 4-15.
- Chen, L.J., Lebetkin, E.H., Burka, L.T., (2001): Metabolism of (R)-(+)-pulegone in F344 rats, *Drug Metabolism and Disposition*, 29(12), 1567–1577.
- Chia, J.D., Jeong, M.R., Jeong, S.I., Moon, S.E., Kim, J.Y., Kil, B.S., Song, Y.H., (2005): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*, *Planta Medica*, 51(2), 186–190.
- Chi-Tang, Ho, Chang, Y. Lee, Mou-Tuan Huang (Eds.), (1992): Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence, and Chemistry. ACS Symposium Series 506, American Chemical Society: Washington, D.C.
- Choe, E., Min, D.B., (2009): Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8 (4), 345-358.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., (2002): Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, *Plant Science*, 163 (6), 1161-1168.
- Codex General Standard for Food Additives (GSFA, Codex STAN 192-1995).
- Codex Alimentarius Commission FAO/WHO (2003)– Opšti principi higijene hrane CAC/RCP 1-1969, Rev.4, a na nivou Evropske Unije u Direktivi savet 93/43 EEZ.
- Cook, N.C., Samman, S., (1996): Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7 (2), 66-76.
- Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Sannois, A., Voirin, B., (1995): Free flavonoid aglycones from *Thymus herba barona* and its monoterpenoid chemotypes, *Phytochemistry*, Vol. 40, 1, 115-120.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., et al. (1999): In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Hénichart J.P., Gaydou E., Wallet J.C. (1992): Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones, *Free Radic. Biol. Med.*, 13;211-9.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., (2000): The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *J. Appl. Microbiol.*, 88, 170-175.
- Croft, K.D., (1999): Antioxidant Effects of Plant Phenolic Compounds, U: Antioxidants in Human Health, Basu, T.K., Temple, N.J., Garg, M.L. (Eds.), CAB International.
- Čanadanović-Brunet, J.M. (1998): Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, Zadužbina Andrejević, Beograd, p. 36.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M.E., Jerković-Mujkić, A., Bešta, R., (2008): Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils, *Food Chemistry* 111, 648–653.

- Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Đjilas, S., Tumbas, V., Markov, S., Cvetković, D., (2007): Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* Extracts, *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 1013-1027.
- Ćetković, G., (2008): The chemistry of natural products, Faculty of Technology, University of Novi Sad, in Serbian.
- Daouk, R.K., Dagher, S.M., & Sattout, E.J., (1995): Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L., *Journal of Food Protection*, 58, 1147–1149.
- Datta, S., Saxena, D.B., (2001): Pesticidal properties of parthenin (from *Parthenium hysterophorus*) and related compounds, *Pest. Manag. Sci.*, 57, 95-101.
- Davidović, D., Savić, T., Lazić, M., Veljković, V., Savić, D., Veličković, D. (2004): Analiza uticaja ekstrakta žalfije na reološke osobine testa, Deveti pekarski dani, Zbornik rezimea, Vrnjačka Banja, 16.
- De Flora, S. and Ferguson, R.L., (2005): Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents, *Mut. Res.*, Article in press.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., (2002): Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus essential oils, *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 101-109.
- De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., Negro, D., (2011): Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy, *Food Chemistry*, 125, 1284-1286.
- De Pooter, H.L., Nicola, B., De Buyck, F., Goetghebeur, P. and Schamp, N. M. (1987): The essential oil of *Nepeta nuda*. Identification of a new nepetalactone diastereoisomers, *Phytochemistry*, 26, 2311-2314.
- Diklić, N., (1974): Rod *Satureja* L. In: Flora Srbije, VI (Josifović, M., ed.). SANU, Odeljenje prirodno matematičkih nauka, Beograd, str. 458.
- Diklić, N., (1974): Rod *Origanum* L. In: Flora Srbije, VI (Josifović, M., ed.). SANU, Odeljenje prirodno matematičkih nauka, Beograd, str. 474.
- Diklić, N., (1974): Rod *Nepeta* L. In: Flora Srbije, VI (Josifović, M., ed.). SANU, Odeljenje prirodno matematičkih nauka, Beograd, str. 374.
- Diklić, N., (1974): Rod *Thymus* L., u: Josifović, M., (ed.): Flora SR Srbije, tom VI, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, str. 494.
- Diklić, N., (1974): Rod *Hyssopus* L., u: Josifović, M., (ed.): Flora SR Srbije, tom VI, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, str. 473.
- Diplock, AT, Aggott, PJ, Ashwell, M et al., (1999): Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br.J. Nutr.*; 81 (Suppl): IS-27S
- Dobrynin, V.N., Kolosov, M.N., Chernov, B.K., Derbentseva, N.A. (1976): Antimicrobial substances of *Salvia officinalis*, *Khim. Prir. Soedin.*, (5), 686-687.
- Dorman, H.J.D., & Deans, S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R., (2003): Antioxidant properties of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4563-4569.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J., (2003): Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, *Food Chemistry*, 83, 255–262.

- Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R., (2004): Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 762-770.
- Džamić, M. A., Soković, D. M. Ristić, S. M., Novaković, M., Grujić-Jovanović, S., Tešević, V., Marin, D. P., (2010): Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil, *Botanica SERBICA*, 34 (1): 57-61.
- Darmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlic, E., Đulinac, B., Dorđević, A., (1991): High Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Sage by Supercritical CO₂ Extraction, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68, 731-734.
- Dilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., (2002): Antioxidants in Food, *Chemical Industry*, 56 (3), 105-112.
- Dorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G., (2000): Biohemija slobodnih radikala, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Niš.
- Dorđević S., (2008): Pharmacognostic investigation *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* and *Carlina acanthifolia* subsp. *utzka* (Asteraceae), PhD thesis, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.
- European Food Safety Authority (2009): EFSA Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substances of concern, *EFSA Journal*, 7(9):281.
- El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., & Farouk, A., (2002): Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L., *Food Chemistry*, 79(3), PII S0308-8146(0302) 00164-00164.
- El-Desoky, S.K., El-Ansari, M.A., El-Negoumy, S.I., (2001): Flavonol glycosides from *Mentha lavandulacea*, *Fitoterapia* 72, 532-537.
- Fasseas, M.K., Mountzouris, K.C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Zervas, G., (2007): Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils, *Food Chemistry* 106, 1188–1194.
- Fathiazad, F., and Hamedeyazdan, S., (2011): A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(17), pp. 1959-1966, 8 November.
- Fecka, I., Turek, S., (2007): Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa and sage, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10908-10917.
- Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., Ochocka, J.R., (2003): Antibacterial and Antifungal Activity of Juniper Berry Oil and its Selected Components, *Phytotherapy Research.*, 17, 227-231.
- Fleisher, A., Fleisher, Z., (1991): The essential oils from *Mentha longifolia* growing in Sinai and Israel Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part IV, *Journal of Essential Oil Research*, 3(1), 57-8.
- Fleisher, Z., Fleisher, A., (1998): Volatile extract of *Mentha longifolia* growing in Israel Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part XIII, *Journal of Essential Oil Research*, 10(6), 647-648.
- Foti, M., Piatelli, M., Baratta, M.T., Ruberto, G. (1996): Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 497-501.
- Fraga, B.M., (2005): Natural sesquiterplnoids., *Nat. Prod. Rep.*, 22(4), 465-486.

- Frankel, E.N., (1984): Lipid oxidation: Mechanism, products and biological significance, J. Am. Oil Chem. Soc., 61, 1908-1912.
- Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., Taguchi, C., Kondo, K., (2009): Coffee and Green Tea As a Large Source of Antioxidant Polyphenols in the Japanese Population, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (4), 1253–1259.
- Gajić, M., (1975): Rod *Artemisia* L., u: Josifović, M., (ed.) Flora SR Srbije, tom VII, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, str. 126.
- Gašić, J.M., (1985): Etarska ulja. Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd.
- Genova, E., Jankulov, J., (1983): Proučavanje vrhu aromatičnite i lečebni kakčestva na eteričnite masla ot nekoj predstaviteli na rod *Satureja* L. v Blgarija, Treta nacionalna konferencija po botanika .C., BAN, Sofia.
- Ghoulami, S., Idrissi, A., Fkih-Tetouani, S., (2001): Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morocco, Fitoterapia, 72(5), 596-598.
- Gilani, H. A., Shah, J. A., Zubair, A., Khalid, S., Kiani, J., Ahmed, A., Rasheed, M., Ahmad, U. V., (2009): Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of *Nepeta cataria* L., Journal of Ethnopharmacology, 121, 405–411.
- Gönül Hatipoglu, Münevver Sökmen, Ersan Bektas, Dimitra Daferera, Atalay Sökmen, Ezgi Demir, Hüseyin Sahin, (2013): Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*, Industrial Crops and Products 43, 427– 433.
- Gordon, W.P., Huitric, A.C., Seth, C.L., Mc Clanahan, R.H., Nelson, S.D. (1987): The metabolism of the abortifacient terpene, (R)-(+)- pulegone, to a proximate toxin, menthofuran. Drug Metabolism and Disposition, 15(5), 589–594.
- Gorunović, S.M., Bogavac, M.P., Chalchat, C.J. and Garry P., (1992): Analysis of the essential oil of *Artemisia lobelii* All., Pharmazie, 47, H.10, 803-804.
- Gorunović, M.S., Bogavac, P.M., Chulchut J.C., Chabardi J.L., (1995): Essential oil of *hyssopus officinalis* l., lamiaceae of Montenegro origin, J. Essent. Oil Res., 7, 39-43.
- Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N., (1999): The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, Flavour Frag. J., 14, 322-332.
- Grlić, Lj., (1986): Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., (2007): Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*, Food Chemistry, 103: 1449-1456.
- Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C., (1989): Free radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, p. 213.
- Halliwell, B., (1994): Free radicals and antioxidants: a personal view, Nut. Rev., 52, 253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C., (1999): Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK.
- Halliwell, B., Whiteman, M., (2004): Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, British Journal of Pharmacology, 142, 231-255.

- Halliwell, B., (2008): Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies, Arch. Biochem. Biophys., 476, 107-112.
- Hardy, G., (2000): Nutraceuticals and functional foods: introducing and meaning, Nutrition, 16, 688.
- Heinonen, I.M., Lehtonen, P.J., Hopia, A.I., (1998): Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. J Agric Food Chem. 46, 25-31.
- Hinou, J., Demetzos, C., Harvala, C., (1989): Polyphenolic compounds of *Myrtus communis*, Fitoterapia, 60(1): 94.
- Hoet, S., Stévigny, C., Hérent, M.F., Quetin-Leclercq, J., (2006): Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*, Planta Med., 72, 480-482.
- <http://www.liu.edu/Brooklyn/About/News/Press-Releases/2012/April/BK-PR-Apr252012.aspx>
- Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P. (1987): Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, Phytochemistry, 26, 2489–2491.
- Imark, C., Kneubühl, M., Bodmer, S., (2001): Innovative Food Science and Emerging Technologies, 1, 239-243.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., (2005): Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test, Food Chem., 93, 551-556.
- Jamzad, Z., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., Ingrouille, M., Jalili, A., (2003): Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera, Biochemical Systematics and Ecology 31: 587–600.
- Janjić, V., Stanković-Kalezić, R., Radivojević, Lj., (2008): Natural products with alleopathic, herbicidal and toxic effects Acta herbologica, Vol. 17, No. 1, 1-22.
- Janićijević, H.S., Kenić, J., Arsić-Komljenović, G., (2008): Antioksidantni potencijal biljke matočina (*Mellitis Melisophyllum*), Praxis Medica, 36(3-4), 083-087.
- Jančić, R., Stošić, D., Mimica-Dukić, N., Lakušić, B. (1995): Aromatične biljke Srbije. NIP Dečje novine, Beograd-Gornji Milanovac.
- Jančić, R., (2001): Lekovite biljke sa ključem za određivanje, treće dopunjeno izdanje, Beograd, str. 217.
- Janković, M., (1974): Rod *Mentha* L., u: Josifović, M., (ed.): Flora SR Srbije, tom VI, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, Beograd, 524-525.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., Schmidt, E., (2006): Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of various *Salvia* sp. and *Thuja* sp. essential oils, Nutrition, vol 30, 152-157.
- Joulain, D., Ragault, M., (1976): Sur quelques nouveaux constituents de l'huile essentielle d'*Hyssopus officinalis* Linnaeus, Rivista Ital, 58, 129-31.
- Jović, S., Cvetković, D., (2000): Vermut-kontrola proizvodnje i kvalitet, V savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta Vrnjačka Banja, Zbornik radova, Beograd, str. 161-168.
- Karabegović, T. I., Vukosavljević, V. P., Novaković, M. M., Gorjanović, Ž. S., Džamić, M. A., Lazić, L. M., (2012): Influence of the Storage on Bioactive Compounds and Sensory Attributes of Herbal Liqueur, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 7, No. 4, p. 1587-1598.
- Karaman, I., Sahin, F., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., & Adiguzel, A., (2003): Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L., Journal of Ethnopharmacology, 85, 231–235.

- Katalinić, V., Miloš, M., Modun, D., Musić, I., Boban, M., (2004): Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with + catechin, Food Chemistry, 86 (4), 593-600.
- Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J., Kromhout, D., (1996): Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, Arch. Intern. Med., 156, 637- 642.
- Kerrola K., Galambosi B., Kallio H., (1994): Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*hyssopus officinalis* L.), J. Agric. Food Chem., 42, 776.
- Khangholi S. and Rezaeinodehi A., (2008): Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Artemisia annua*) growing wild in Iran. Pakistan J. Biol. Sci., 11, 934-937.
- Kitić, D., (2010): Etarska ulja, Studentski Medicinski Glasnik, 1(1):149-156.
- Kišgeci, J., (2008): Lekovite i aromatične biljke, Partenon, Srpska književna zadruga, Beograd.
- Kocić-Tanackov, D.S., Dimić, R.G., Tanackov, I., Tuco, D., (2011a): Antifungal activity of oregano extract against *A. versicolor*, *E. nidulans* and *Eurotium* spp. - producers of sterigmatocystin, Proc. Nat. Sci., Matica Srpska 120, 165-176.
- Kocić-Tanackov, S.D., Dimić G.R., Tanackov, I.J., Pejin, D.J., Mojović, L.V., Pejin, J.D., (2012a): Antifungal activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food, Chemical Industry, 66 (1), 33-41.
- Kokkini, S., Papageorgiou, V., (1988): Constituents of essential oils from *Mentha longifolia* growing wild in Greece, Planta Medica, 54(1), 59-60.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., & Yildirim, A., (2005a): Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (5), 1408-1416.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A., (2005b): Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils, J. Agric. Food Chem., 53, 9452-9458.
- Kovačević, N., (2004): Osnovi farmakognozije (treće izdanje), Srpska školska knjiga, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, str. 275.
- Kowal, T., Krupinska, A., (1979): Anti Bacterial Activity of Essential Oil from *Thymus-Pulegioides*. Herba Polonica 25, 303-10.
- Lawrence, B.M., (1992): Advances in Labiate Science. Edits, R.M. Harley, T. Reynolds, Royal Botanic Gardens, Kew 399.
- Lee, H.K., Choi, Y.M., Noh, D.O., Suh, H.J., (2005): Antioxidant effect of Korean traditional lotus liquor (Yunyupju). Int J Food Sci Tech. 40, 709-715.
- Lepojević, Ž., Zeković, Z., Milošević, S., Vidović, S., Zlokolica, N., Adamović, D., (2008): Ispitivanje ekstrakcije izopa (*Hyssopus officinalis* L.), Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, vol. 40, br. 81, str. 34-41.
- Lesjak, M., (2011): Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae), Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

- Leung, A.Y. and Foster, S., (1996): Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.
- Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P., (2008): Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils, *Phytochemistry*, 69, 1732–1738.
- Ložiene, K., Vaičiuniene, J., Venskutonis, P.R., (1998): Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* s. l.) growing wild in Lithuania, *Planta Medica*, 64, 772-773.
- Ložiene, K., Vaičiuniene, J., Venskutonis, P.R., (2003): Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 249-259.
- Ljajević-Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Soković, M., Mišić, D., Grubišić, D., Ristić, M., (2008): Antifungal activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil, *J. Serb. Chem. Soc.*, 73 (10) 961–965.
- Macdonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., (2006): Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2046–2056.
- Madhujith, T., Shahidi, F., (2006): Optimization of the extraction and antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidative properties, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8048-8057.
- Mahboobi, M., Shahcheraghi, F., Feizabad, M.M., (2006): Bactericidal effects of essential oils from clove, lavender and geranium on multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Iran. J. Biotechnol.*, 4, 137-140.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A, Ferreira, D., (2006): The Stereochemistry of Flavonoids, u “Science of Flavonoids“ urednik Grotewold E., Springer Science Business Media, Inc., 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.
- Marin, P.D., (1995). Diversity and Taxonomical significance of flavonoids in the Lamiaceae. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 47 (3-4): 101-109.
- Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Matevski, V., (2003): External leaf flavonoids of *Thymus* species from Macedonia, *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, 1291.
- Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U., (2007): Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements, *Sensors*, 7, 2080–2095.
- Mastelić, J., Jerković, I., (2002): Free and Glycosidically Bound Volatiles of *Mentha longifolia* Growing in Croatia, *Chemistry of Natural Compounds*, 38(4): 561-564.
- Matasyoha, J.C., Kiplimoa, J.J., Karubiub, N.M., Hailstorcks, T.P., (2007): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Satureja biflora* (Lamiaceae), *B. Chem. Soc. Ethiopia*, 21, 249-254.
- Mattila, P., Hellström, J., Törrönen, R., (2006): Phenolic acids in berries, fruits, and beverages, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7193-7199.
- Matović, M., Lavadinović, V. (1999): Essential oil composition of *Mentha longifolia* (L) Huds. from the Mountain Zlatar in Yugoslavia, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2(2), 78-81.
- Mcdonnell G., Denver-Russell A., (1999): Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147-179.

- Merken, H.M., Beecher, G.R., (2000): Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3), 577-599.
- Mességué, M., (1988): Moj herbar zdravlja, „Otokar Keršovani“, Opatija.
- Miceli, N., Taviano, M.F., Giuffrida, D., Trovato, A., Tzakou, O., Galati, E.M., (2005): Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham, *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 261–266.
- Miceli, A., Negro, C., Tommasi, L., (2006): Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy), *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 528-535.
- Milenović, D., (2002): Analiza kinetike procesa ekstrakcije čvrsto-tečno, magistarski rad, Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Milosavljević, N., Randelović, N., Jeremić, Ž., Danilović, R., Banković, V., Jotović, I., (1997): Fitoncidna aktivnost etarskog ulja čubra (*Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff.) sa raznih lokaliteta na neke mikroorganizme. Izvodi radova, Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja, Zaječar, V, 69.
- Milosavljević, N., Randelović, N., Danilović, R., Banković, V., Jeremić, Ž., (1998): Fitoncidna aktivnost i hemijski sastav etarskog ulja vrste *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. iz istočne i jugoistočne Srbije. Workshop '98, Biološki aktivne materije viših biljaka, gljiva, algi i bakterija, Novi Sad.
- Milosavljević, P.N., Veličković, T.D., Randelović, V.N., (2000): Antibacterial Activity and chemical composition of Essential Oil of Savory (*Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff.); Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, 181-185.
- Mimica-Đukić, N., Jančić, R., (1998): Biološke funkcije etarskih ulja aromatičnih biljaka: Workshop '98, Biološki aktivne materije viših biljaka, gljiva, algi i bakterija, Novi Sad.
- Mimica-Đukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihailović, B., Matavulj, M., (2003): Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils, *Planta Medica*, 69(5), 413-419.
- Mimica-Đukić, N., Božin, B., (2008): *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites, *Current Pharmaceutical Design*, 14, 3141-3150.
- Mitić, V., (2001): Ispitivanje i izolovanje prirodnih jedinjenja iz biljne vrste *Hyssopus officinalis* L. (izop), Magistarski rad, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Leskovac.
- Mitrović, S., Randelović, N., Ristić, M., Dimić, M. (2002): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Mentha longifolia* L. i *Mentha aquatica* L.. Proceeding of the 7th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Dimitrovgrad.
- Mothana, A. R., (2012): Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Nepeta deflersiana* Growing in Yemen, *Rec. Nat. Prod.* 6:2 189-193.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E., (2002): Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525.
- Moyler, D., (1994): Spices-recent advances. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi*, Elsevier Amsterdam, 1–70.

- Muller, C.H., (1966): The role of chemical inhibition (allelopathy) in chemical vegetation composition, Bulletin of the Torrey Botanical Club, 93, 332-351.
- Muravjova, D.A, Samlina, I.A, Yakovlev, G.P., (2002): Farmakognozija, Meditsina, Moscow.
- Namiki, M., (1990): Antioxidants/antimutagens in food, Food. Sci. Nutr., 29, 273-300.
- Namkung, H., Li, M., Gong, J., Yu, H., Cottrill, M., & de Lange, C.F.M. (2004): Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs, Canadian Journal of Animal Science, 84, 697-704.
- Navarro, V., Villarreal, M.L., Rojas, G., Lozoya, X., (1996): Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, J. Ethnopharmacol., 53 (3), 143-147.
- Neumann, H., (1999): Herstellung Von Brotkonfekt Unter Mitverwendung Von Gewürzen und Kräutern, Getreide Mehl und Brot, vol.53, Institute for Baking Technology, Detmold.
- Nguyen, U., Frakman, G., Evans, A.D., (1991): Process for extracting antioxidants from Labiatae herbs, United States Patent 5, 017,397.
- Nikićević, N., Tešević, V., (2010): Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd
- Nikolova M., Manolov P., (1990): Narčnik po bilko-lečenje, Sofija.
- Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilbert, I., (1998): Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy-nitrite and nitroxyl anion, Free Rad. Biol. Med., 25, 1057-1065.
- Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone (2003): Scientific Committee on Food, European Commission, Belgium.
- Orčić, D., (2010): 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, Novi Sad.
- Oyededeji, A.O., Afolayan, A.J., (2006): Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil isolated from South African *Mentha longifolia* (L.) ssp. *capensis* (Thunb.) Briq., Journal of Essential Oil Research, 18: 57-59.
- Paaver, U., Orav, A., Arak, E., Mäeorg, U., Raal, A., (2008): Phytochemical analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia, Natural Product Research, 22(2) 108-115.
- Pădure, M.I., Mihaiescu, D., Badulescu, L., Burzo, I., (2008): Chemical constituents of the essential oils of *Nepeta nuda* L. ssp., *Nuda* (LAMIACEAE) from Romania, Rom. J. Biol. – Plant Biol., Volume 53, No 1, p. 31-38, Bucharest.
- Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C.A., (1999): The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? Free Rad. Res., 30, 153-162.
- Pahlow, M. (1989): Velika Knjiga ljekovitog bilja, Cankarjeva založba, Ljubljana.
- Palić, M. R., (1981): Hemijski sastav biljaka roda *Satureja* L. i uticaj mikroklimatskih faktora, Doktorska disertacija, Beograd.
- Palić, R., Gašić M., (1993): Monografija: Hemijski sastav etarskog ulja roda *Satureja* L., Farmaceutsko- hemijska industrija „Zdravlje“- Leskovac, Niš.

- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., (1993): Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*, *J. ethnopharmacol.*, 39 (3), 167-170.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., (1997): Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils, *Microbios*, 89, 39–46.
- Pauli, A., Knobloch, K., (1987): Inhibitory effects of essential oil component on growth of food-contaminating fungi, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 185, 10-13.
- PDR for Herbal Medicines*, (2004): 3rd Ed. Thomson PDR at Montvale., p.882.; p. 758-759; p.609.
- Pekić, B., (1983): Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloidi i etarska ulja), Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Petti, S., Scully, C. (2009): Polyphenols, oral health and disease: A review, *Journal of Dentistry* 37 (6), 413-423.
- Ph. Jug. IV* (1984): Četvrto izdanje, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 156-159, 609-610.
- Ph. Jug. V* (2000): Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Beograd.
- Ph. Eur.* (2002): European Pharmacopoeia. Fourth edition, Strasbourg.
- Ph Eur 7* (2009): European Pharmacopoeia, 6th Edition, Edqm, Council of Europe, Strasbourg, 3061.
- Pietta, P. G., (2000): Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 63, 1035 – 1042.
- Piletić, M., Milić, B., Đilas, S., (1992): Organska hemija II deo, Prometej, Novi Sad.
- Pleșa Carmen-Manuela, Hădărugă Nicoleta Gabriela, Hădărugă Daniel Ioan, Ardelean Aurel, Gharibeh Branic Alina, Lupea Alfa Xenia (2010): Antioksidantna aktivnost ekstraktata *J. communis* L. i *J. virginiana* L. i proizvodi tipa votke. XIV internacionalna eko-konferencija o zdravstvenoj bezbednosti hrane, Zbornik radova, Novi Sad, str. 570.
- Pojarkova, A.I., (1954): Nepeta. In: Shishkin (Ed.), *Flora of the USSR*, Academy of Science of the USSR, Moskova-Leningrad.
- Pokorny, J., Janishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidants in food*, (2001): Woodhead Publishing Ltd., Abington, England i CRC Press LLC, New York, USA, pp. 1-6.
- Пономарев, В.Д., (1976): Экстрагирование лекарственного сырья, Медицина, Москва.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I., (2006): Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends in Plant Science*, 12 (1), 29-36.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Mishra, P.K., Dubey, N.K., Kharwar, R.N., (2011): Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B₁ contamination of spices, *Food Res. Int.*, 44 (1), 385-390.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za osvežavajuća bezalkoholna pića* („Sl. list SCG“, br. 18/2006).
- Pravilnik o ocenjivanju kvaliteta osvežavajućih bezalkoholnih pića Novosadskog sajma*, (2008), Novosadski sajam AD, Novi Sad.
- Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza alkoholnih pića* („Sl.list SFRJ“, br.70/87).
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića* („Sl. list SCG“, br.24/2004).

- Pravilnik o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića* („Sl.list RS“, br.73/10).
- Pravilnik o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda* („Sl. glasnik RS“, br. 4/2012).
- Pravilnik o kvalitetu i uslovima upotrebe aditiva u namirnicama i o drugim zahtevima za aditive i njihove mešavine* („Sl.list SCG“, br 56/2003, 4/2004 – dr. Pravilnik, 5/2004- ispr. I 16/2005).
- Public Statement on the Use of Herbal Medicinal Products Containing Estragole (2005)*: Committee on Herbal Medicinal Products, EMEA – European Medicines Agency.
- Ramezani, M., Fazli-Bazzaz, B.S., Saghafi-Khadem, F., Dabaghian, A., (2004)*: „Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran“, *Fitoterapia*, 75 (2), 201-203.
- Redovniković, I. R., Delonga, K., Mazor, S., Dragović-Uzelac, V., Carić, M., Vorkapić-Furač, J., (2009)*: *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 330-337.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1996)*: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
- Richardson, D.P., (1998)*: Scientific and regulatory issues about food which claim to have a positive effect on health . In: Sadler M. Ed. *Functional Foods: The consumer, the products, the evidence*, Royal Society of Chemistry, London, 196-208.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., (1988)*: Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature, *J. Ethnopharmacol.*, 23, 127-149.
- Robertfroid, M.B, (2001)*: Defining Functional Foods. In *Functional Foods-concept to products*. Ed. G.R. Gibson i C.M. Williams. CRC Press. Cambridge UK.
- Robbins, R.J., (2003)*: Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (10), 2866-2887.
- Rota, C., Carraminana, J.J., Burillo, J., Herrera, A., (2004)*: *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens, *Journal of Food Protection*, 67(6), 1252–1256.
- Ruberto, G., Baratta, M. T. (2000)*: Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69: 167-174.
- Russell, A.D., (2003)*: Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *Lancet Infect. Dis.*, 3, 794-803.
- Ružička, L., Eschenmayer, A., Heuser, H. (1953)*: The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9: 357-396.
- Sahin, F., Karaman, I., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., Adiguzel, A., et al. (2002)*: Evaluation of antimicrobial activities *Satureja hortensis* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 61–65.
- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H., (2004)*: Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey, *Food Control* 15, 549–557.
- Sarić, M., (1989)*: *Lekovite biljke Srbije*, SANU, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka, knjiga 65, Beograd, str. 553.

- Saroglou, V., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K., Skaltsa, H., (2005): Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.*, 68, 1404-1407.
- Savić, M., Katić, B., Popović, V., (2008): Nutritivni, lekoviti i ekonomski aspekti začina, *Industrija*, (4) 119-132.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000): Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols in Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine, *Am. Soc. Nut. Sci.*, 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005): Polyphenols: antioxidants and beyond, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1 Suppl), 215S–217S.
- Schultz, G., Stahl-Biskup, E., (1991): Essential oils and glycosidic-bound volatiles from leaves, stems, flowers and roots of *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae), *Flav. Fragr. J.*, 6, 69 -73.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardener, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H., Tijburg, L. (2001): Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *European Food Research and Technology*, 212, 319–328.
- Shahidi, F., Naczki, M., (1995): Food phenolics: an overview, U: *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*, Technomic Publishing Co, Pennsylvania, USA, pp. 1-4.
- Shan, J.J., Rodgers, K., Lai, C.T., Sutherland, S.K., (2007): Challenges in natural health product research: The importance of standardization, *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 50, 24-30.
- Shanjani, P.S., Mirza, M., Calagari, M., Adams, R.P., (2010): Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*, *Industrial Crops and Products*, 32, 83-87.
- Sharma, M.L., Nigan, M.C., Handa, V.L., (1963): The essential oil of hyssop, *Riechstoff. Arom. Koerperpflagemitt*, 13, 33.
- Shimoni, M., Putievsky, E., Ravid, U., Reuveni, R., (1993): Antifungal activity of volatile fractions of essential oils from four aromatic wild plants in Israel, *J. chem. ecol.*, 19 (6), 1129-1133.
- Shukla, T.P., (1998): Nutraceutical novelties: Trends in proprietary technology, *Cereal Foods World*, vol. 43, no. 5, 388-389.
- Selvi, A.T., Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K. (2003): Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity, *Food Microbiol.*, 20, 455–460.
- Senatore, F. (1996): Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5) 1327-1332.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., (1994): Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *J. Biol. Chem.*, 269, 8022-8028.
- Sikkema, J., De Bont, J.A., Poolman, B., (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiol. Rev.*, 59, 201-222.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.

- Skibola, C.F., Smith, M.T., (2000): Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Biol. Med.*, 29(3-4), 375-83.
- Skoula, M., Grayer, R.J., Kite, G.C., Veitch, N.C., (2008): Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation, *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 646–654.
- Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Hall, R.L., Higley, N.A., Lucas-Gavin, C., Adams, T.B., (2005): A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: Essential oils, *Food and Chemical Toxicology*, 43 (3), 345-363.
- Sovilj, M., Spasojević, M. (2001): Proizvodnja i primena etarskih ulja iz domaćeg lekovitog bilja, *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi / PTEP* 5 (1-2), 34-38.
- Spasić, V., (2002): Stanje, problemi i tendencije razvoja pčelarstva jugoistočne Srbije, Međunarodni stručni seminar, zbornih plenarnih radova, Niš, 11-18.
- Squiresa, J.M., Ferreirab J.F.S., Lindsaya D.S., Zajaca A.M., (2011): Effects of artemisinin and *Artemisia* extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*), *Veterinary Parasitology*, 175, 103–108.
- Stamenković, V., (2005): Naše neškodljive lekovite biljke, II dopunjeno i izmenjeno izdanje, NIGP Trend, Leskovac.
- Stangl, R., Greger, H., (1980): Mono Terpenes and Systematics of the Genus *Artemisia* Asteraceae Anthemideae, *Plant Systematics and Evolution* 136, 125-36.
- Stanić, G. and Samardžija, I., (1993): Phytotherapy Research, 7(5) 363. <http://www.rx.com/reference/natural/Savory.jhtml#usedfor>.
- Stanisavljević, M.D., Zlatković, P.B., Zlatković, B.G., (2010): Uticaj tehnoloških postupaka pripreme na zdravstvenu bezbednost hrane. XIV internacionalna konferencija o zdravstvenoj bezbednosti hrane, Zbornik radova, Novi Sad, str. 283-290.
- Stanisavljević, M.D., Đorđević, M.S., Ristić, S.M., Veličković, T.D., Randelović, V.N., (2010): Effects of different drying methods on the yield and the composition of essential oil from herb *Mentha longifolia* (L.) Hudson, *Biologica Nyssana*, 1 (1-2), December, 89-93.
- Stanisavljević, M.D., Zlatković, P.B., Ristić, S.M., Veličković, T.D., Đorđević, M.S., Lazić, L.M. (2012): Hemijski sastav etarskog ulja *Thymus serpyllum* L. sa područja Kopaonika, *Savremene tehnologije* 1(1), 24-28.
- Stanisavljević, M.D., Stojičević S.S., Đorđević, M.S., Zlatković, P.B., Veličković, T.D., Karabegović, T.I., Lazić, L.M., (2012): Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson dried by the use of different techniques – *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 18 (3) 411-420.
- Stanisavljević, M.D., Ristić, S.M., Veličković, T.D., Đorđević, M.S., Randelović, V.N., Zlatković, P.B., (2012): GC/MS Analysis of ethanolic extract of *Artemisia alba* Turra, 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries 7th CMAPSEEC, Subotica (Serbia), May 27-30.
- Stanković, N.S., Čomić, Lj.R., Kocić, B.D., Nikolić, D.M., Mihajilov-Krstev, T.M., Ilić, B.S., Miladinović, D.L., (2011): Odnos antibakterijske aktivnosti i hemijskog sastava etarskih ulja gajenih biljaka iz Srbije, *Hem. Ind.*, 65(5) 583-589.

- Stojanović, G., Radulović, N., Lazarević, J., Miladinović, D., Đoković, D., (2005): Antimicrobial activity of *Nepeta rtanensis* essential oil, *J. Essent. Oil Res.*, 17, 587-589.
- Stolić, S., (1997): Antibakterijska svojstva etarskog ulja vranilovke (*Origanum vulgare* L.), Diplomski rad, Tehnološki fakultet, Leskovac.
- Szöllösi, Réka, Szöllösi, Illona, Varga, (2002): Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method), *Acta Biologica Szegediensis*, 46, 125-127.
- Šilić, Č., (1979): Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Bentham, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije, Zemaljski muzej BiH, Sarajevo, str. 56-63.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J., (2009): Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests, *Food Chemistry* 113 (4), 1226-1233.
- Tahara, S., (2007): A Journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71 (6), 1387-1404.
- Tan, R., Zheng, W., Tang, H., (1998): „Biologically active substances from the genus *Artemisia*“, *Planta Med.*, 64 (4), 295-302.
- Tarhan, S., Telci, I., Tuncay, M. Taner, P.H., (2010): Product quality and energy consumption when drying peppermint by rotary drum dryer, *Industrial Crops and Products*, 32, 420-427
- Taylor, S.L., Bush, R.K. (1986): Sulfites as food ingredients, *Food Technol.*, June, 47-52.
- Tepe, B., Daferera, D., Tepe, A.S., Polissiou, M., Sokmen, A., (2007): Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey, *Food Chemistry*, 103, 1358-1364.
- Terens, W., Schwarz, K., (1995): Antioxidative Constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* IV. Determination of Carnosic Acid in Different Foodstuffs, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 201, 548-550.
- Toda, S., Shirataki, Y., (2001): Comparison of antioxidative and chelating effects of daidzein and daidzin on protein oxidative modification by copper in vitro, *Biol. Trace Elem. Res.*, 79, 83-89.
- Tomás-Barberán, F.A., Gil M.I., (1992): Chemistry and natural distribution of flavonoid in the *Labiatae*. In: R. M. Harley, T. Reynolds, Eds., *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanic Gardens, Kew, 299-305.
- Tonić, B., (2002): Fitoncidna aktivnost etarskog ulja majkine dušice sa Radana, Diplomski rad, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Leskovac.
- Tucakov J., (1990): Lečenje biljem, Rad, Beograd.
- Tutin, T.G., (1976): *Artemisia*. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), *Flora Europaea*, vol. 4. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 178-186.
- Tyler, V.E., (1993): *The Honest Herbal*: Haworth Press/Pharmaceutical Products Press, Binghamton, NY.
- Vaja, J., Aviram, M., (2001): Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications, *Current Medicinal Chemistry – Immunology, Endocrine and Metabolic Agents*, 1, 99-107.

- Vajs, V., Trifunović, S., Janačković, P., Soković, M., Milosavljević, S., Tešević, V., (2004): Antifungal activity of davanone-type sesquiterpenes from *Artemisia lobelii* var. *conescens*, J. Serb. Chem. Soc. 69 (11) 969–972.
- Veit, M., Beckert, C., Hohne, C., Bauer, K., Geiger, H., (1995): Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*, Phytochemistry 38 (4), 881-891.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., (1998): Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (10), 4113-4117.
- Veličković, D., (2005): Kinetika ultrazvučne ekstrakcije i hemijski sastav ekstrakta biljnih vrsta roda žalfije (*Salvia* L.), Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu (Tehnološki fakultet, Leskovac), Niš.
- Vinatoru, M., Maricela, T., Mason T.J. (1999): Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents, Advances in Sonochemistry 5, 209-248.
- Vinatoru, M., (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, Ultrasonic Sonochemistry, 8 (3), 303-313.
- Villaño, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. , (2007): Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, Talanta, 71 (1), 230-235.
- Voirin, B.; Saunois, A.; Bayet, C. (1994): Free flavonoid aglycones from *Mentha x piperita*: Developmental, chemotaxonomical and physiological aspects, Biochem. Syst. Ecol., 22, 95–99.
- Vukosavljević, P., Novaković M., Bukvić B., Nikšić M., Stanisavljević I., (2008): Antioxidant activities of herbs and fruits extracts in "Bitter 54", Book of abstracts, Food and Nutrition, 11th Congress of Nutrition, Belgrade, pp 167.
- Vukosavljević, P., Novaković, M., Bukvić, B., Nikšić, M., Stanisavljević, I., Klaus, A. (2009): Antioxidant activities of herbs, fruits and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfiltration process, Journal of Agriculture Sciences, Vol. 54, No 1, 44–61 , Belgrade.
- Weiss, R.F., (1988): Herbal Medicine, trans. A.R. Meuss, from the 6th German edition, Beaconsfield Publishers, Ltd., Beaconsfield, England.
- Willbrandt,S.,(1989): Geschmackliche und Gesundheitliche aspekte im Zusammenhang Mit Gewürzen in Backwaren, Getreide Mehl und Brot vol.43, Institute for Baking Technology, Detmold.
- Willford, R., (1989): Gesundheit durch heilkräuter. Rudolf Traunier Verlag, Linz.
- Wichtl, M., (2001): Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm, Science Publishers Stuttgart, 493-495.
- Wollgast, J., Anklam, E., (2000): Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health?, Food Research International, 33 (6), 449-459.
- Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z., Guolin, Z., (2007): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China, Food Chem., 100 1312-1315.
- Yanishlieva-Maslarova, N.N., Heinonen, M., (2001): Sources of Natural Antioxidants: Antioxidants in Food, CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, p. 210-249.

- Yun, K.W., Jeong, H.J., Kim, J.H., (2008): „The influence of the growth season on the antimicrobial and antioxidative activity in *Artemisia princeps* var. *orientalis*“, Ind. Crop. Prod., **27** (1), 69-74.
- Zgorka, G., Glowniak, K., (2001): Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family, J. Pharm. Biomed. Anal., **26**, 79–87.
- Zlatković, B., Bukvić, B., (2000): Nutritivna vrednost sokova i pića, V savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta Vrnjačka Banja, Zbornik radova, Beograd, str. 23.
- Živanović, P., Jančić, R., Ševarda, A.L., Kuznjecova, G.A., Todorović, B., Pavlović, S., (1987): Morphological-anatomical characteristics and essential oil of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. (Fam. Lamiaceae) from east Serbia, Arch. Farm., **37** (6), 297-308.

PRILOG 1. Skraćenice

AMDIS - Automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara (*eng.* Automated mass spectral deconvolution and identification system)

ANOVA - Jednodimenziona analiza varijanse (*eng.* Analysis of Variance)

ARP - Antiradikalska moć (*eng.* Anti radical power)

ATCC - Američki tip kolekcija kultura (*eng.* American Type of Culture Collection)

BEOU - Herbarijum Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (*eng.* Belgrade University Herbarium)

BHA - Butilovani hidroksianizol (*eng.* Butylated hydroxyanisole)

BHT - Butilovani hidroksitoluen (*eng.* Butylated hydroxytoluene)

CoA - Koenzim A (*eng.* Coenzyme A)

DMSO - Dimetil sulfoksid (*eng.* Dimethylsulfoxide)

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina (*eng.* Deoxyribonucleic acid)

DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (*eng.* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

DPPH test – Kapacitet neutralisanja DPPH radikala, spektrofotometrijsko određivanje (*eng.* Capacity of neutralizing of DPPH radicals, spectrophotometric determination)

EC₅₀ - Koncentracija ekstrakta i etarskog ulja koja je potrebna za neutralizaciju 50 % DPPH radikala (*eng.* Effective concentration of the extract and essential oil necessary to decrease the DPPH radical concentration by 50%)

EFSA - Evropska bezbednost hrane (*eng.* European Food Safety Authority)

EI - Elektronska jonizacija (*eng.* Electron ionization)

EMEA - Komitet za biljne lekove (*eng.* Committee on Herbal Medicinal Products)

ESI - Elektrosprej jonizacija (*eng.* Electrospray ionization)

EU - Evropska Unija (*eng.* European Union)

FAD - Masne kiseline i jedinjenja nastala metabolizmom masnih kiselina (*eng.* Fatty acids and fatty acid-derived compounds)

FC - Folin-Ciocalteu reagens (*eng.* Folin-Ciocalteu reagent)

FDA - Uprava za hranu i lekove (*eng.* Food and Drug Administration)

FID - Plameno-jonizujući detektor (*eng.* FID, Flame Ionization Detector)

FRAP test - Određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti (*eng.* Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

FREON EKO - Kondenzaciona sušara za voće, povrće i lekovito bilje (*eng.* Condensational oven for fruits, vegetables, medicinal herbs)

FUFOSE - Nauka o funkcionalnoj hrani u Evropi (*eng.* The Functional Food Science in Europe)

GC - Gasna hromatografija (*eng.* GC, Gas Chromatography)

GC-MS - Gasna hromatografija / masena spektrometrija (*eng.* GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

GRAS - Generalno priznata kao zdrava (*eng.* Generally Recognized As Safe)

HPLC - Visokoperformansna tečna hromatografija (*eng.* High Performance Liquid Chromatography)

ISO - Međunarodna organizacija za standardizaciju (*eng.* International organization for standardization)

KIE - Kovats-ev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (*eng.* Kovats (retention) index experimentally determined)

KIL - Kovats-ev (retencioni) indeks - literaturni podatak (*eng.* Kovats (retention) index - literature data)

LS - Laboratorijska sušnica (*eng.* Laboratory oven)

MIC - Minimalna inhibitorna koncentracija (*eng.* Minimal inhibitory concentration)

NAD(P)H - Redukovani oblik nikotinamidadenindinukleotida (*eng.* The reduced form nicotinamide adenine dinucleotide)

NCIMB - Nacionalna zbirka industrijskih bakterija (*eng.* National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen)

NS - Prirodno sušenje (*eng.* Natural drying)

NTKS - Niskotemperaturna kondenzaciona sušara (*eng.* Low temperature condensational oven)

Ph. Eur. - Evropska farmakopeja (*eng.* European Pharmacopoeia)

RNS - Reaktivni oblici azota (*eng.* Reactive nitrogen species)

ROS - Reaktivni oblici kiseonika (*eng.* Reactive oxygen species)

RSC - Skevindžer kapacitet – (*eng.* Radical Scavenging Capacity)

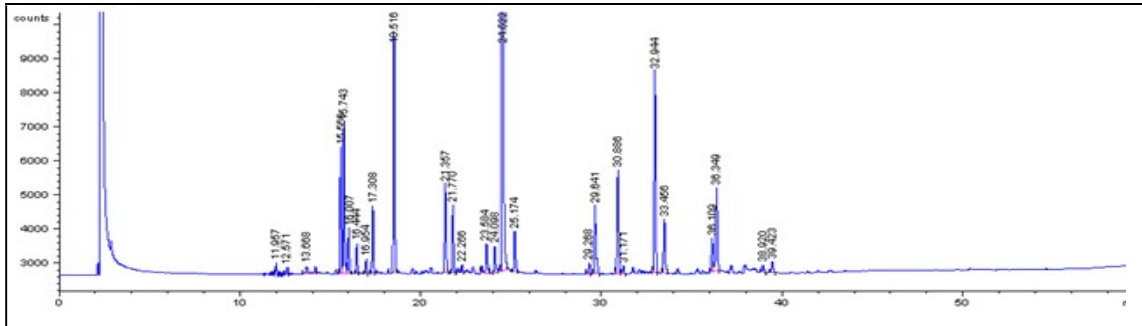
TPTZ - 2,4,6-tripiridil-S-triazin (*eng.* 2,4,6-tripyridyl-s-triazine)

US FDA - Američka uprava za hranu i lekove (*eng.* United States Food and Drug Administration)

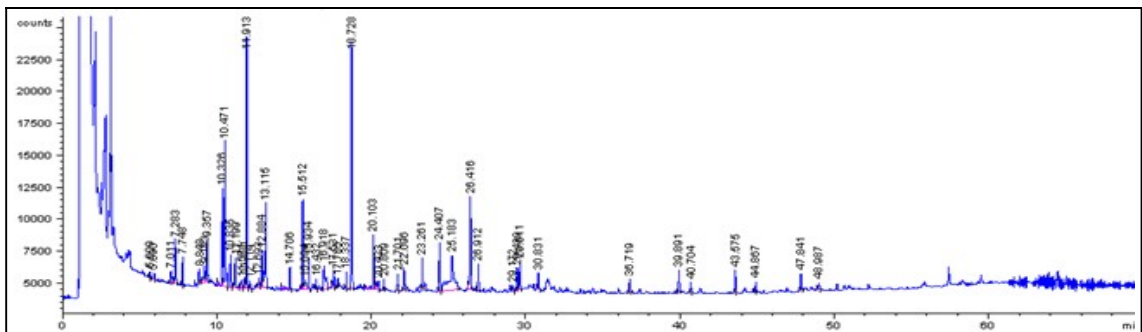
UV-DAD - UV detektor sa serijom dioda (*eng.* UV-Diode Array Detector)

WHO - Svetska zdravstvena organizacija (*eng.* World Health Organisation)

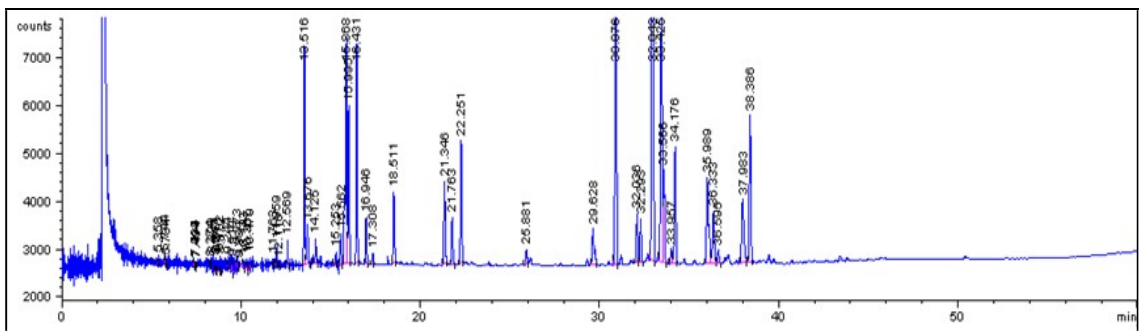
PRILOG 2. GC-hromatogrami ekstrakata i etarskih ulja



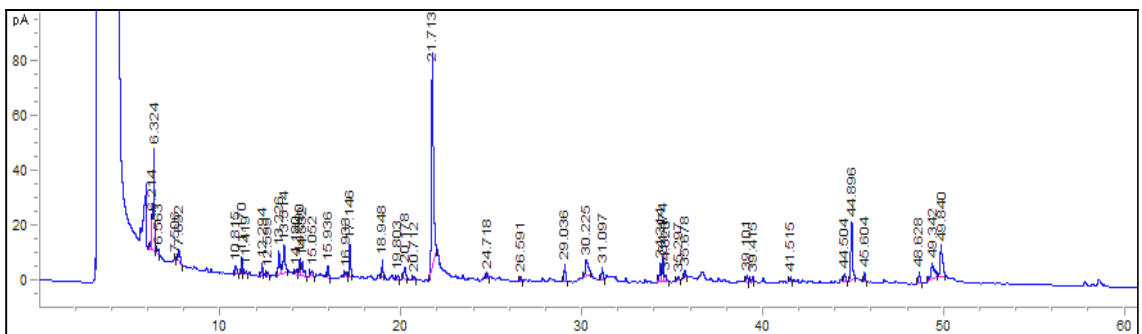
Slika 1a. GC-hromatogram etarskog ulja herbe *Satureja kitaibelii*



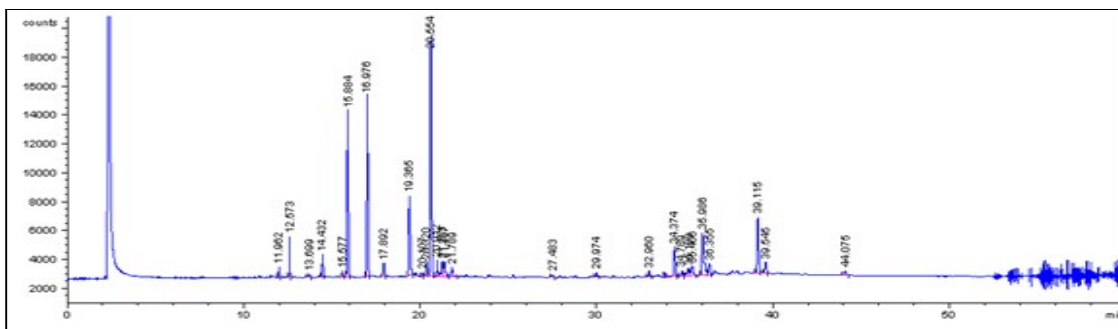
Slika 1b. GC-hromatogram ekstrakta herbe *Satureja kitaibelii*



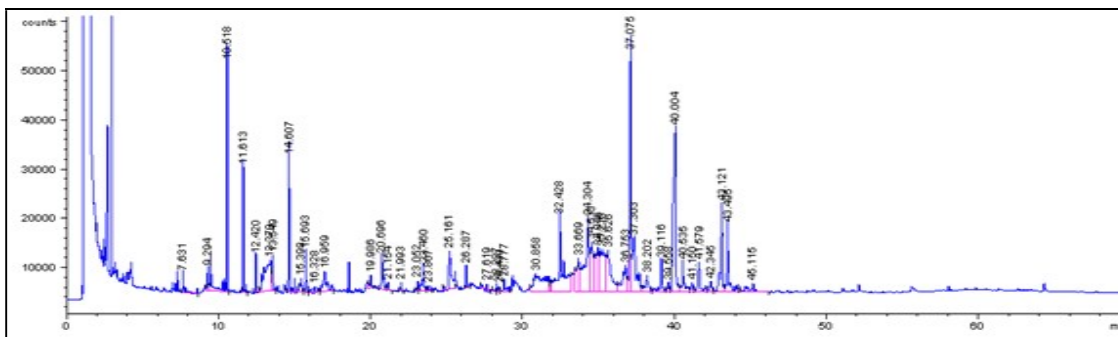
Slika 2a. GC-hromatogram etarskog ulja herbe *Origanum vulgare*



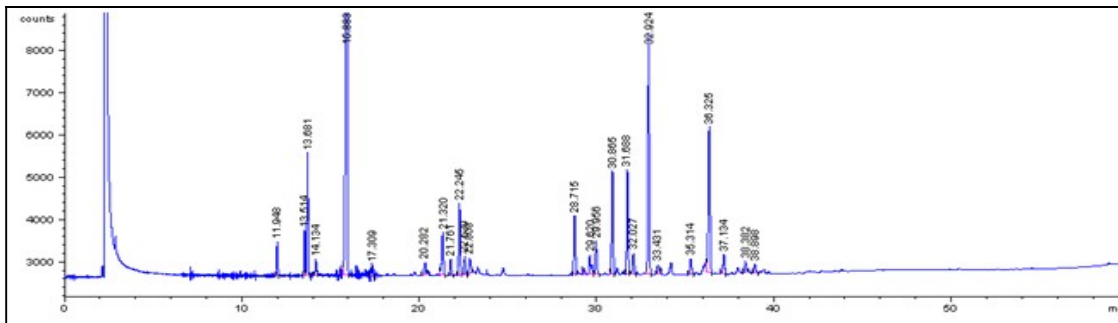
Slika 2b. GC-hromatogram ekstrakta herbe *Origanum vulgare*



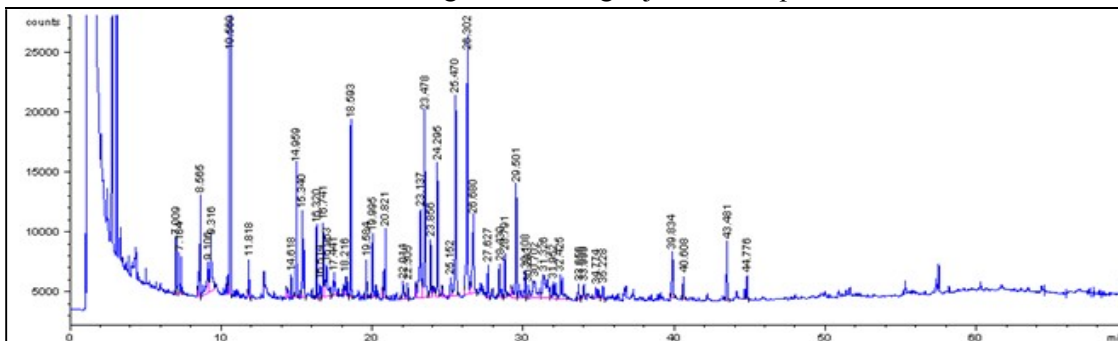
Slika 3a. GC-hromatogram etarskog ulja herbe *Artemisia alba* Turra



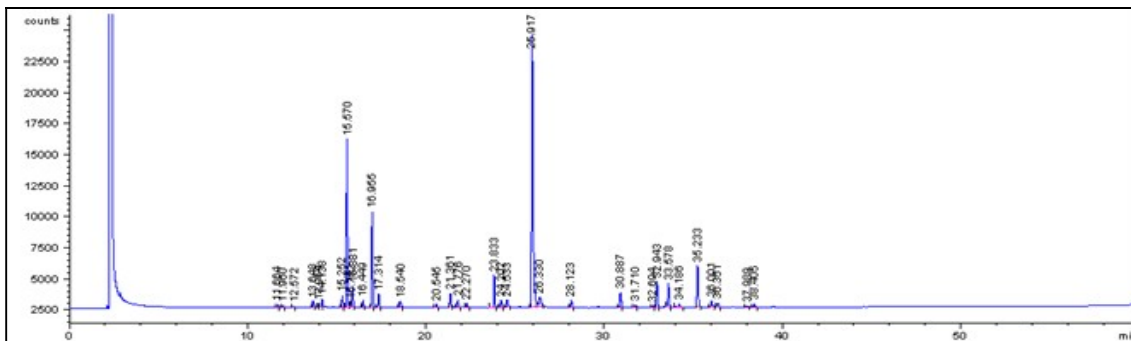
Slika 3b. GC-hromatogram ekstrakta herbe *Artemisia alba* Turra



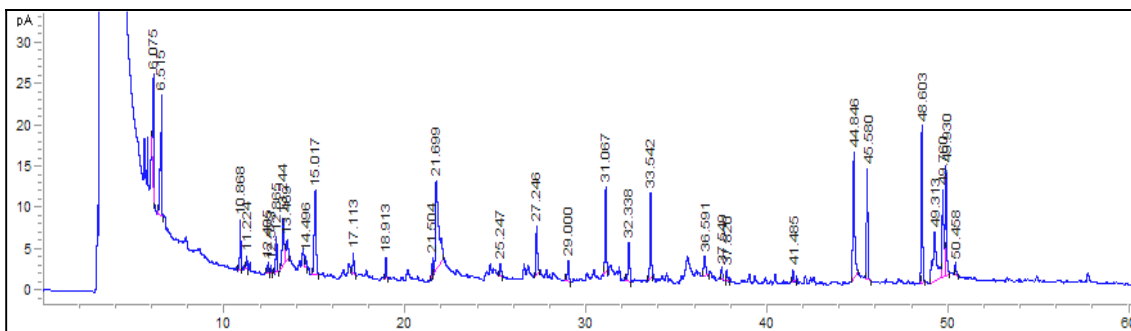
Slika 4a. GC-hromatogram etarskog ulja herbe *Nepeta nuda*



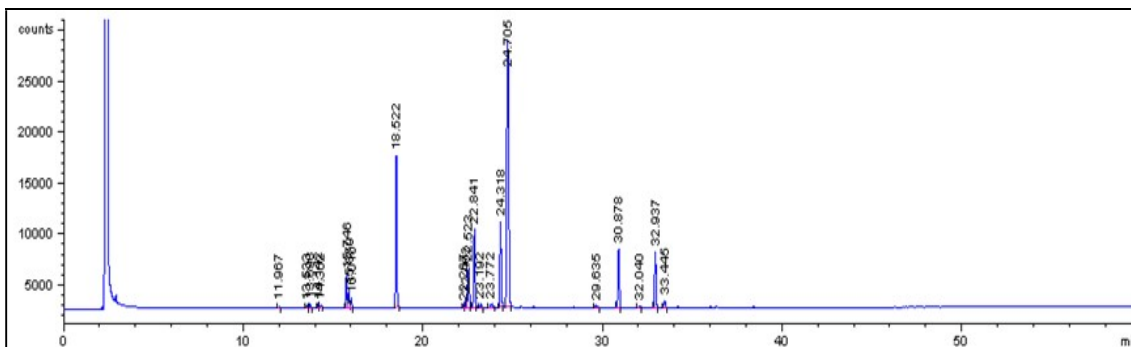
Slika 4b. GC-hromatogram ekstrakta herbe *Nepeta nuda*



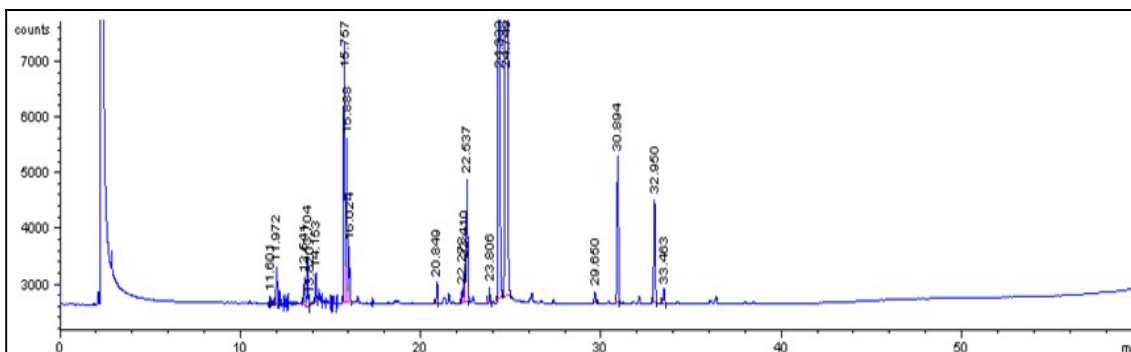
Slika 5a. GC-hromatogram etarskog ulja herbe *Thymus serpyllum*



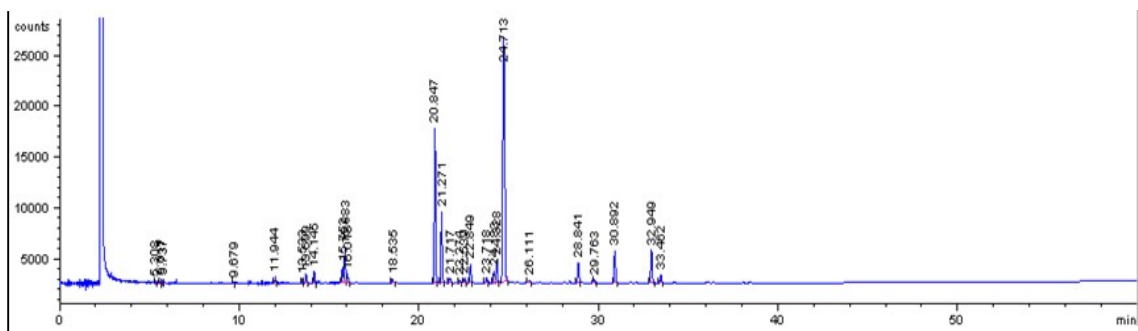
Slika 5b. GC-hromatogram ekstrakta herbe *Thymus serpyllum*



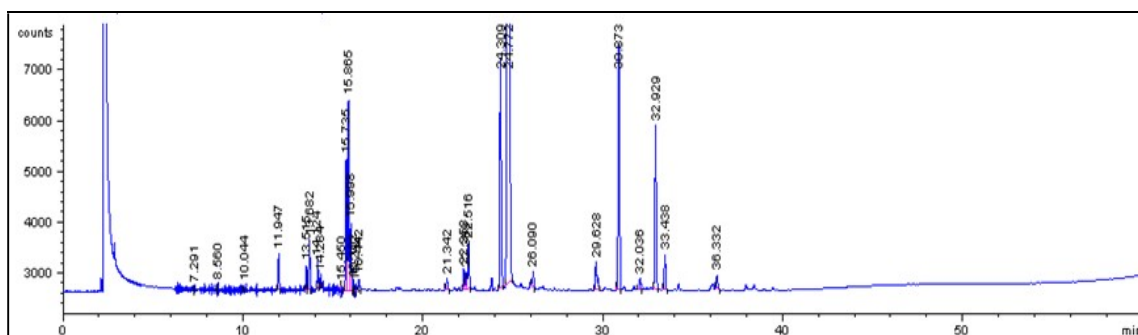
Slika 6a. GC-hromatogram etarskog ulja sveže herbe *Mentha longifolia*



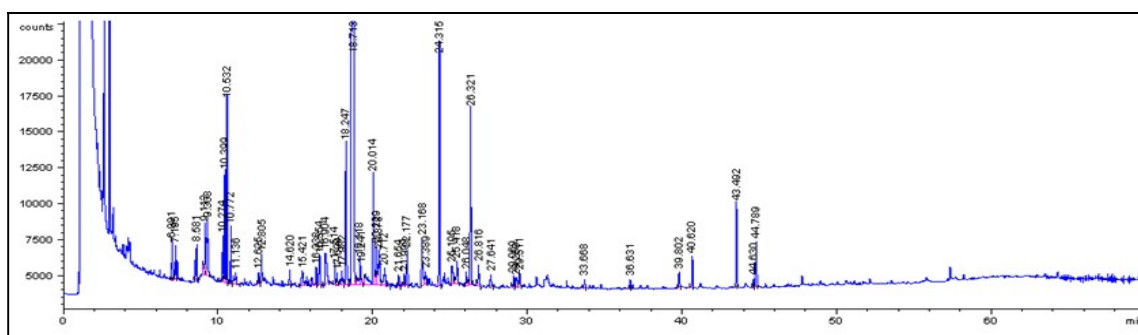
Slika 6b. GC-hromatogram etarskog ulja prirodno sušene herbe *Mentha longifolia*



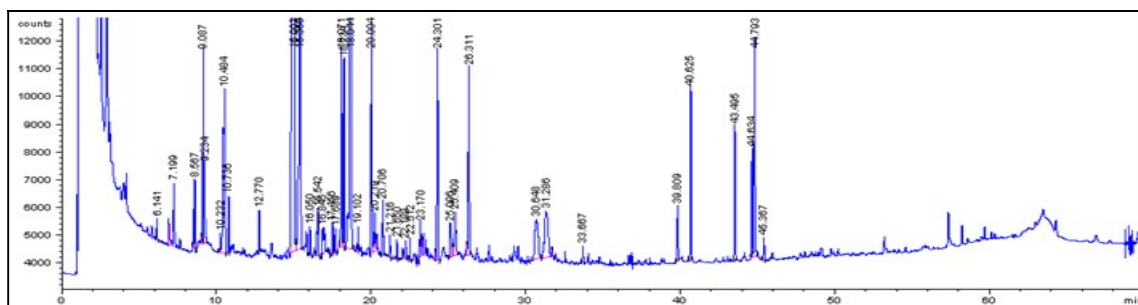
Slika 6c. GC-hromatogram etarskog ulja herbe sušene u lab. sušnici *Mentha longifolia*



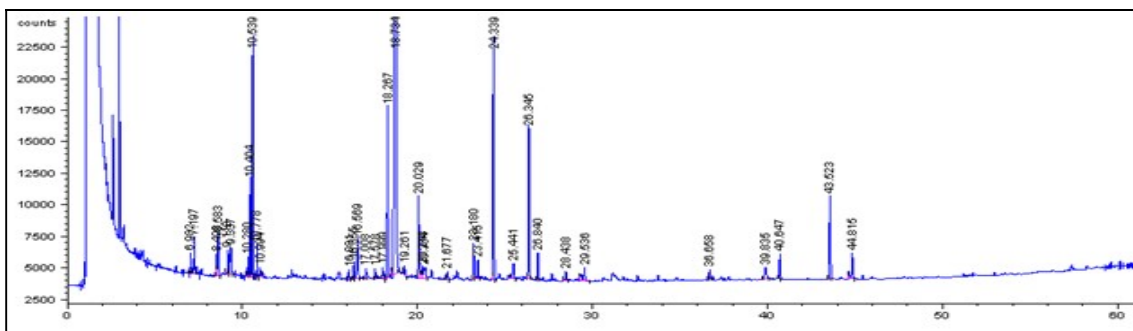
Slika 6d. GC-hromatogram etarskog ulja herbe sušene u niskotemperaturnoj sušari *Mentha longifolia*



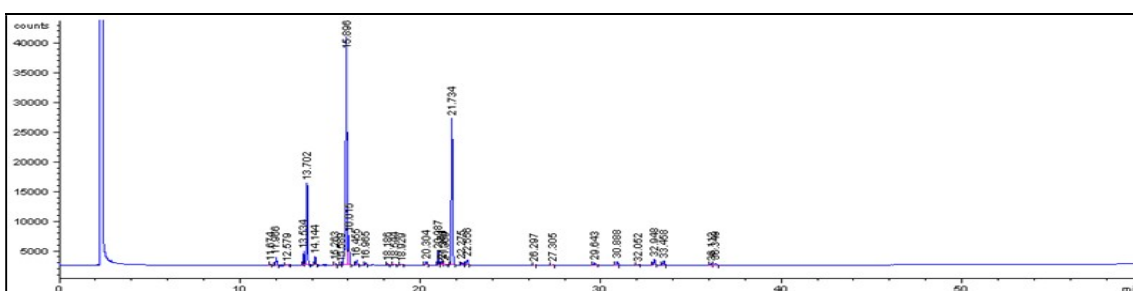
Slika 6e. GC-hromatogram ekstrakta suve herbe *Mentha longifolia* prirodno sušene



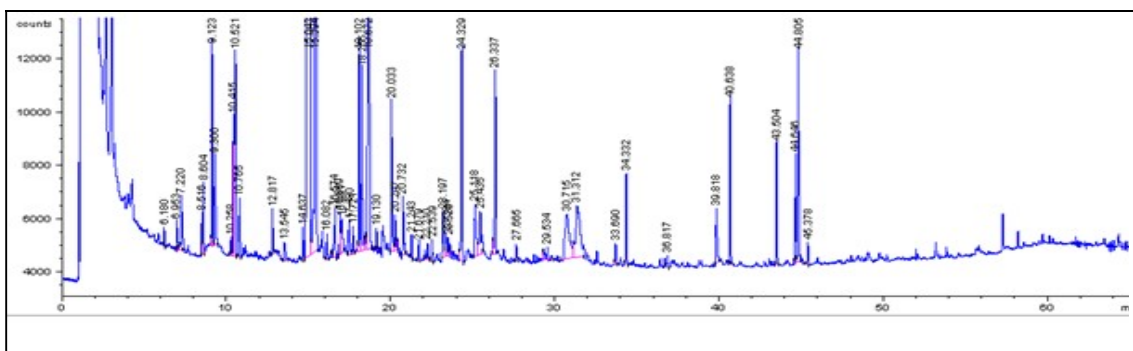
Slika 6f. GC-hromatogram ekstrakta suve herbe *Mentha longifolia* sušena u lab. Sušnici



Slika 6g. GC-hromatogram ekstrakta suve herbe *Mentha longifolia* sušena u niskotemperaturnoj sušnici

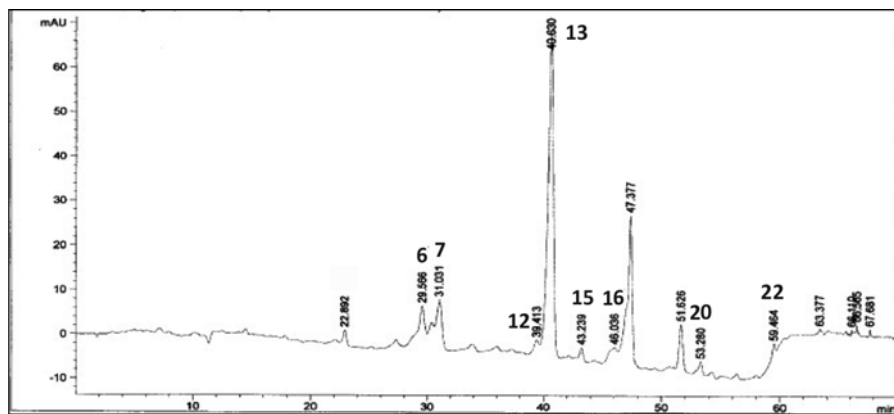


Slika 7a. GC-hromatogram etarskog ulja herbe *Hyssopus officinalis*

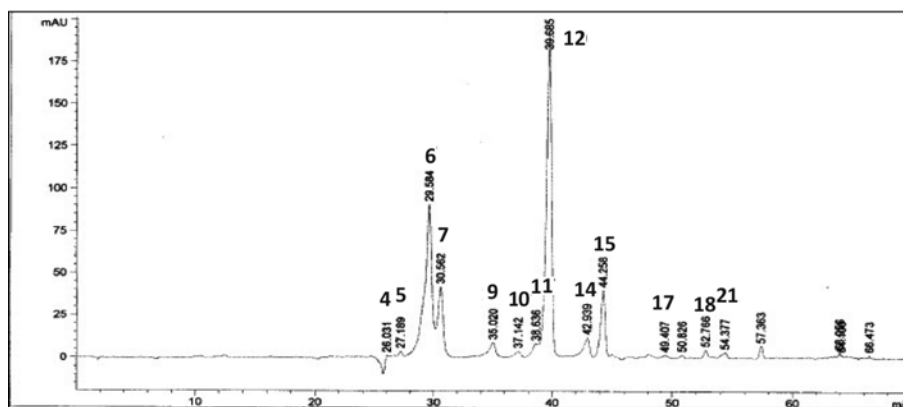


Slika 7b. GC-hromatogram ekstrakta herbe *Hyssopus officinalis*

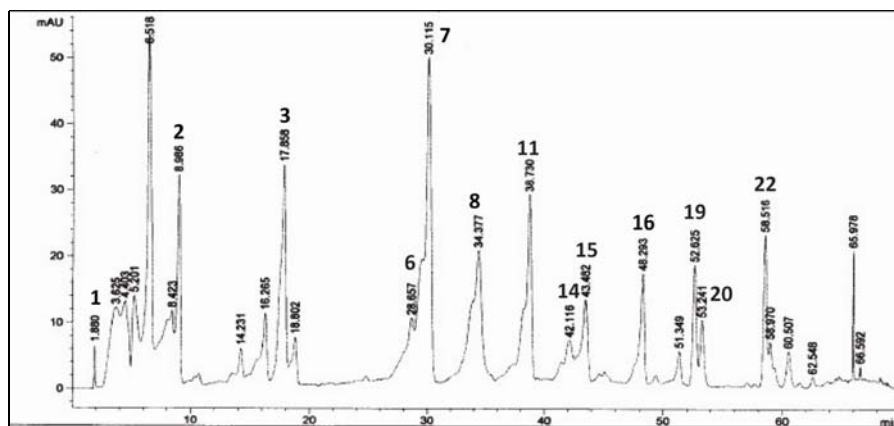
PRILOG 3. HPLC hromatogrami ekstrakata



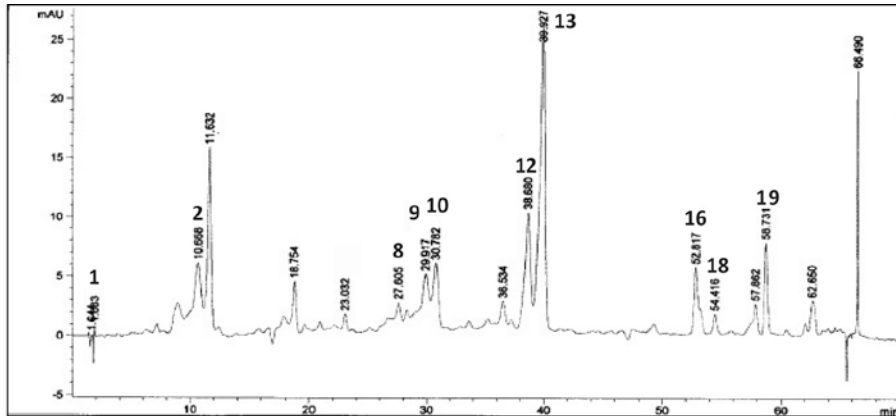
Slika 8. HPLC hromatogram ekstrakta *Satureja kitaibelii*



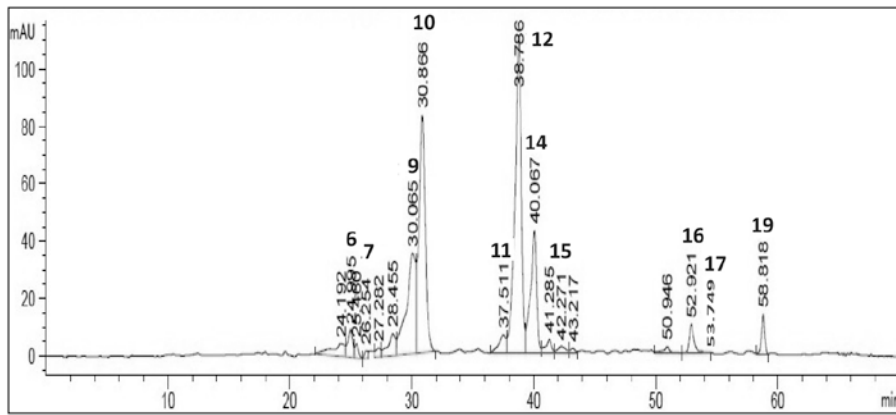
Slika 9. HPLC hromatogram ekstrakta *Origanum vulgare*



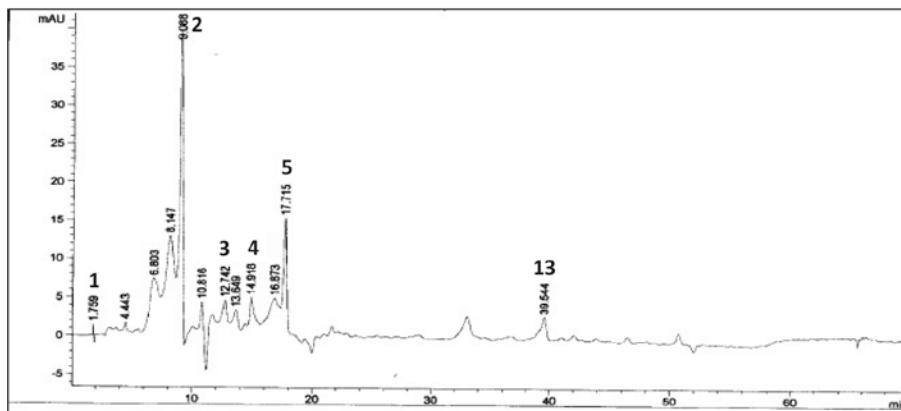
Slika 10. HPLC hromatogram ekstrakta *Artemisia alba Turra*



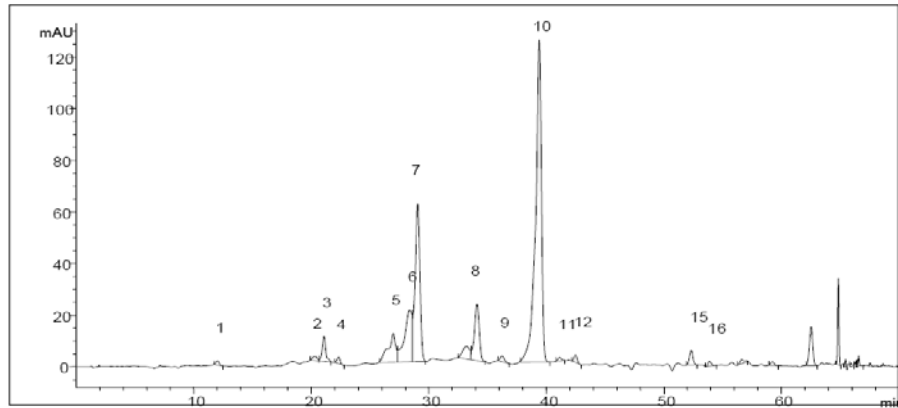
Slika 11. HPLC hromatogram ekstrakta *Nepeta nuda*



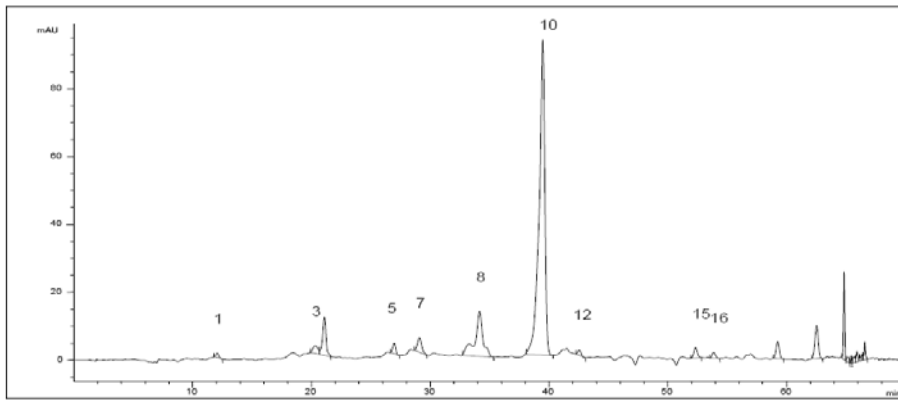
Slika 12. HPLC hromatogram ekstrakta *Thymus serpyllum*



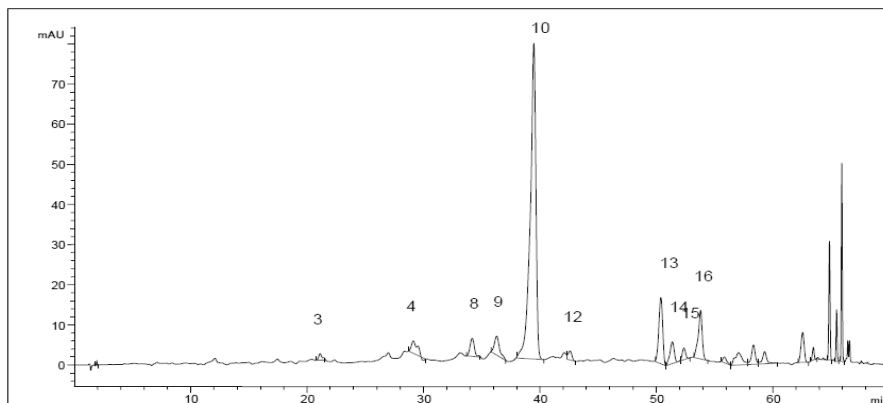
Slika 13. HPLC hromatogram ekstrakta *Hyssopus officinalis*



Slika 14. HPLC hromatogram ekstrakta *Mentha longifolia* dobijenog iz biljnog materijala sušenog normalnim putem

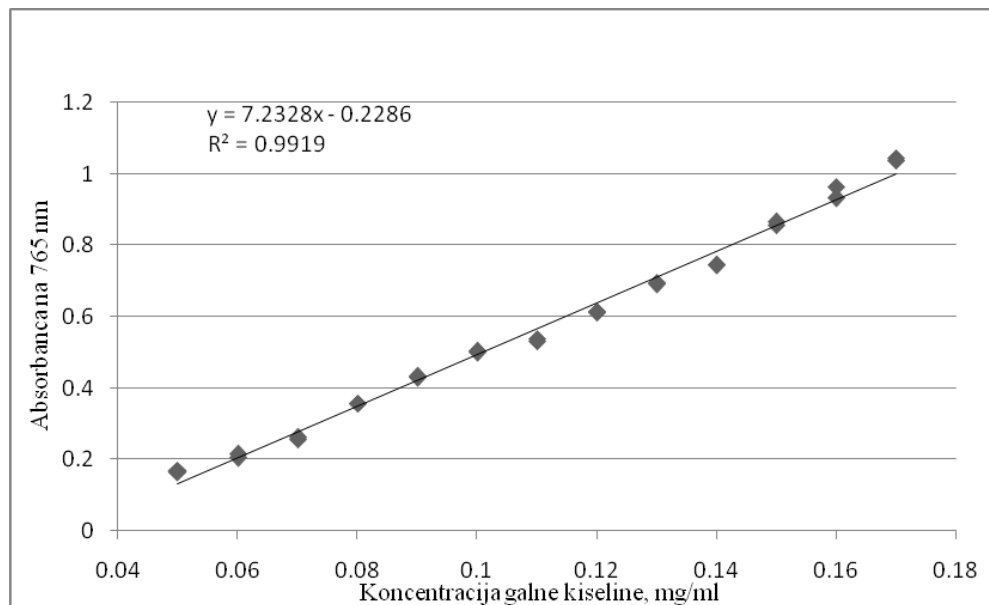


Slika 15. HPLC hromatogram ekstrakta *Mentha longifolia* dobijenog iz biljnog materijala sušenog u niskotemperaturnoj kondenzacionoj sušari

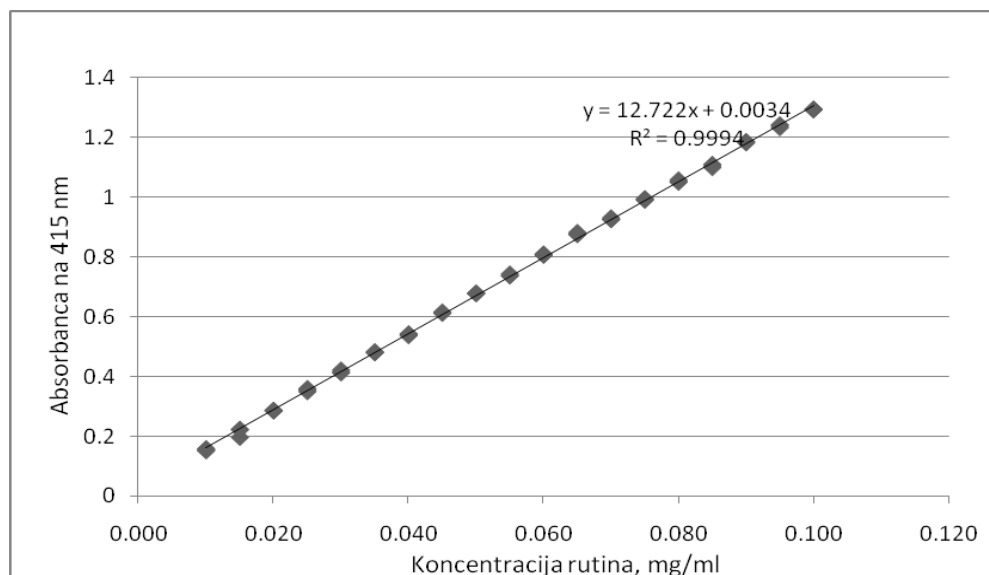


Slika 16. HPLC hromatogram ekstrakta *Mentha longifolia* dobijenog iz biljnog materijala sušenog u laboratorijskoj sušnici

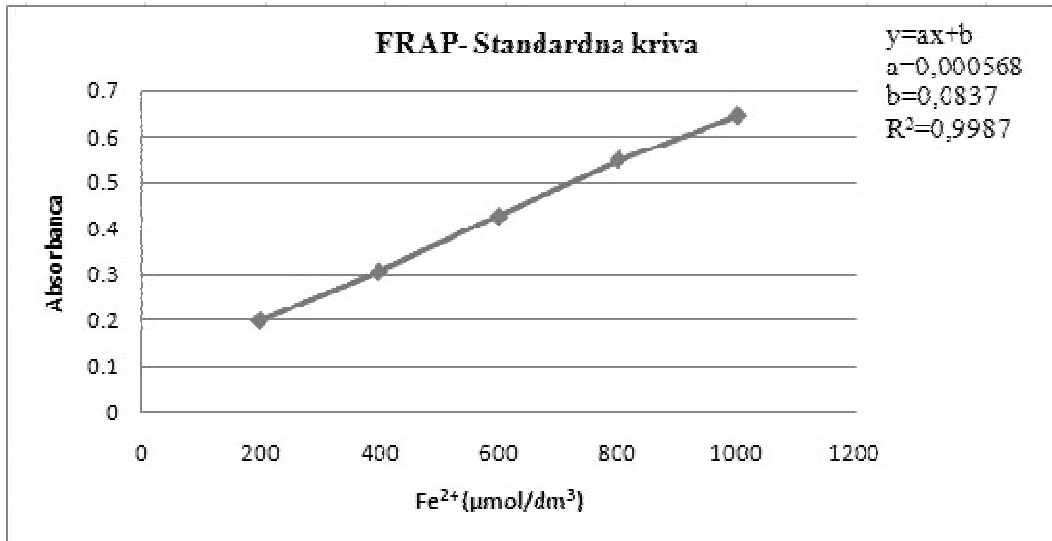
PRILOG 4. Kalibracione krive (galna kiselina, rutin i FRAP)



Slika 17. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbanacije od koncentracije galne kiseline

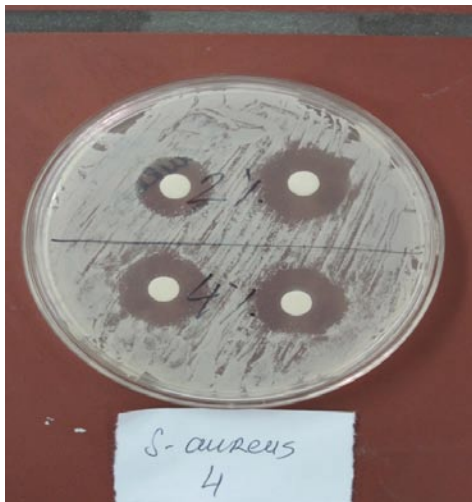


Slika 18. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbanacije od koncentracije rutina



Slika 19. Standardna kriva za FRAP

PRILOG 5. Zone inhibicije (difuzioni test)



a)



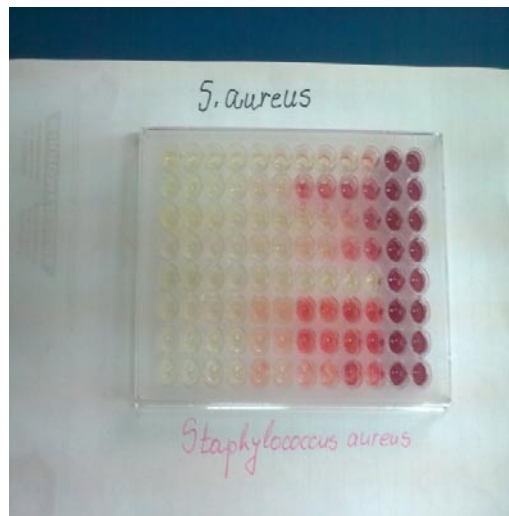
b)

Slika 20. Prečnici zona inhibicije prouzrokovani dejstvom etarskog ulja a) *N. nuda* i b) *T. serpyllum* na bakteriju *Staphylococcus aureus*

PRILOG 6. Mikrodiluciona metoda ekstrakata i etarskih ulja



a)



b)

Slika 21. Osetljivost bakterijskog soja *Staphylococcus aureus* a) ekstrakt i b) etarsko ulje

Biografija autora

Dragana Stanisavljević je rođena 10.09.1972 godine u Raški, opština Raška. Osnovne studije završila je 28. juna 1997. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, odsek Prehrambena tehnologija, grupa Tehnologija biljnih proizvoda, sa prosečnom ocenom za vreme studiranja 8,37. Iste godine upisala je poslediplomske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, a dana 11. jula 2007. godine odbranila magistarsku tezu. Prosečna ocena na poslediplomskim studijama je 9,83.

Od 01.03. 2008. godine zaposlena je na Visokoj poljoprivredno - prehrambenoj školi strukovnih studija u Prokuplju i to kao predavač na predmetima iz uže naučne oblasti - Tehnologija konzervisanja. Od 2010 godine aktivno je učestvovala i na poslovima rukovođenja Sistemom kvaliteta i akreditacije laboratorije na Visokoj poljoprivredno - prehrambenoj školi strukovnih studija u Prokuplju.

Autor je 14 radova, od kojih je 1 rad objavljen u međunarodnom časopisu M23, 2 rada objavljena u časopisima nacionalnog značaja, 1 rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u celini, 8 radova saopštena na skupovima međunarodnog značaja štampanih u izvodu, 2 rada saopštena na skupu nacionalnog značaja štampanih u izvodu.