



UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

dipl. inž. Marija Radojković

Ekstrakti dudu (*Morus spp.*, *Morasceae*), sastav, delovanje i primena

DOKTORSKA DISERTACIJA



Mentor: Prof. dr Zoran Zeković

Novi Sad, 2012

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

TD

Monografska dokumentacija

Tip zapisa:

TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

VR

Doktorska disertacija

Ime i prezime autora:

AU

Marija Radojković, dipl. inž.

Mentor:

MN

Dr Zoran P. Zeković, redovni profesor

Naslov rada:

NR

Ekstrakti duda (*Morus spp.*, *Morasceae*), sastav, delovanje i primena

Jezik publikacije:

JP

Srpski, latinica

Jezik izvoda:

JI

srp. / eng.

Zemlja publikovanja:

ZP

Republika Srbija

Uže geografsko područje:

UGP

AP Vojvodina

Godina:

GO

2012.

Izdavač:

IZ

Autorski reprint

Mesto i adresa:

MA

21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: 7 poglavlja, 151 stranica, 57 slika, 38 tabela, 272 citata, 4 priloga
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Farmaceutsko inženjerstvo
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: *Morus nigra* L., *Morus alba* L., dud, ekstrakcija, superkrična ekstrakcija, polifenolna jedinjenja, masne kiseline, antioksidativno delovanje, citotoksično delovanje
PO

UDK 582.635.2:66.061

Čuva se: Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1,
ČU 21000 Novi Sad

Važna napomena: Nema
VN

Izvod: Upotrebom različitih ekstragenasa izvršena je ekstrakcija ploda, lista i
IZ korena belog (*Morus alba* L.) i crnog dudu (*Morus nigra* L.). Ekstrakcija etanolom je izvršena pri predhodno određenim optimalnim uslovima ekstrakcije (70% koncentracija etanola, temperatura 60°C i odnos rastvarač:droga 20 ml/g). Ispitan je hemijski sastav ekstrakata različitih delova dudu. Ispitivanja hemijskog sastava etanolnih ekstrakata obuhvatala su određivanje sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih i monomernih antocijana, kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih komponenata, kao i sadržaj mikro-, makro- i toksičnih elemenata. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je u ekstraktu korena *M. nigra* (186 mg EHK/g), a najveći sadržaj flavonoidnih jedinjenja u ekstraktu lista *M. nigra* (67 mg ER/g). U ekstraktima lista dudu po svom sadržaju u odnosu na ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja ističe se kafena kiselina (od 53,34 do 62,11%), dok se u ekstraktima korena izdvaja hlorogenska kiselina (udeo veći od 74%). U pogledu mineralnog sastava ekstrakata relativno veliki sadržaj Ca i Mg je karakterističan za obe vrste ekstrakata (veći od 1.400 µg/g). Mikroelementi u svim ispitanim uzorcima dudu po opadajućem nivou, su Fe, B, Zn, Cu i Mn. U ekstraktima dobijenim superkričnim CO₂ određen je sadržaj masnih kiselina i ukupnih karotenoida. U ispitivanim ekstraktima dominante su nezasićene masne kiseline, linolna i linolenska kiselina, a značajan je udeo i zasićene masne kiseline (palmitinske kiseline). Ispitivanje delovanja ekstrakata obuhvatalo je evaluaciju antioksidativne aktivnosti praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije. Po svim primenjenim metodama najveću aktivnost je pokazao ekstrakt lista crnog dudu. U završnoj fazi rada ispitana je *in vitro* citotoksična aktivnost ekstrakata dudu, njihovim delovanjem na rast tri ćelijske linije: Hep2, RD i L2OB. Ekstrakti lista *M. nigra* su se pokazali kao najpotentniji inhibitori

rasta na sve tri ćelijske linije ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/g}$). Na osnovu svih sprovedenih ispitivanja kao proizvod sa najboljim karakteristikama pokazao se ekstrakti lista *M. nigra*.

Datum prihvatanja teme 10.02.2012.

od strane NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

predsednik: dr Žika Lepojević, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu

član: dr Zoran Zeković, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu

član: dr Gordana Četković, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu

član: dr Jelena Živković, docent, Medicinski fakultet u Nišu

University of Novi Sad

Faculty of Technology

Key word documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph documentation

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Marija Radojković

AU

Mentor: Prof. dr. Zoran P. Zeković

MN

Title: Mulberry extracts (*Morus* spp., *Morasceae*), composition, activity and application

TI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serbian/English

LA

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2012

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

PP

Physical description: 7 chapters, 151 pages, 57 figures, 38 tables, 272 references, 4 accessories

PD

Scientific field Technological engineering

SF

Scientific discipline Pharmaceutical engineering

SD

Subject, Key words *Morus nigra* L., *Morus alba* L., mulberry, extraction, supercritical extraction, phenolic compounds, fatty acids, antioxidant activity, citotoxic activity

SKW

UC 582.635.2:66.061

Holding data: Library of Faculty of Technology, Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Bulevar cara Lazara 1

HD

Note: None

N

Abstract:

AB

Using different extraction solvents extracts of fruit, leaves and roots of white (*Morus alba* L.) and black mulberry (*Morus nigra* L.) were prepared. Extraction by ethanol was carried out at the previously determined optimal extraction conditions (70% ethanol concentration, temperature 60°C and the ratio of solvent: drug 20 ml/g). The chemical composition of extracts obtained from different parts of the mulberry were analysed. These analyses included the determination of total phenols, total flavonoids, monomeric and total anthocyanins, qualitative and quantitative composition of polyphenolic components, and the content of micro-, macro- and toxic elements. The highest phenolic content was determined in the extract of *M. nigra* root (186 mg ECA/ g), while the highest content of flavonoid compounds was determined in the extract of *M. nigra* leaves (67 mg ER/g). In the case of mulberry leaf extracts dominant phenolic compound, in relation to the total phenolic content, was caffeic acid (with contribution from 53.34 to 62.11%), while in the extracts of root extracts dominant phenolic compounds was chlorogenic acid (a higher proportion of 74%). In terms of mineral composition of the extracts relatively high content of Ca and Mg was characteristic of both types of extracts (greater than 1,400 mg/g). Measured content of trace elements in mulberry extracts decrease in the next order: Fe> B> Zn> Cu> Mn. In the extracts obtained by supercritical CO₂ fatty acids and total carotenoids were determined. In these extracts dominant unsaturated fatty acids were linoleic and linolenic acid. Also, significant proportion of saturated fatty acid (palmitic acid) has been detected.

Testing of extracts activity included the evaluation of antioxidant activity applying the methods based on: neutralize free radicals, reducing power

potential and the inhibition of lipid peroxidation. All applied methods showed the highest activity of black mulberry leaf extract. In the final phase of work *in vitro* cytotoxic activity of mulberry extracts was examined. Their effect on growth of three cell lines: Hep2, RD, and L2OB were analysed. Extracts of *M. nigra* proved to be the most potent inhibitors of growth in all three cell lines ($IC_{50} < 30$ mg/g). On the basis of all conducted tests it has been proven that *M. nigra* extracts are products with the best characteristics.

Accepted on Scientific

10th February 2012

Board on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

president: Dr Žika Lepojević, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

member: Dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

member: Dr Gordana Četković, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

member: Dr Jelena Živković, docent, Medicinal Faculty, Niš, Serbia

Verujem da je ovo pravo mesto, a i odgovarajući trenutak u kome mogu pokušati da objedinim utiske od predhodnih nekoliko godina i da izrazim svoju zahvalnost svima koji su doprineli da one budu jedno nezamenljivo iskustvo. Kada sam započela svoje doktorske studije, krajem 2007. godine, iako je oblast ekstrakcije, lekovitog bilja, fitopreparata i same upotrebe ekstrakata bio uveliko poznat, malo ljudi je verovalo u moje snove, iluzije i put kojim sam krenula. U tom trenutku nisam ni pomišljala da će toliko snage i energije biti potrebno za realizaciju mojih ideja, zbog čega osećam potrebu da se svima koji su se našli na tom putu ovom prilikom zahvalim.

Prvenstveno zahvalnost dugujem onima koji su svakodnevno bili prisutni: mentoru prof. dr Zoranu Zekoviću zahvaljujem na pomoći i vođenju tokom postdiplomskih studija, na stručnim sugestijama i komentarima prilikom istraživanja i pisanja rada. Koleginici dr Senki Vidović sa kojom sam načinila svoje prve istraživačke korake u oblasti farmaceutske tehnologije i koja je konstruktivnim sugestijama podstakla moje analitičko razmišljanje, veliko hvala. Slavici Ostojić na pruženom prijateljstvu, razumevanju i svakodnevnoj podršci prilikom izvođenja eksperimentalnog dela rada i onda kada nije bilo sve po planu. Iskreno se zahvaljujem i prof. dr Žiki Lepojeviću na korisnim savetima i pomoći u razvoju ovog rada, Svetlani Milošević i Aleksandri Cvetanović na saradnji u svakodnevnim obavezama jednog istraživača.

Zahvalnost dugujem i članovima komisije, prof. dr Gordani Četković i doc. dr Jeleni Živković koje su u završnoj fazi pisanja rada dale vredne stručne savete i sugestije.

Takođe, hvala Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije, koje je finansiralo projekat TR31013, u okviru koga je i rađena ova teza.

Veliko hvala ljudima koji su slučajno ili namerno dali lični pečat eksperimentalnim rezultatima i ovom radu. Veliku zahvalnost dugujem profesoru dr Veber Marjanu i doc. dr Kočar Dragu sa Fakulteta za hemiju i hemijsku tehnologiju Univerziteta u Ljubljani, koji su mi približili i oblast hromatografije i pomogli u razumevanju problematike HPLC i LC/MS/MS analiza. Dr Miljani Stojanović koja nije više među nama, a bila je prisutna na samom početku mog rada, koja je ljudskim i stručnim savetima ukazivala na pravac kretanja u oblastima koje sam odabrala, dugujem duboku zahvalnost. Koleginici dr Steli Jokić, sa Prehrambeno tehnološkog fakulteta Univerziteta u Osijeku, hvala na idejama i istrajnosti u izradi eksperimentalnog dela, oblasti optimizacije i statističke obrade rezultata. Hvala kolegi dr Pavlu Maškoviću, sa Agronomskog fakulteta u Čačku, na svesrdnoj pomoći i organizovanju analiza koje su neizostavni deo ovog rada. Docentu dr Biljani Dojčinović i prof. dr Draganu Manojloviću, sa Hemijskog fakulteta u Beogradu, na izvođenju ICP/OES analize mojih uzoraka. Dr Anamariji Mandić, sa Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu zahvaljujem na pomoći u realizaciji HPLC analiza. Docent dr Goranu Anačkovu, sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, hvala za ukazanu pomoć i trud oko determinacije mojih uzoraka. Dr Rezici Sudar, naučnom savetniku sa Poljoprivrednog instituta u Osijeku, na pomoći oko HPLC analize šećera. Dragoj prof. dr Radmili Marinković-Nedučin hvala na nesebičnoj veri u mene i nastojanju da istrajem do samog kraja. Kolektivu Istraživačke stanice Petnica, posebno Ljubici Perić, na pozitivnom stavu, toleranciji i razumevanju mojih ambicija.

Hvala mojim kolegama sa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu koji su bilo odobravanjem ili negodovanjem podstakli moj radni motiv i želju da istrajem do kraja. Hvala svim mojim kolegama studentima na entuzijazmu i osmesima od ranih jutranjih sati.

Naravno, hvala mojim dragim i mnogobrojnim drugarima i prijateljima koji su imali razumevanja za moj rad i ambicije tokom ovih godina. Lista imena svih ljudi je zaista dugačka, stoga znam da će se oni sami prepoznati bez da ih sve poimence pomenem i da će samom i dalje deliti postignute uspehe. Ipak, posebno hvala Danijelu, Heleni i Bojani na šetnji po livadama i sakupljanju materijala za rad, a posebno na velikom optimizmu i podršci za životne poduhvate. Hvala, Ani koja je doprinela da ovaj rad vizuelno u potpunosti bude u skladu sa mojim željama. Danijelu na nesebičnom razumevanju i podršci i onda kada su moje zamisli bile teško ostvarive.

Mojoj porodici, roditeljima i sestri, na pruženim prilikama da učim i radim ono što volim i na svemu što su učinili da danas budem to što jesam.

Marija

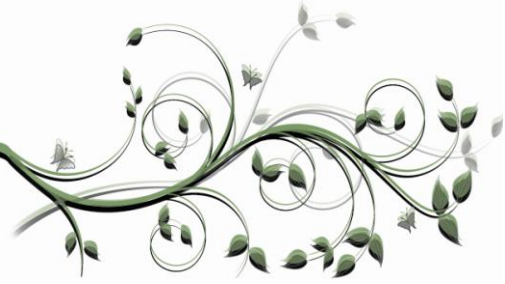
SADRŽAJ



1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. FITOPREPARATI	3
2.1.1. METABOLITI BILJAKA	6
2.2. FITOHEMIKALIJE	8
2.2.1. POLIFENOLI, FENOLNA JEDINJENJA	9
2.2.2. KAROTENOIDI	15
2.2.3. STEROLI	16
2.2.4. MIKRO-, MAKRO- I TOKSIČNI ELEMENTI	17
2.2.5. MASNE KISELINE	22
2.3. TAKSONOMSKI POLOŽAJ, BIOLOŠKE I HEMIJSKE KARAKTERISTIKE VRSTA	
RODA MORUS	24
2.3.1. TAKSONOMIJA	24
2.3.2. GEOGRAFSKO POREKLO I RASPROSTRANJENOST	25
2.3.3. OPIS BILJKE	25
2.3.4. FITOHEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST VRSTA RODA MORUS	27
2.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES	32
2.4.1. ANTIOKSIDANSI I ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA	35
2.5. ANTIKANCEROGENO DELOVANJE	37
2.6. TOKSIČNOST I GENOTOKSIČNOST	40
2.7. EKSTRAKCIJA I EKSTRAKTI LEKOVITOG BILJA	41
2.7.1. EKSTRAKCIJA I OPTIMIZACIJA	43
2.7.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA	44
3. EKSPERIMENTALNI DEO	48
3.1. MATERIJAL	48
3.1.1. SIROVINE	48
3.1.2. KARAKTERIZACIJA PLODA <i>Morus</i> VRSTE	49
3.1.3. OSNOVNA HEMIJSKA ISPITIVANJA DROGE <i>Morus</i> VRSTE	50
3.1.4. PRIPREMA MATERIJALA ZA EKSTRAKCIJU	50
3.1.5. HEMIKALIJE I REGENSI	51
3.2. METODE	51
3.2.1. DOBIJANJE EKSTRAKTA	51
3.2.1.1. EKSTRAKCIJA ETANOLOM	52
3.2.1.2. SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA	55
3.2.2. ISPITIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA EKSTRAKATA	56

3.2.2.1. Ukupan prinos ekstrakcije	56
3.2.2.2. Sadržaj ukupnih fenola	57
3.2.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida	57
3.2.2.4. Sadržaj antocijana	58
3.2.2.5. HPLC analiza polifenolnih komponenti	59
3.2.2.6. HPLC analiza saharida	60
3.2.2.7. Sadržaj mikro-, makro- i toksičnih elemenata primenom ICP-OES metode	61
3.2.2.8. Sadržaj masnih kiselina primenom GC/FID metode	63
3.2.2.9. Sadržaj karotenoida	63
3.2.3. ISPITIVANJE DELOVANJA EKSTRAKATA	64
3.2.3.1. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE	64
3.2.3.1.1. DPPH metod	64
3.2.3.1.2. Reducing power metod	65
3.2.3.1.3. Neutralizacija HO radikala	65
3.2.3.1.4. Lipidni model sistem	67
3.2.3.2. CITOTOKSIČNO DELOVANJE	68
3.2.3.2.1. MTT test	68
3.2.3.3. TOKSIČNO I GENOTOKSIČNO DELOVANJE	69
3.2.3.3.1. Allium anafazno-telofazni test	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA	71
4.1. ISPITIVANJE OSOBINA POLAZNOG MATERIJALA	71
4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE	72
4.3. EKSTRAKCIJA ETANOLOM	82
4.3.1. ISPITIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA ETANOLNIH EKSTRAKATA	83
4.3.1.1. Određivanje polifenolnog sastava jedinjenja u ekstraktima duda	83
4.3.1.2. HPLC analiza polifenolnih komponenata	84
4.3.1.3. HPLC analiza saharida	90
4.3.1.4. Sadržaj mikro-, makro- i toksičnih elemenata primenom ICP-OES metode	91
4.4. SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA	94
4.4.1. ISPITIVANJE LIPOFILNOG SASTAVA EKSTRAKATA PLODA I LISTA DUDA	96
4.4.1.1. Sadržaj masnih kiselina primenom GC/FID metode	96
4.4.1.2. Sadržaj ukupnih karotenoida	99
4.5. ISPITIVANJE DELOVANJA EKSTRAKATA	99
4.5.1. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE	99
4.5.2. CITOTOKSIČNO DELOVANJE	105
4.5.3. TOKSIČNO I GENOTOKSIČNO DELOVANJE	107
5. ZAKLJUČCI	111
6. LITERATURA	114
7. PRILOZI	132

1. UVOD



Povezanost čoveka i biljaka datira još od davnina. Čovek je biljke prvenstveno koristio u ishrani, a kasnije i u lečenju. Kroz istoriju čovečanstva, biljke su dobijale sve veći značaj kao izvor biološki aktivnih supstanci i lekova. Neki farmakokinetičari kinesku knjigu o korenju i travama „Pen Tsao”, autora Shen Nunga (2900 godina p.n.e.) smatraju najstarijom farmakopejom na svetu i ona obuhvata opis 365 biljnih droga, od kojih se mnoge i danas upotrebljavaju. Broj cvetnica koje su do danas hemijski ispitane čini samo 10%, od ukupno 250.000 vrsta na planeti, zbog čega se može zaključiti da biljni svet i dalje predstavlja nepresušan i još nedovoljno istražen resurs biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja. Tokom XX veka trend primene kombinatorne hemije u dizajniranju lekova, pogotovo HTS skrininga (*High Throughput Screening*), doveo je do pada interesovanja za prirodne proizvode. Kako su očekivanja ovih istraživanja precenjena, u poslednjih nekoliko godina svetska naučna javnost ponovo se usmerava na istraživanja prirodnih molekula kao novih lekova i primenu fitoterapije. Pored neospornog značaja za farmaceutsku industriju, prirodni proizvodi biljaka nalaze široku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava ispoljava i određene farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje, što je od velikog značaja u prevenciji nastanka bolesti savremenog čoveka. Zbog toga je ispitivanje biološke aktivnosti i hemijska karakterizacija do sad neispitanih biljnih vrsta od izuzetnog naučnog i praktičnog interesa, jer vode ka novim izvorima potentnih, biološki aktivnih prirodnih proizvoda.

Na teritoriji Balkanskog poluostrva rastu dve vrste roda *Morus*: *Morus alba* i *Morus nigra* koji su u narodu poznatije pod imenom beli i crni dud, šamdud ili murva. Biljke ovog roda su delimično poznate u tradicionalnoj medicini u kojoj su našle primenu u lečenju dijareje, sniženju krvnog pritiska, zarastanju rana i dr. Na našem podneblju plod duda (dudinje) je minimalno zastupljen u ishrani, a još manje je istražen u pogledu hemijskog sastava i lekovitog delovanja. Da plod, list, kora i koren drveta duda imaju veoma blagotvorna dejstva poznato je iz iskustava tradicionalnih istočnjačkih medicina. U zemljama poput Kine, Indije i Japana dud se koristi svakodnevno u obliku čajeva, tinktura, u svežem ili suvom stanju, ili u obliku raznih preparata na bazi ekstrakata. Fitopreparati dobijeni od različitih vrsta duda u pomenutim zemljama poznati su kao dobri analgetici, diuretici, antiseptici, antidijabetici, sedativi, hipoglikemici, kao i antiinflamatorni i hipotenzivni agensi, odnosno sredstva protiv crevnih parazita i nesаницe.

Polazeći od pretpostavke da bi do sada neistražene vrste roda *Morus* koje rastu na teritoriji Balkanskog poluostrva mogle biti potencijalni izvori farmakološki aktivnih

jedinjenja, ova doktorska teza imala je za cilj sprovođenje detaljnih fitohemijskih i biohemijskih ispitivanja dve vrste duda sa teritorije Vojvodine i to: *Morus alba* L. (beli dud) i *Morus nigra* L. (crni dud). Izvršena je ekstrakcija ploda, lista i korena duda, i analiza sastava dobijenih ekstrakata, identifikacija farmakološki značajnih komponenata prisutnih u ekstraktima, kao i ispitivanje potencijalnog delovanja i moguće primene ekstrakata duda u ishrani i farmaciji.

Istraživanje je bazirano na dobijanju i ispitivanju različitih ekstrakata ploda, lista i korena duda. Ekstrakcija etanolom kao ekstragensom izvršena je pri optimalnim uslovima, koji su predhodno određeni. Fitohemijsko ispitivanje etanolnih ekstrakata obuhvatalo je spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukunih fenola, flavonoida i antocijana. Određene su i pojedinačne polifenolne komponente i saharidi primenom HPLC metode, mikro-, makro- i toksični elemenati ICP-OES metodom. U ekstraktima dobijenim primenom superkritičnog ugljendioksida ispitan je sastav masnih kiselina primenom GC/FID metode i sadržaj ukupnih karotenoida spektrofotometrijski. Cilj ispitivanja delovanja ekstrakata, bio je i evaluacija antioksidativne, citotoksične, toksične i genotoksične aktivnosti ispitivanih vrsta *Morus* radi utvrđivanja njihovog terapijskog potencijala. Procena antioksidativne aktivnosti vršena je na osnovu praćenja sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (DPPH[•] i OH[•]), redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije. Citotoksični potencijal ekstrakata određen je MTT testom u *in vitro* uslovima na tumorskim humnim ćelijama (RD, Hep2c i L2OB). Toksično i genotoksično delovanje ekstrakata duda utvrđeno je primenom Allium anafazno-telofaznog testa.

2. OPŠTI DEO



2.1. FITOPREPARATI

Fitoterapija je sklop farmakognozije i komplementarne medicine u tretiranju i prevenciji bolesti, a obuhvata lečenje, ublažavanje i prevenciju bolesti primenom lekovitog bilja, njihovih delova i biljnih proizvoda (ekstrakata, tinktura, itd.). To je prvi oblik medicine koji je čovek poznao, vekovima jedini oblik lečenja i ublažavanja bolesti. Najranije zabeleženi podaci mnogih naroda (starih Egipćana, Sumeraca, Asiraca, Grka, Kineza i Indijaca) govore o korišćenju biljaka u terapijske svrhe od strane čoveka. Ispitivanjem hemijskih, bioloških i farmakoloških osobina prirodnih proizvoda korišćenih u tradicionalnoj medicini širom sveta dobijeni su mnogi terapijski agensi koji se danas koriste u modernoj, konvencionalnoj medicini: morfin iz opijuma (*Papaver somniferum*) se koristi kao analgetik, digoksin i ostali glikozidi izolovani iz *Digitalis* spp. koriste se za lečenje bolesti srca, taksol iz pacifičke tise (*Taxus brevifolia*) za lečenje kancera, kinin izolovan iz kore kininovog drveta (*Cinchona* spp.) za lečenje malarije, aspirin iz kore vrbe (*Salix* spp.) kao analgetik, antipiretik i antiinflamator, kofein iz kafe (*Coffea arabica*) – stimulans (Heinrich i sar., 2004).

Tretman biljnim ekstraktima, kao i izolovanim prirodnim jedinjenjima i neorganskim jedinjenjima, je dugi niz godina predstavljao nezamenljivi i gotovo jedini poznati i dostupni vid lečenja (Chadwick i Marsh, 1990). Transformacija prirodnih jedinjenja izolovanih iz biljaka u polusintetičke derivate i sinteza analoga započinje početkom XIX veka sa razvojem farmaceutske industrije i farmaceutske hemije. Sredinom XX veka napredak hemije utiče na popularizaciju sinteze i proizvodnje lekova sintetičkih analoga kada „sintetički“ molekuli u potpunosti zamenjuju „prirodne“ lekove. Tada farmaceutske kompanije usmeravaju svoja istraživanja i ulažu kapital u dobijanje sintetičkih jedinjenja, dok razvoj kombinatorne hemije i računskog pristupa u dizajniranju novih lekova (*Computational Drug Design*) dodatno umanjuju interesovanje za prirodnim proizvodima kao potencijalnim izvorima novih lekova (Raskin i sar., 2002).

Poslednjih godina XX veka evidentno raste popularnost herbalne i homeopatske medicine u svetu, interesovanje za organskom (zdravom) hranom i prirodnom kozmetikom. Razlog popularizacije prirodnih proizvoda je moguća nebezbednost i toksičnost novosintetisanih jedinjenja po ljudsko zdravlje i životnu sredinu. Danas je na tržištu prisutan veliki broj proizvoda koji sadrže aktivne biljne sastojke – fitofarmaceutski proizvodi (fitopreparati, fitoterapeutici) koji ostvaruju oko 50% od ukupnog prometa na tržištu farmaceutskih proizvoda (Raskin i sar., 2002; Lalli, 2005). Biljka se može smatrati kompleksnom biohemijskom laboratorijom. Oružje odbrambenog sistema biljaka od

biljojeda, mikroba i virusnih infekcija čine brojna bioaktivna jedinjenja koje biljka sintetizuje. Nakon više od 100 godina istraživanja, samo trećina danas poznatih bolesti se može efikasno lečiti danas dostupnim lekovima. Činjenica, koja se ne sme ignorisati je da brojna biološki aktivna jedinjenja koje biljke poseduju su odabrana, razvijena i usavršena evolucijom u toku mnogo dužeg perioda nego što su to uradile ili to mogu uraditi farmaceutske kompanije (Raskin i sar., 2002).

Odakle potiče potreba za lekovima biljnog porekla? Paradigma zapadne medicine XX veka je nastojanje da se kompleksne bolesti leče „jednim molekulom“. Otpornost na antimikrobne i antitumorske lekove koja je poslednjih godina postala evidentna ukazuje na mane ovog postupka lečenja. Multifaktorijalna priroda određenih kompleksnih bolesti ukazuje na to da se mora pristupiti lečenju kombinacijom terapijskih agenasa. Nasuprot pristupu lečenja „jednim molekulom“, tradicionalna medicina istočnih naroda oduvek je smatrala da je kompleksne bolesti najbolje lečiti kombinacijom botaničkih i nebotaničkih lekova koje je neophodno prilagoditi pacijentu i stadijumu bolesti. U tradicionalnoj kineskoj i ajurvedskoj medicini je ovaj pristup najrazvijeniji, gde se ističe sinergistički efekat različitih komponenata kompleksnih medicinskih smeša. Očigledno je da su biljke razvile sličnu strategiju u odbrani od patogena, koji predstavljaju glavni uzrok njihovog oboljevanja i smrti (Stermitz i sar., 2000; Ball i sar., 2006). Na osnovu ovih činjenica može se zaključiti da ukoliko se pri lečenju određenih bolesti koriste fitoterapeutici, manja je mogućnost od pojave rezistentnosti zbog zajedničkog i sinergističkog dejstva više različitih bioaktivnih jedinjenja biljaka (Raskin i sar., 2002; Lalli, 2005). Iz navedenih razloga, poslednjih nekoliko decenija sprovedena su brojna istraživanja lekovitih, aromatičnih i ostalih biljaka sa ciljem razvoja novih, prirodnih formulacija i aditiva za prehrambenu, kozmetičku, farmaceutsku ili neku drugu primenu. Sve je veći broj naučno-istraživačkih timova koji se bave fitoterapijom i instituta orijentisanih samo na biljnu medicinu. Na Pekinškom univerzitetu trenutno je registrovano više od 3.500 naučnika koji učestvuju na istraživanjima biljaka i njihovih produkata, povezivanju tradicionalne i moderne herbalne medicine. Na teritoriji Velike Britanije postoji više od 15 registrovanih i priznatih udruženja i instituta koja se bave edukacijom i primenom fitoterapije (Vilkinson, 2003). Važnost istraživanja usmerenih u tom pravcu se može videti i iz činjenica da je čak 75% jedinjenja koja se danas koristi u medicinske svrhe biljnog porekla, a četvrtina od njih se još uvek izoluje iz biljne droge (Duke, 1990; Newman, 2007). Ispitivanje ovih biljnih vrsta naročito može biti interesantno ako se uzme u obzir rast popularnosti komplementarne i alternativne medicine u svetu poslednjih godina i trend rasta upotrebe prirodnih proizvoda za prevenciju i lečenje brojnih oboljenja (Golbeck-Wood i sar., 1996; Eisenberg i sar., 1998; Fisher i Ward, 1994; Thomas i sar., 2001; Mainardi i sar., 2009). Od oko 250.000 biljnih vrsta na Zemlji, mali procenat je hemijski, biološki i fiziološki ispitan. Do danas, 119 jedinjenja biljnog porekla se koriste kao lekovi, koja se izoluju iz samo 90 biljnih vrsta (Chadwick i Marsh, 1990; Lalli, 2005). Familije biljaka koje su našle primenu u dobijanju fitopreparata prikazane su u tabeli 1 (Thomson i sar., 2005; Shannon i sar., 2005; Wright i sar., 2008; Thomson, 2010).

Fitopreparati ili fitoterapeutici kao aktivne sastojke sadrže biljke, biljne delove ili njihove produkte. Dosadašnja istraživanja su pokazala da se veliki broj biljnih vrsta i familija može koristiti za formulaciju fitopreparata. Takvi fitopreparati su bazirani na aktivnim komponentama jedne biljne vrste ili kombinaciji više biljnih vrsta.

Tabela 1. Familije biljaka koje su našle primenu u dobijanju fitopreparata

Familija	Biljne klase (tradicionalno ime)	Dominantne klase jedinjenja
<i>Actinidiaceae</i>	kivi, kineski kivi (fizalis)	flavonoidi, triterpeni, tetraterpeni
<i>Alliaceae</i> (<i>Liliaceae*</i>)	aloa vera, špargla, vlašac, crni luk, beli luk, praziluk	neproteinske aminokiseline, flavonoidi, triterpeni, alkaloidi
<i>Anacardiaceae</i>	crne ribizle, mango	flavonoidi, tetraterpeni
<i>Annonaceae</i>	jabuka	alkaloidi, flavonoidi, poliketali
<i>Apiaceae</i> (<i>Umbelliferae*</i>)	šargarepa, celer, korijander, peršun, mirođija, morač, paškanat	tetraterpeni, monoterpeni, seskviterpeni, flavonoidi, felilpropani, poliacetileni, amini
<i>Asteraceae</i> (<i>Compositae*</i>)	artičoke, kamilica, ehinacea, maslačak, endivija, zelena salata, estragon	seskviterpeni, alkaloidi, flavonoidi, tetraterpeni, triterpeni, diterpeni, amini, cijanogeni glikozidi, monoterpeni, fenilpropani, neproteinske aminokiseline
<i>Brassicaceae</i> (<i>Cruciferae*</i>)	brokol, prokelj, kupus, karfiol, keleraba, rukola, kelj, repa, potočarka	glukozinolati, tetraterpeni, alkaloidi, flavonoidi, fenilpropani, neproteinske aminokiseline
<i>Bromeliaceae</i>	ananas	flavonoidi, alkaloidi, tetraterpeni
<i>Caricaceae</i>	papaja	glukozinolati
<i>Chenopodiaceae</i>	cvekla, zelje, spanać, blitva	alkaloidi, amini, neproteinske aminokiseline
<i>Convolvulaceae</i>	slatki krompir	alkaloidi, flavonoidi
<i>Cucurbitaceae</i>	krastavac, dinja, bundeva, tikva, lubenica	triterpeni, amini, neproteinske aminokiseline
<i>Ericaceae</i>	borovnica, brusnica	flavonoidi, triterpeni, fenilpropani
<i>Euphorbiaceae</i>	tapioka	glukozinolati, alkaloidi, flavonoidi, cijanogeni glikozidi, neproteinske aminokiseline, fenilpropani
<i>Fabaceae</i> (<i>Leguminosae*</i>)	soja, sočivo, pasulj, grašak, boranija	alkaloidi, flavonoidi, cijanogeni glikozidi, neproteinske aminokiseline, fenilpropani, diterpeni, triterpeni, amini
<i>Lamiaceae</i> (<i>Labiatae*</i>)	bosiljak, izop, lavanda, matičnjak, majoran, nana, origano, ruzmarin, žalfija, majčina dušica	alkaloidi, monoterpeni, triterpeni, flavonoidi, seskviterpeni, diterpeni, fenilpropani
<i>Lauraceae</i>	avokado, cimet	alkaloidi, flavonoidi, amini, fenilpropani, monoterpeni
<i>Malvaceae</i>	kakao	flavonoidi, alkaloidi
<i>Moraceae</i>	dud, smokva	flavonoidi, triterpeni, alkaloidi
<i>Musaceae</i>	bokvica, banana	flavonoidi, amini, neproteinske aminokiseline, tetraterpeni
<i>Palmae</i> (<i>Arecaceae*</i>)	kokos	alkaloidi, flavonoidi, tetraterpeni
<i>Piperaceae</i>	crni biber	amini, alkaloidi, fenilpropani, seskviterpeni
<i>Poaceae</i> (<i>Gramineae*</i>)	limun trava, pšenica, kukuruz, pirinač, bambus	alkaloidi, amini, cijanogeni glikozidi, flavonoidi, tetraterpeni, triterpeni, monoterpeni, seskviterpeni
<i>Polygonaceae</i>	heljda, zelje	flavonoidi, alkaloidi
<i>Rosaceae</i>	jabuka, kajsija, kupina, višnja, malina, jagoda, nektarina, breskva, kruška, dunja	fenilpropani, flavonoidi, tetraterpeni, monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni, alkaloidi, amini, cijanogeni glikozidi, triterpeni
<i>Rutaceae</i>	kari, grejpfut, limun, limeta, mandarina, pomorandža	alkaloidi, flavonoidi, triterpeni, monoterpeni, seskviterpeni, amini, fenilpropani, tetraterpeni

Sapindaceae	liči, javor	flavonoidi, alkaloidi, triterpeni, cijanogeni glikozidi, neproteinske aminokiseline
Solanaceae	paprika, krompir, paradajz, čili, plavi patlidžan	alkaloidi, seskviterpeni, fenilpropani, tetraterpeni, amini, flavonoidi
Vitaceae	grožđe	flavonoidi, fenilpropani, triterpeni

*alternativno ime familije

2.1.1. METABOLITI BILJAKA

Biološki aktivna jedinjenja, odgovorna za terapijsko delovanje, obično su koncentrisana u pojedinim biljnim organima (list, cvet, seme, koren, plod). Biljka uz pomoć atmosferskog ugljendioksida tokom procesa fotosinteze sintetise organske molekule koji se dele na primarne i sekundarne metabolite biljaka. Primarni metaboliti utiču na strukturnu funkciju same biljke, dok sekundarni metaboliti utiču na međucelijsko funkcionisanje biljke i reprodukciju unutar biljke, a nastaju kao odgovor na biotički i abiotički stres (Hartman, 2007).

U primarne metabolite biljaka spadaju ugljeni hidrati, masti, nukleinske kiseline i proteini. Od primarnih metabolita tri klase (ugljeni hidrati, masti i proteini) se smatraju strukturnim i hranljivim materijama. Oni su privukli posebnu pažnju u cilju ispitivanja i dokazivanja farmakološke aktivnosti (WCRF/AICR, 2008).

Sekundarni metaboliti biljaka mogu se svrstati u četrnaest osnovnih klasa jedinjenja (tabela 2) i procenjuje se da postoji preko 200.000 hemijskih struktura koje sintetisu biljke (Wink, 2003).

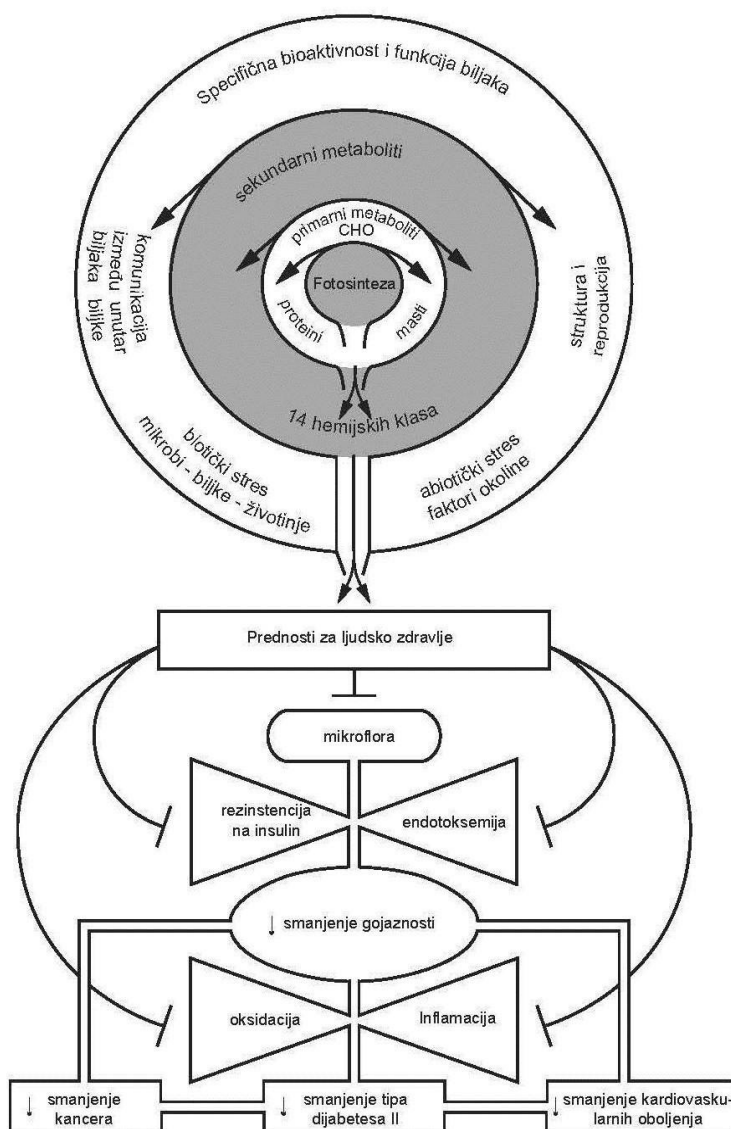
Tabela 2. Klase biljnih sekundarnih metabolita

Klasa
Alkaloidi
Amini
Cijanogeni glikozidi
Diterpeni
Flavonoidi
Glukoinolati
Monoterpeni
Neproteinske aminokiseline
Fenilpropani
Poliacetileni
Poliketoni
Seskviterpeni
Tertraterpeni
Triterpeni, saponini, steroli

S obzirom na dokazane biohemijske funkcije koje ova jedinjenja poseduju nije iznenađujuće da je ispitan veliki broj lekovitih delovanja. Na bazi bilja formulisano je više od 70% lekova koje se koriste u tradicionalnoj medicini i više od 50% lekova koji se koriste u klasičnoj medicini. Konkretno u terapiji kancera koristi se preko 60% lekova koji su bazirani

na biljnim produktima, tj. sekundarnim metabolitima (Gad, 2005). Razlozi za upotrebu metabolita biljaka i princip njihovog dejstva prikazani su na slici 1.

Biljke vezuju ugljendioksid tokom procesa fotosinteze i koriste ugljenik za sintezu primarnih i sekundarnih metabolita. S obzirom na to da primarni metaboliti, npr. ugljeni hidrati, proteini i lipidi, obezbeđuju strukturne i funkcionalne komponente biljkama, sekundarni metaboliti se koriste za komunikaciju, reprodukciju, odbranu, itd. Četrnaest klasa hemijskih komponenata se sintetiše u vidu sekundarnih metabolita biljaka i svaka od klasa vrši biološke aktivnosti koje imaju potencijal da unaprede ljudsko zdravlje kroz njihov efekat na metabolizam mikroorganizama i sisara putem uzimanja ovih hemikalija kao biljne hrane. Najviše hroničnih oboljenja na koje mogu uticati primarni i sekundarni metaboliti biljaka su: kancer, kardiovaskularna oboljenja, dijabetes tipa II i gojaznost, oboljenja koja izazivaju 60% letalnog ishoda u svetu. Na patogenezu ovih oboljenja utiču metabolički procesi koji zavise od biljnih metabolita: metabolizam glukoze, hronična inflamacija, povećana ćelijska oksidacija i hronična endotoksemija (Thomson i Thomson, 2010).

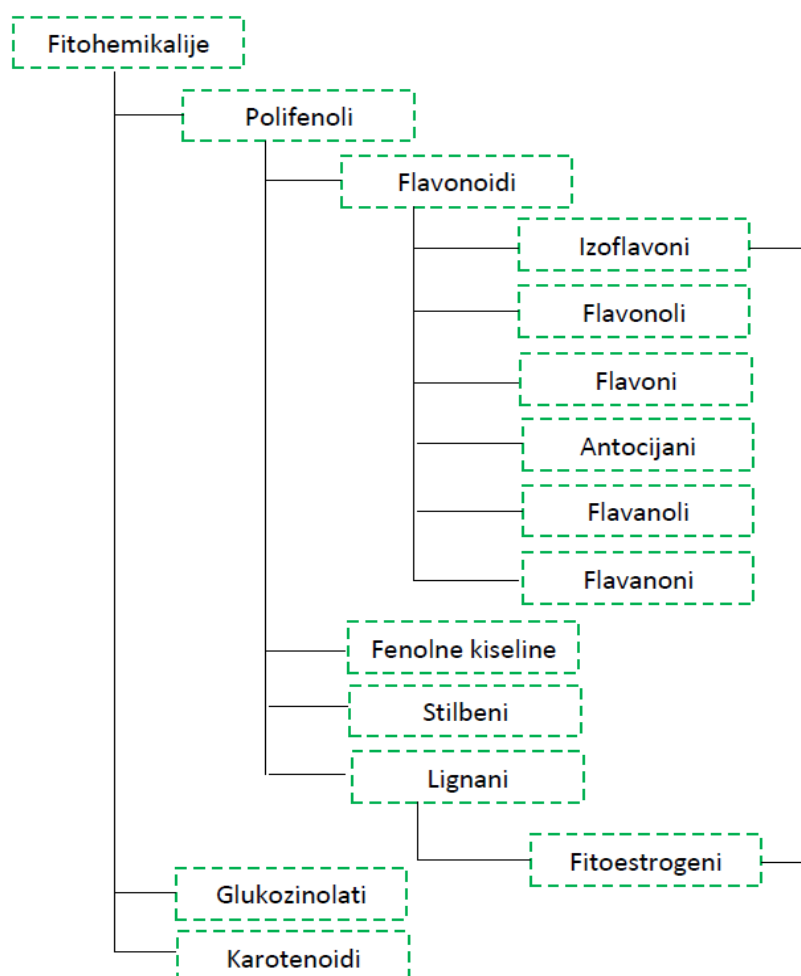


Slika 1. Integracija metabolita biljaka i životinja u prevenciju hroničnih oboljenja ljudi

2.2. FITOHEMIKALIJE

Lekovita svojstva biljaka poznata su od najranijih vremena ljudske civilizacije. Od tada pa sve do današnjih dana biljke su se upotrebljavale kao hrana, lekovi, konzervansi, u religiozne svrhe, za ukras, itd. Sve do razvoja hemije, a naročito sinteze organskih molekula u XIX veku, izvor farmakološki aktivnih supstanci bile su isključivo biljke (Kujundžić, 2002). Veliki broj eksperimenata, radova i studija ističe pozitivnu ulogu voća, povrća, žitarica i drugih jestivih biljaka, u preventivi i lečenju mnogih oboljenja kod čoveka (Moyer i sar., 2002). Takođe, rezultati dobijeni u poslednjih nekoliko godina ukazuju na visok sadržaj prirodnih antioksidanasa u biljkama (Keli i sar., 1996; Croft, 1999; Lea i Leegod, 1999).

Fitohemikalije su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju potencijalan pozitivan efekat na zdravlje, a nisu esencijalni nutrijenti (Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute). Poslednjih decenija su dobile posebno mesto u mnogim ispitivanjima, a naročito u istraživanjima antioksidativnih supstanci sa visokim antiradikalnim potencijalom. Na slici 2 su prikazane neke od podela fitohemikalija sa izraženim antioksidativnim delovanjem (Blasa i sar., 2010).



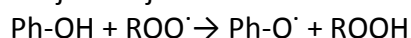
Slika 2. Različite grupe fitohemikalija sa izraženom antioksidativnom aktivnošću

2.2.1. FENOLNA JEDINJENJA

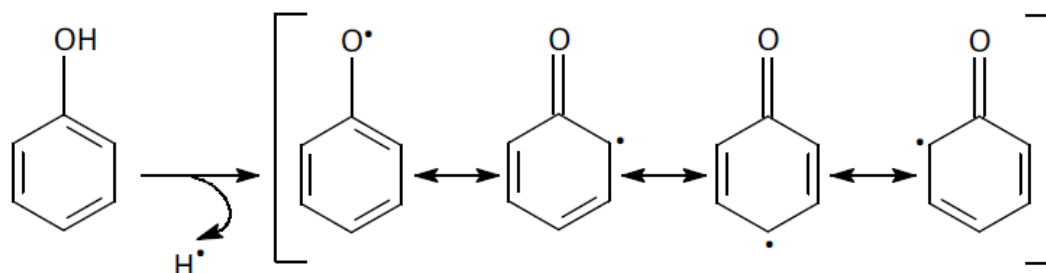
Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanasa. To su supstance koje u strukturi imaju jedan ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više hidroksilnih grupa i obično se dele na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, kumarine i tanine (Liu, 2004). Ove supstance se mogu naći u slobodnom obliku ili češće u obliku glikozida sa različitim šećernim ostacima ili u obliku kompleksa sa organskim kiselinama, aminima, lipidima, ugljenim hidratima i drugim polifenolnim jedinjenjima. Za biološku aktivnost je zaslužan isključivo aglikonski deo molekula. Fenolna jedinjenja u biljkama nisu ravnomerno raspoređena na nivou tkiva, ćelijskom i subćelijskom nivou. Nerastvorni fenoli su sastavni deo ćelijskog zida, dok se rastvorni fenoli nalaze unutar ćelijskih vakuola. Na nivou tkiva, površinski slojevi sadrže veći nivo fenola od onih koji se nalaze u njihovim središnjim delovima. Fenoli ćelijskog zida, kao što su lignini i hidroksicimetna kiselina, povezani su različitim ćelijskim komponentama. Ova jedinjenja doprinose mehaničkoj otpornosti ćelijskog zida, imaju regulatornu ulogu u rastu i morfogenezi biljke, kao i u reakciji na stres i patogene (Naczk, 2004). Akumulacija polifenolnih jedinjenja varira i u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke, kao rezultat ravnoteže između biosinteze i daljeg metabolizma (Macheix i sar., 1990; Harborne, 1994). Brojna istraživanja potvrđuju da je koncentracija polifenolnih jedinjenja manja u zrelom plodu, osim kod crvenih plodova kod kojih se flavonoidi i antocijani akumuliraju na kraju sazrevanja (Britton, 1983; Macheix i sar, 1990).

U biljnim organizmima polifenoli obavljaju niz funkcija koje imaju veliki uticaj na ekofiziologiju biljaka: deluju kao antioksidansi, antimikrobni agensi, fotoreceptori, vizuelni atraktanti nekih insekata važnih za oprašivanje cvetova, repelenti herbivora ili kao zaštita biljnih tkiva od prekomernog UV-zračenja (Pietta, 2000; Fang i sar., 2002; Heim i sar., 2002). Kao prirodni izvori polifenolnih jedinjenja u literaturi se najčešće spominju začinsko i lekovito bilje, ali izvori mogu biti i drugi prirodni izvori kao što su voće, povrće, seme uljarica, žitarice, brojni životinjski i mikrobiološki proizvodi (Naczk i Shahidi, 2006).

Polifenolna jedinjenja se smatraju vodećim jedinjenjima sa antioksidativnim delovanjem. Smatra se da je antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonika slobodnim radikalima (npr. u reakciji oksidacije lipida) nakon čega nastaju manje reaktivni fenoksil radikali:



Relativno velika stabilnost fenoksil radikala se objašnjava delokalizacijom elektrona, uz postojanje više rezonantnih formi (slika 3).



Slika 3. Stabilizacija fenoksil radikala rezonancijom

Stabilizacija fenoksil radikala moguća je i njegovim kuplovanjem sa slobodnoradikaliskim vrstama karakterističnim za reakcije oksidacije lipida, pri čemu nastaju relativno stabilne neradikalne vrste (Duh i sar., 1999).

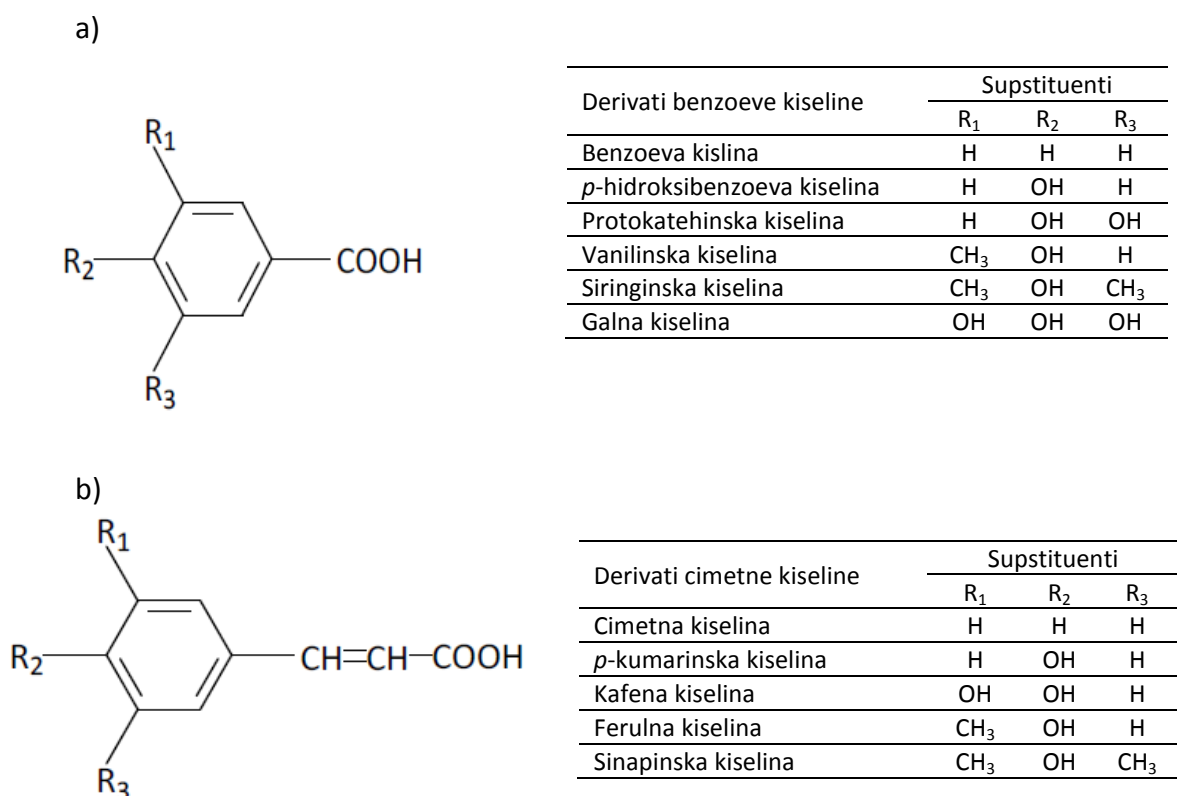
Polifenolna jedinjenja u odnosu na antioksidativno delovanje su multifunkcionalna, što znači da deluju kao redukujući agensi, skvenčeri singelton kiseonika, antioksidansi donori vodonika, a imaju i osobine heliranja metala (Rice i sar., 1995). Da bi se polifenolna jedinjenja definisala kao antioksidansi moraju da zadovoljavaju dva osnovna uslova:

1. Prvi uslov je da prisutni u malim koncentracijama u substratu mogu da odlože, uspore ili spreče delovanje slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1990);
2. Drugi uslov je da novonastali radikal (radikal nastao nakon delovanja antioksidansa) mora da bude stabilan (Shahidi i Wanasudara, 1992).

Kao što je već prikazano (slika 2) polifenoli obuhvataju veliku grupu jedinjenja, a u biljkama vrste *Morus* najzastupljenije su fenolne kiseline i flavonoidi.

Fenolne kiseline

Sve delove biljke roda *Morus*, kada su u pitanju polifenolna jedinjenja, karakteriše prisustvo fenolnih kiselina. Fenolne kiseline se mogu podeliti na dve osnovne grupe – derivate benzoeve kiseline i derivate cimetine kiseline (slika 4).



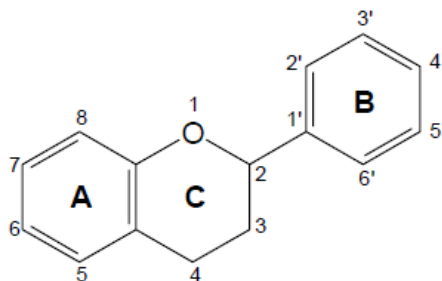
Slika 4. Struktura fenolnih kiselina: (a) derivati benzoeve kiseline i (b) derivati cimetine kiseline

Kroz brojna istraživanja antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina dokazana je povezanost hemijske strukture jedinjenja sa aktivnošću. Antioksidativna aktivnost raste sa povećanjem broja hidroksilnih grupa, pa derivati dihidroksibenzoeve kiseline imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na derivate hidroksibenzoeve kiseline. Galna kiselina, kao 3,4,5-trihidroksi benzoeva kiselina, ima jače antioksidativno delovanje od derivata dihidroksibenzoeve kiseline, što je u skladu sa prethodnom tvrdnjom, i smatra se benzoevom kiselinom sa najjačim antioksidativnim delovanjem. Monohidroksibenzoeve kiseline sa hidroksilnom grupom u *orto* i *para* položaju ne pokazuju antioksidativnu aktivnost, odnosno nemaju osobinu H-donora. Za razliku od njih *m*-hidroksibenzoeva kiselina poseduje antioksidativnu aktivnost. Inkorporacija metilenske grupe između aromatičnog prstena i karboksilne grupe smanjuje uticaj karboksilne grupe, čime se gotovo udvostručuje antioksidativna aktivnost (Rice i sar., 1995).

U najčešće prisutne fenolne kiseline roda *Morus* ubrajaju se galna kiselina, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, hlorogenska, *p*-kumarinska, siringinska, ferulna i *m*-kumarinska kiselina. Najzastupljenija kiselina u svim ispitanim uzorcima listova duda bila je hlorogenska kiselina, u pojedinim vrstama roda *Morus* i do 0,1% u odnosu na ukupan sadržaj ekstrakta (Ercisli, 2008; Memon, 2010). Sadržaj fenolnih kiselina zavisi i od dela stabla i vrste koji se ispituje, u plodu *Morus nigra* najzastupljenija je protokatehinska, dok je u plodu *Morus leavigata* to galna kiselina (Memon, 2010). Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima varira i u zavisnosti od metode ekstrakcije i ekstragensa koji se primenjuje. Određena istraživanja ukazuju da se najveći prinosi fenolnih kiselina iz lista i ploda duda mogu izdvojiti primenom 80% metanola kao rastvarača (Memon, 2010). Takođe, prema Gerasopoulos i sar. (1997) i Zadernowski i sar. (2005) na razlike u sadržajima fenolnih kiselina u različitim vrstama roda *Morus* utiču i uslovi okoline, tip zemljišta i klima, pri kojima je biljka uzgajana.

Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu fenolnih jedinjenja. Osnovni strukturni skelet flavonoida čine 15 atoma ugljenika u osnovnoj C₆-C₃-C₆ strukturi, od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C), a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji C-2 (flavoni, flavonoli, flavononi, dihidroflavoni, flavani i antocijanidini), na poziciji C-3 (izoflavoni) i na poziciji C-4 (neoflavoni) (slika 5).



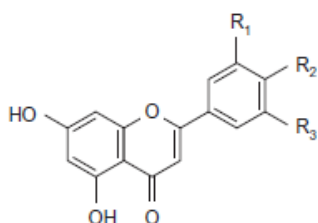
Slika 5. Osnovna struktura flavonoida

U prirodi se najčešće sreću jedinjenja sa hidroksilnim grupama u C-3' i C-4' položaju i nešto manje sa jednom hidroksilnom grupom u položaju C-4'.

flavonoida je najčešće vezana u položaju C-3 i ređe u položaju C-7. Kao šećerna komponenta najčešće se javlja glukoza, a ređe galaktoza, ramnoza i ksiloza (Hermann, 1989).

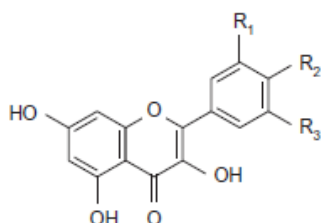
Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura, kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i glikolizacija hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida). Flavonoidi su rasprostranjeni u svim zelenim biljkama, a nađeni su i u nižim organizmima. Najzastupljeniji flavonoidi u biljkama prikazani su na slici 6. Najrasprostranjeniji su flavonoli, koji imaju oko 200 - 300 poznatih aglikona, i flavoni. Kvercetin, kampferol i miricetin su najzastupljeniji flavonoli, a od flavona najpoznatiji su luteolin i apigenin. Halkoni, auron, flavanoni, dihidrohalkoni i izoflavoni se pojavljuju mestimično i u manjem broju biljnih vrsta. Flavanoni i izoflavoni su bezbojni, dok halkoni i auron predstavljaju žute cvetne pigmente (Tumbas, 2010).

Flavoni



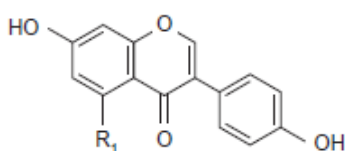
Jedinjenje	Supstituenti		
	R ₁	R ₂	R ₃
Apigenin	H	OH	H
Luteolin	OH	OH	H

Flavonoli



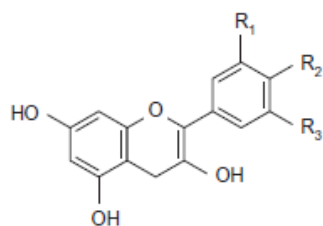
Jedinjenje	Supstituenti		
	R ₁	R ₂	R ₃
Kamferol	OH	H	H
Kvercetin	OH	OH	H
Miricetin	OH	OH	OH

Izoflavoni



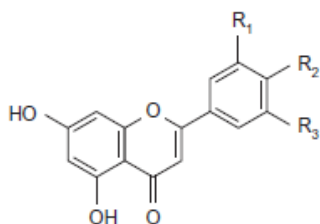
Jedinjenje	Supstituenti
	R ₁
Daidžein	H
Genistein	OH

Flavan-3-oli



Jedinjenje	Supstituenti		
	R ₁	R ₂	R ₃
Katehin	OH	OH	H
Galokatehin	OH	OH	OH

Flavanoni



Jedinjenje	Supstituenti		
	R ₁	R ₂	R ₃
Naringenin	H	OH	H
Eriodiktiol	OH	OH	H
Hesperetin	H	OCH ₃	OH

Slika 6. Hemijska struktura nekih biljnih flavonoida

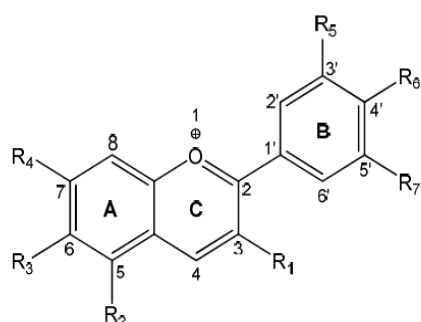
Utvrđeno je da su flavonoidna jedinjenja efikasni skevindžeri superoksid anjon i peroksil radikala, da imaju inhibitorni efekat na proces lipidne peroksidacije, kao i sposobnost heliranja metala. Kao i u slučaju fenolnih kiselina, antioksidativno delovanje jedinjenja ove grupe zavisi od strukturnih karakteristika.

Dokaz protektivnog delovanja flavonoida *in vivo* su epidemiološka istraživanja holandskih naučnika koja pokazuju da su koronarne bolesti i dnevni unos flavonoida obrnuto proporcionalni (Hertog i sar., 1993). Zahvaljujući skevindžer aktivnosti hidrosil radikala utvrđeno je da flavonoidi, kao i gotovo sva ostala fenolna jedinjenja, poseduju veliki broj bioloških aktivnosti: vazodilatatorno, antikancerogeno, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antivirusno, imunostimulatorno, itd. (Brown, 1980; Ho i sar., 1992; Middleton i Kandaswami, 1992).

U listovima *M. alba* istraživanja Katsube i sar. (2006) navode kvercetin 3-(6-malonil glukozid), rutin, izokvercetin i astragalin kao četiri glavna flavonolna glukozida koja su identifikovana kao važni LDL antioksidansi. U plodovima belog dudu poreklom iz Kine dokazano je prisustvo rutina, morina, kvarcetina i miricetina (Yang, 2010), dok su u plodovima divljeg crnog dudu poreklom iz Brazila identifikovani pelargonin i kvercetin (Hassimotto, 2006). Ispitivanja kore dudu ukazuju na prisustvo flavonoida: rutina, izokvercetina i morina, kao i derivata moralbanona: kuanona S (eng. kuwanon S), malberozida C (eng. mublerrozid C), ciklomorusina, eudraflavona B hidroperoksida, oksihidromorusina, lakhianona G i α -acetil-amirina, sa izrazitom antivirusnom aktivnošću (Du, 2002).

Antocijani

Grupu fenolnih jedinjenja čine i antocijani i antocijanidini koji su metabolički produkti flavanona. Antocijani su glikozidi antocijanidina, flavonoida koji su zaslužni za plavu, ljubičastu i crvenu boju voća i povrća. Osnovna struktura antocijana je 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum katjon (slika 7).

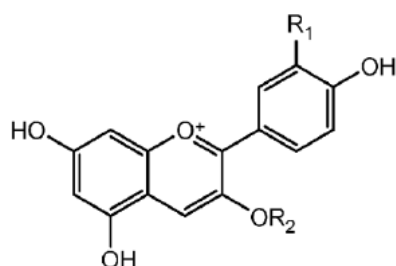


Jedinjenje	Supstituenti		
	R ₁	R ₂	R ₃
Pelargonidin	H	H	H
Cijanidin	OH	H	H
Delfinidin	OH	OH	H
Petunidin	OCH ₃	OH	H
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	H

Slika 7. Osnovna struktura antocijana

Svi antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na položaju 3 C prstena, a većina antocijana su penta- ili heksa-supstituisani, pri čemu se supstituenti (hidroksilna ili metoksi grupa) nalaze u položajima 5 i 7 A prstena, i 3', 4' i 5' B prstena. Na osnovu broja i položaja hidroksilnih grupa u B prstenu razlikuju se tri osnovna jedinjenja antocijana: pelargonidin, cijanidin i delfinidin, a metilovanjem ovih hidroksilnih grupa nastaju: peonidin, petunidin i malvidin. Sve je veći interes za izolovanje i upotrebu antocijana, ne samo zbog toga što su oni netoksični prirodni pigmenti, rastvorni u vodi i mogu zameniti sintetičke boje, već i zbog njihovih bioaktivnih osobina (Tumbas, 2010). Ekstrakti bogati antocijanima su se koristili za lečenje hipertenzije, pireksije, oboljenja jetre, dezenterije, dijareje, infekcija urinarnog trakta i kamena u bubregu (Isabelle, 2008; Butt, 2008; Ozgen, 2009; Wu, 2011).

Bobičasto voće je poznato po visokom sadržaju antocijana, odakle i potiče veliki broj istraživanja i dokazivanja prisustva antocijana u plodovima vrste *Morus*. Cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid su izolovani iz plodova dudu (Bae, 2006; Chen, 2006), Du i saradnici su identifikovali 2008. godine derivate cijanidin-3-glukozida u plodu belog dudu (slika 8). Prisustvo antocijana autori su povezali i sa antioksidativnom aktivnošću ekstrakata roda *Morus* (Isabelle, 2008; Butt, 2008; Ozgen, 2009; Wu, 2011). Veliki broj istraživanja je baziran i na ispitivanju faktora koji utiču na stabilnost antocijana i dokazano je da utiču: struktura - prisustvo šećera vezanih glikozidnim vezama i/ili kiseline koje aciluju šećer, pH vrednost, temperatura, svetlost, prisustvo metala, kiseonika, itd (Nielsen, 2003; Hojjatapanah, 2011; Wu, 2011).

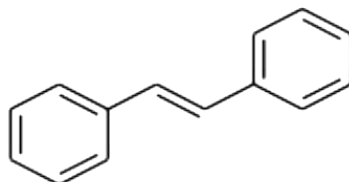


Jedinjenje	Supstituent	
	R ₁	R ₂
Cijanidin-3-glukozid	OH	Glukopiranozid
Cijanidin-3-rutinozid	OH	Rutinozid
Pelargonidin-3-glukozid	H	Glukozid

Slika 8. Strukturna formula dominantnih antocijana u vrstama roda *Morus*

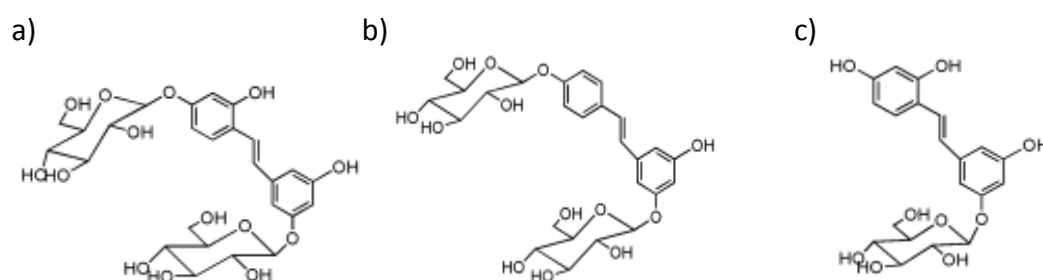
Stilbeni

Stilbeni imaju osnovnu molekulsku strukturu $C_6-C_2-C_6$ (slika 9). Dominantno jedinjenje u grupi stilbena je resveratrol. Stilbeni su u biljkama efikasna odbrana od gljivica. Poseban značaj stilbena je njihovo svojstvo da zadržavaju antifungalno delovanje i u organizmu čoveka. Oni su i snažni antioksidansi i po nekim istraživanjima ispoljavaju antikancerogeni efekat (Bertelli i sar, 1998).



Slika 9. Osnovna hemijska struktura stilbena

U listu i plodu belog dudu Kim i saradnici (2008) su identifikovali i kvantifikovali dominantne stilben glikozide: malberozid A, *cis*-mulberozid A i resveratrol-4,3'-di-O- β -glukopiranozid. Dve godine kasnije dokazano je prisustvo (Piao i sar., 2010) pet stilben glikozida u kori i korenu dudu (*M. alba*): malberozida A, *cis*-malberozida A, resveratrol-4,3'-di-O- β -glukopiranozida, oksiresveratrol-2-O- β -D-glukopiranozida i oksiresveratrol-3'-O- β -D-glukopiranozida (slika 10). Prisustvo flavonoida i stilben glikozida zajedno sa resveratrolom i maklurinom povezuje se i sa inhibicijom tirozinaze (Chang, 2011).



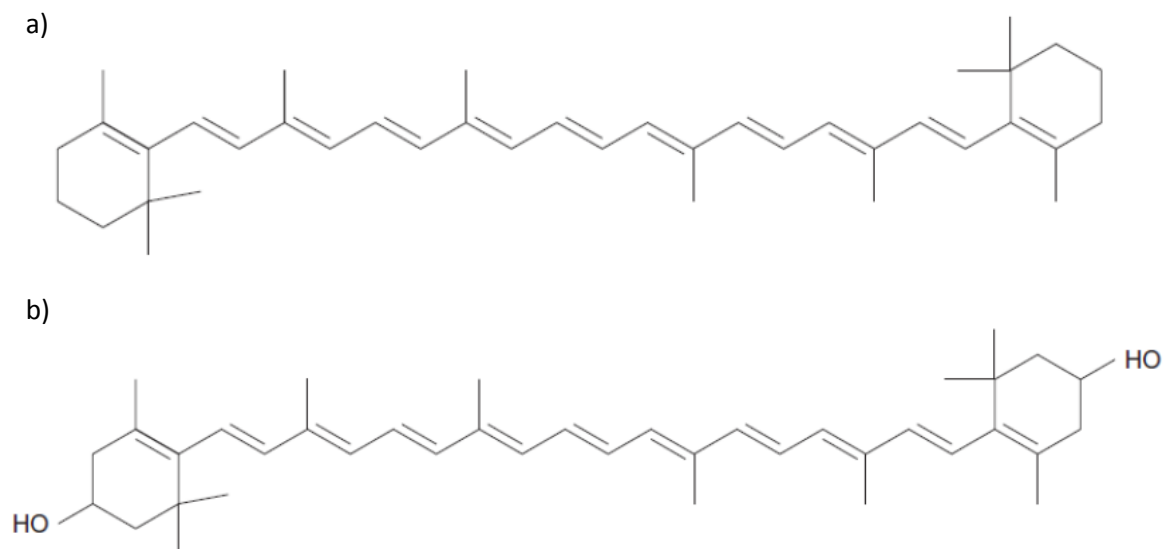
Slika 10. Hemijska struktura nekih identifikovanih stilben glikozida: a) muretozid A, b) resveratrol-4,3'-di-O- β -glukopiranozid i c) oksiresveratrol-3'-O- β -D-glukopiranozid

2.2.2. KAROTENOIDI

Karotenoidi su polinezasićeni ugljovodonici sastavljeni od izoprenskih jedinica. Strukturna formula karotenoida sadrži znatan broj konjugovanih dvostrukih veza, a najznačajniji su α - i β -karoten, lutein, likopen i β -kriptoksantin (Thurnham, 1994). U životinjskim tkivima, zbog lipofilnosti, karotenoidi se distribuiraju u nepolarne delove, uključujući membrane, lipoproteinske čestice (*Low Density Lipoproteins*, LDL i *High Density Lipoproteins*, HDL) i serume, povezane sa transportom proteina (IOM, 1998). Epidemiološki podaci ukazuju na pozitivnu korelaciju ishrane bogate karotenoidima i manjom zastupljenošću hroničnih oboljenja ljudi. Ljudi ne sintetišu karotenoide i stoga ih moraju unositi kroz hranu ili putem fitopreparata. Najvažnija fiziološka funkcija karotenoida je

provitaminska, jer je β -karoten prekursor vitamina A i na taj način utiče na zdravlje epitelnih ćelija, normalnu reproduktivnu sposobnost i vizuelnu funkciju (Combs, 1998).

Karotenoidi poseduju izraženu antioksidativnu aktivost. Osim toga karotenoidi, posebno β -karoten, ispoljavaju različite biološke funkcije u organizmu, kao što su pomenute provitaminske i antioksidativne, ćelijske „komunikacije“, poboljšanje imunološkog sistema, zaštita od UV zračenja i sl. Veliki broj studija je svoju pažnju usmerilo na dokazivanje funkcija β -karotena, dokazano je i da smanjuje rizik od određenih vrsta kancera i efikasno deluje u prevenciji koronarnih oboljenja i odličan je u prevenciji svih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Krinsky 2001, Su i sar, 2002, Yeum i sar, 2002).



Slika 11. Strukturna formula a) β -karotena i b) luteina

Prisustvo karotenoida u plodovima roda *Morus* je objavljeno u radu Isabelle i sar. (2008) koji su dokazali prisustvo β -karotena, luteina, neoksantina i violaksantina u plodovima vrste *Morus atropurourea* Roxb. β -karoten i lutein (slika 11) su se izdvojili kao dominantne komponente, preko 94,2% u odnosu na ukupan sadržaj karotena (Isabelle i sar, 2008). Takođe, i u listu duda je dokazano prisustvo devet karotenoidnih jedinjenja, od kojih su dominantna pomenuta dva (β -karoten i lutein) (Uzakova i sar., 1987).

2.2.3. STEROLI

Steroli su visokomolekularni ciklični alkoholi, grupa jedinjenja sa osnovnom strukturom ciklopentanofenantrena, koji se sastoji od četiri kondenzovana prstena sa 17 ugljenikovih atoma. Fitosteroli je zajednički naziv za biljne sterole i stanole, koji imaju sličnu strukturu kao holesterol, a razlikuju se samo u bočnim grupama lanca. Najpoznatiji biljni steroli su: sitosterol, kampesterol, ergosterol i stigmasterol. Ishrana koju karakteriše povećan unos fitosterola može snižavati nivo ukupnog holesterola i lipoproteina niske gustine (LDL) kod ljudi (Miettinen i sar., 1995). Fitosteroli, najverovatnije, povećavaju aktivnost enzima reduktaze, koji je potreban za proizvodnju holesterol receptora ili deluju na taj način što sprečavaju apsorpciju holesterola (Heinemann i sar., 1993). Utvrđeno je da biljni steroli imaju pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Smatra se da ove aktivne komponente

poseduju antidijabetičko i antiaterosklerozno delovanje, utiču na smanjenje nivoa holesterola u serumu, a značajni su i u prevenciji raka debelog creva (Piironen i sar., 2000). Brojna naučna istraživanja pokazuju da ergosterol i njegovi produkti peroksidacije doprinose zdravlju u smislu smanjenja bola koji je izazvan zapaljenskim procesima, učestalosti kardiovaskularnih bolesti, a poseduju antimikrobno i antitumorno delovanje (Suqin i sar., 2010).



Slika 12. Strukturne formule fitosterola

U ekstraktima lista dobijenih od pet različitih vrsta roda *Morus* uzgajanih u Gruziji dokazano je prisustvo fitosterolnih jedinjenja. Dominantna komponenta u ekstraktima lista duda (*M. alba* Linn., *M. alba tatarica*, *M. kagayamae* Koidz. i *M. bombyscis* Koidz.) je sitosterol (slika 12), koja varira u udelu od 54 do 68% u odnosu na ukupan sadržaj svih fitosterola (Zambakhidze i sar, 2005). Manje zastupljena jedinjenja u ispitanim uzorcima su kampesterol i sitosterol, čiji se udeo u ekstraktima kreće od 2 do 3% (Ito i sar., 1964; Zambakhidze i sar, 2005).

2.2.4. MIKRO-, MAKRO- I TOKSIČNI ELEMENTI

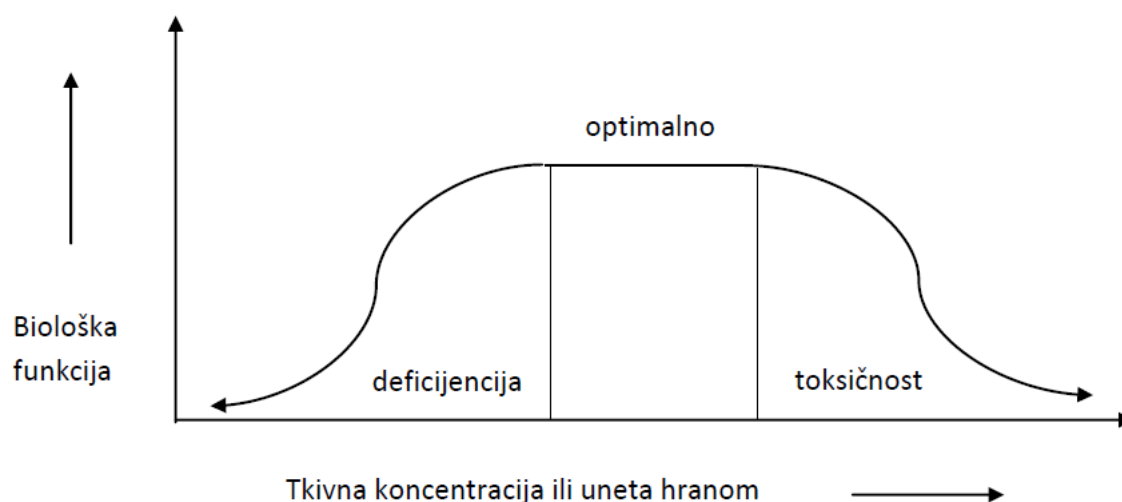
Širom sveta postoji sve veće interesovanje i za minerale kao konstituente biljaka (Ozcan i sar., 2004). Mnogi elementi utiču i na sekundarni metabolizam biljaka i samim tim na produkciju biološki aktivnih jedinjenja (Sykorova i sar., 2009). Uopšteno, čoveku su u toku jednog dana potrebne količine pojedinih sastojaka koje se kreću u rasponu od grama do pikograma. Makrosastojci (proteini, ugljeni hidrati i lipidi) ulaze u sastav strukturnih i funkcionalnih komponenti ćelija i izvor su energije. Mikrosastojci (vitamini i minerali) su komponente enzima i kofaktora koji su neophodni za metaboličke procese. Minerali su neophodni u ishrani za normalno odvijanje metaboličkih funkcija, transmisiju nervnih impulsa, pravilno formiranje kostiju, regulaciju balansa vode i soli (Kalac i Svoboda, 2000).

Elementi koji se nalaze u organizmu uopšteno dele se na makroelemente, mikroelemente i ostale.

1. Makroelementi ili makrokonstituenti su elementi koji su neophodni u relativno velikim količinama za normalno funkcionisanje fizioloških procesa ljudskog organizma. Makroelementi (glavni elementi) su: H, C, O, Na, Mg, P, S, Cl, K i Ca.

2. Mikroelementi, mikronutritijenti ili *“trace elements”*, su esencijalni sastojci hrane neophodni za normalno funkcionisanje organizma, a potrebni su u vrlo malim količinama. Mikroelementi (elementi u tragu, esencijalni elementi) su: Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo i J.
3. Grupu drugih elemenata čine F, Si, V, Ni i Sn koji se nalaze u tragu i mogu da budu esencijalni.

Esencijalni elementi (hrom, mangan, gvožđe, kobalt, bakar, cink, selen, molibden i jod) su metali, izuzev joda, i neohodni su organizmu kako za rast, tako i za održavanje zdravlja i života. Deficit nekog od ovih elemenata dovodi do funkcionalnog poremećaja. Često se radi o tome da se javlja funkcionalni poremećaj metaloenzima koji sadrži takav metal kao svoj integralni deo ili metal sudeluje kao aktivator enzima. Na slici 13 prikazan je jednostavan model koji ilustruje odnos između koncentracije esencijalnog sastojka u tkivu i zavisnosti biološke funkcije. Ako dođe do smanjenja koncentracije nekog elementa dolazi do izmenjene biološke funkcije (deficita elementa), a ako se poveća iznad određene koncentracije isti element ima toksično dejstvo. Svaki element ima svoju karakterističnu krivu zavisnosti.



Slika 13. Zavisnost između unete koncentracije elementa i njegove biološke funkcije

Proteklih decenija došlo do pomeranja granica detekcije analitičkih metoda, pa je lista elemenata koji se nalaze u tragovima, esencijalnih za čoveka ili životinje proširena. Iz ovog razloga kompletne liste esencijalnih elemenata u tragu su kontraverzne, a nisu prihvaćeni ni sveobuhvatni kriterijumi. Na slici 14 prikazani su elementi koji su esencijalni za čoveka i životinje. Svi makro- i mikroelementi (osenčeni na slici 14) esencijalni su za čoveka, sa izuzetkom nikla, vanadijuma, arsena i silicijuma koji su esencijalni za životinje. U humanim tkivima se nalaze i aluminijum, kadmijum, olovo i živa koji nisu esencijalni, već toksični (Majkić-Singh, 2000).

1																	
H																	
												6	7	8	9		
												C	N	O	F		
11	12											14	15	16	17		
Na	Mg											Si	P	S	Cl		
19	20			23	24	25	26	27	28	29	30			33	34		
K	Ca			V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn			As	Se		
					42											53	
					Mo											I	

Slika 14. Hemijski elementi koji se mogu smatrati esencijalnim za čoveka i životinje

Gotovo svi mikro- i makroelementi koji se mogu naći u delovima dudu su uključeni u normalno funkcionisanje biološkog sistema i pozitivno deluju na određena fiziološka stanja. Utvrđeno je prisustvo 10 elemenata od kojih je K dominantan, a zatim slede N, P, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn i Cu (Ercisli i Orhan, 2007; Lin i sar., 2009; Lin i Lai, 2009; Imran i sar., 2010; Yang i sar., 2010). Gvožđe je u značajnoj količini prisutno u vrsti *M. nigra*. Visok nivo Fe je od velikog nutritivnog značaja, naročito u onim delovima sveta gde su anemija i nedostatak Fe relativno česte pojave (Imran i sar., 2010).

Kalijum je neophodan za održavanje kiselo-bazne ravnoteže i osmotskog pritiska u organizmu. Ima presudnu ulogu u prenošenju nervnih impulsa pri kontrakciji mišića (naročito srčanog) budući da povećava razdražljivost mišića i nervnih ćelija. Takođe je značajan za metabolizam ugljenih hidrata, ostvarenje membranskog transporta i održavanje razlika potencijala kroz ćelijsku membranu (Veljković i Vučković, 2010). Dnevne potrebe za kalijumom iznose 590 mg, a mogu biti i veće. Nedostatak kalijuma izaziva hipertenziju, srčanu aritmiju, mišićnu slabost, smanjenu pokretljivost creva, mučninu, pospanost, letargiju, itd. Višak kalijuma se izlučuje preko zdravih bubrega. Ukoliko višak kalijuma, iz nekog razloga, ne može da se izluči iz organizma, može izazvati smetnje u sistemu srca.

Natrijum zajedno sa kalijumom služi za prenos nervnih impulsa, održava tonus mišića i utiče na propustljivost membrane. Manjak natrijuma u organizmu izaziva pad krvnog pritiska, dovodi do opšte slabosti organizma i gubitka apetita (Veljković i Vučković, 2010).

Kalcijum je osnovni konstituent kostiju i zuba, ali ima i izuzetno važne uloge u krvnoj plazmi i ćelijskim membranama. Nedostatak kalcijuma izaziva rahitis kod dece, a kod odraslih dovodi do osteomalacije (razređenja koštane mase) i osteoporoze (Hathcock, 2004).

Magnezijum je četvrti mineral po količini prisutan u telu i ima bitnu ulogu u velikom broju biohemijskih i fizioloških procesa u organizmu. Dokazano je da je neophodan za normalno funkcionisanje oko 300 različitih enzima (Shils, 1999). Oko 50% magnezijuma nalazi se u kostima. Druga polovina se nalazi u ostalim tkivima i organima. Oko 1%

magnezijuma nalazi se u krvi. Magnezijum omogućava normalno funkcionisanje mišića i nervnog sistema, podržava imunitet, čini kosti snažnim i omogućava odvijanje normalnog srčanog ritma. Kliničke posledice nedostatka magnezijuma uključuju različite neurološke i neuromišićne znake kao što su grčevi, premori i izmenjeni refleksi mišića. Takođe, nedostatak utiče na aritmije, a može uticati i na infarkt miokarda (Shils, 1999). Smatra se da reguliše i nivo šećera u krvi i da utiče na krvni pritisak (Saris i sar., 2000). Epidemiološka istraživanja pokazuju da magnezijum igra značajnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska (IOM, 1999). Magnezijum se smatra protektivnom komponentom kod diabetesa tipa II. Igra bitnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata. Ova aktivnost utiče na oslobađanje i delovanje insulina, hormona koji kontroliše nivo šećera u krvi. Nizak nivo magnezijuma u krvi često se sreće kod osoba obolelih od diabetesa (Kobrin i Goldfarb, 1990). Poznat je antistresni mineral. Magnezijum doprinosi zdravlju kardiovaskularnog sistema i pomaže u prevenciji od srčanih napada. U kombinaciji sa kalcijumom deluje kao prirodno sredstvo za umirenje. Mnoga istraživanja pokazuju da su visok nivo magnezijuma u krvi i mali rizik od koronarnih bolesti povezani. Takođe se smatra da visok dnevni unos magnezijuma u organizam smanjuje rizik od moždanog udara (Ascherio i sar., 1998).

Litijum je u tkivima i telesnim tečnostima prisutan u maloj količini i teško difunduje kroz ćelijske membrane (Veljković i Vučković, 2010). Ima značajnu ulogu u održavanju konstantnog odnosa kalijuma i natrijuma u organizmu, ali i za ostvarivanje funkcija nekih enzima (heksokinaza, piruvat kinaza i dr.)

Gvožđe ulazi u sastav hemoglobina, mioglobulina i respiratornih enzima, i jedan je od najvažnijih oligoelemenata. Neophodan je sastojak važnih enzima i koenzima (peroksidaze, citohrom) (Tasić i sar., 2004). Gvožđe može da vrši inhibiciju oksidacije LDL na endotelnim ćelijama, a time ima zaštitnu ulogu u procesima oksidativnog oštećenja ćelije (Thompson i sar., 1991). Osim toga, povećava otpornost prema bolestima, sprečava zamor i anemiju. Smanjena količina gvožđa ogleda se u izraženom zamoru, slabom apetitu i smanjenoj otpornosti organizma (Veljković i Vučković, 2010). Od unete količine gvožđa organizam apsorbuje samo 10%.

Cink je esencijalni sastojak biomembrana i neophodan je za njihovo održavanje i funkciju. Potreban je za normalan metabolizam proteina i ugljenih hidrata, funkcionisanje žlezda (prostate), kao i za mnoge druge biološke funkcije. Najnovija istraživanja pokazuju njegovu važnu ulogu u funkcionisanju mozga, zbog čega se primenjuje u lečenju mentalnih poremećaja (npr. šizofrenije). Potreban je za sintezu DNK, a ima veliku ulogu u razvoju i funkcionisanju organa za reprodukciju. Cink je esencijalni oligoelement značajan za stabilizaciju membrana i aktivnost metaloenzima. Do sada je otkriveno oko 70 različitih metaloenzima koji sadrže cink: karboanhidraza, laktat dehidrogenaza, alkalna fosfataza, superoksid-dismutaza, alkohol dehidrogenaza, ali i RNK i DNK polimeraza (Veljković i Vučković, 2010). *In vitro* ispitivanjima dokazano je da deficit cinka dovodi do oštećenja endotelne membrane (Leonhardt i sar., 1997). Smatra se da cink ima protektivno dejstvo u održavanju integriteta endotela i da je ovaj efekat u vezi sa aktivacijom citokina u uslovima oksidativnog stresa (Tasić i sar., 2004). Cink povećava broj odbrambenih T ćelija i njihovu

efikasnost, pomaže u lečenju neplodnosti, čira na želucu, ubrzava zarastanje rana. Smatra se da oko 48% globalne populacije ima rizik od nedostatka ovog esencijalnog elementa (Oteiza i Mackenzie, 2005).

Selen je esencijalni mikronutritijent koji je naročito interesantan u medicinskim istraživanjima i u poslednje vreme zanimljiv za industriju hrane (Beelman i Royse, 2006). Posebno se ističe antioksidativna aktivnost selena koji je neophodan sastojak glutation-peroksidaze i mišićnog citohroma, što mu daje poseban značaj u uslovima oksidativnog oštećenja, posebno kancerogeneze i kardiovaskularnih oboljenja. Glutation-peroksidaza se nalazi u mnogim ćelijama (eritrociti, leukociti, makrofagi, trombociti i druge), pa nedostatak selena može dovesti do brojnih poremećaja (hemolize eritrocita, poremećaja homeostaze, edema, peroksidacije kapilarnih membrana, oštećenja jetre). Eksperimentalne studije su pokazale da je nedostatak selena u vezi sa kardiomiopatijom, naglom smrću, kao i sniženim brojem i funkcijom T-limfocita (Alissa i sar., 2003). Utvrđeno je da su kod bolesnika sa akutnim infarktom miokarda značajno niže koncentracije selena u eritrocitima i serumu (Bor i sar., 1999). Eksperimentalna i klinička istraživanja pokazuju da je pojava i smrt uzrokovana kancerom pluća, kolorektalnim kancerom i kancerom prostate mnogo manja kod osoba koje imaju visok dnevni unos selena (Russo i sar., 1997; Knekt i sar., 1998; Shamberger, 1985). Naučnici pretpostavljaju da selen utiče na kancer na dva načina. Kao antioksidans selen deluje protektivno u odnosu na oštećenja koja mogu da prouzrokuju slobodni radikali. Selen može da uspori rast kancera. Drugo delovanje selena vezuje se za određene produkte razlaganja preko kojih deluje na povećanje i poboljšanje imuniteta organizma (Combs i sar., 2001). Selen spada u grupu antioksidanasa koji mogu pomoći u smanjenju oksidacije LDL holesterola (oksidovana forma proteina niske gustine) i time pomoći u prevenciji koronarne arterijske bolesti (Neve, 1996).

Mangan ima ulogu u metabolizmu masti, izgradnji kostiju, vezivnom tkivu, proizvodnji energije i sintezi nukleotida DNK. Kod osoba kod kojih postoji deficit gvožđa može doći do povećane resorpcije mangana, što za posledicu može imati i intoksikaciju. Povećana količina mangana se primećuje po gubitku apetita, pospanosti i bolovima u mišićima, a često i halucinacijama. **Bakar** je tek 1964. godine stavljen na listu elemenata koje je neophodno unositi hranom ili kao dodatak ishrani. Nedostatak bakra ima za posledicu anemiju, depigmentaciju kose i deformaciju kostiju. **Nikl** je element čija uloga još uvek nije u potpunosti proučena. Poznato je da je stimulator stvaranja krvi, kao i da pomaže funkciji pankreasa pri stvaranju insulina (Veljković i Vučković, 2010).

Potrebne dnevne doze nekih mikro- i makroelemenata su prikazane u tabeli 3.

Tabela 3. Potrebne dnevne doze nekih mikro- i makroelemenata

Element	RDI ¹	DRI ²	UL ³
Ca	1.000 mg	1.300 mg	2.500 mg
Fe	18 mg	18 mg	45 mg
Mg	400 mg	420 mg	350 mg*
Zn	15 mg	11 mg	40 mg
Se	70 µg	55 µg	400 µg
Co	2 mg	0,9 mg	10 mg
Mn	2 mg	2,3 mg	11 mg

¹Referentni dnevni unos (RDI - Reference daily intake) propisan od strane FDA (Food and Drug Administration)

²Dijetetski referentni unos (DRI - Dietary Reference Intakes) propisan od strane Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine

³Dozvoljena gornja granica unosa (UL - Upper Limit)

*gornja granica unosa za Mg koja se odnosi isključivo na unos kroz dijetetske suplemente ili farmaceutske proizvode

Posebna grupa elemenata su teški metali, elementi sa gustinom većom od 5 g/cm³. Teški metali koji su najčešće praćeni u namirnicama, lekovima ili dodacima ishrani su: olovo, živa, kadmijum i arsen. **Olovo** se skladišti u kostima i manjim delom u jetri, bubrezima i mekim tkivima. Trovanje olovom utiče na funkciju mozga i nervnog sistema, smanjuje stepen inteligencije, moć zapažanja i pamćenja. Najteži oblici izazivaju smrt. **Živa** je toksična i kao elementarna i u svim svojim jedinjenjima. Simptomi trovanja javljaju se u organima za varenje, a zatim u nervnom sistemu. Visoka doza **kadmijuma** u bubrezima izaziva oštećenje tkiva bubrega, utiče na nastanak kamenca u bubrezima i povećanje pritiska. Kadmijum utiče na strukturu kostiju dovodeći do njihove deformacije. Čest je uzrok anemije, oštećenja srca i bubrega, a i kancerogen je. **Arsen** je manje toksičan od ostalih teških metala. Arsen koji je vezan u organskim jedinjenjima (As⁵⁺) i elementarni arsen nisu toksični za razliku od neorganskog trovalentnog arsena (As³⁺). Akumulira se u telu, posebno u kosi, koži i nekim unutrašnjim organima. Trovanje arsenom izaziva opadanje kose, dermatitis i probleme organa za varenje, zatim premorenost, glavobolju, zbunjenost, psihološke probleme i određene promene na jetri i bubrezima (Jakšić, 2010, Švarc-Gajić, 2009).

2.2.5. MASNE KISELINE

Lipidi imaju značajnu ulogu u funkcionisanju čovekovog organizma, jer utiču na funkcionisanje hormona ili su njihovi prekursori, pomažu u procesu digestije i jedni su od osnovnih konstituenata u metabolizmu energije. Takođe, lipidi predstavljaju osnovne strukturne i funkcionalne komponente biomembrana (Burtis i Ashwood, 1996). Osnovne strukturne jedinice koje izgrađuju lipide su masne kiseline. Masne kiseline se dele na zasićene (*saturated fatty acids*, SFA) i nezasićene masne kiseline (*unsaturated fatty acids*, UFA). Postoji i podela nezasićenih masnih kiselina na zasićene masne kiseline sa jednom nezasićenom vezom (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) i višestruko nezasićene masne kiseline (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA).

Ljudski organizam nije sposoban da sintetiše one masne kiseline koje na delu alkalnog lanca od desetog ugljenikovog atoma, računajući od karboksilne grupe i krajnje metil grupe, imaju nezasićene veze. Takve kiseline se nazivaju i esencijalne masne kiseline i usled nemogućnosti organizma da ih sam sintetiše moraju se unositi putem hrane ili fitopreparata. Esencijalne masne kiseline pripadaju grupi polinezasićenih masnih kiselina sa 18, 20 i 22 ugljenikova atoma i sadrže dve do šest dvostrukih veza. Bitne su za organizam jer imaju nekoliko važnih funkcija:

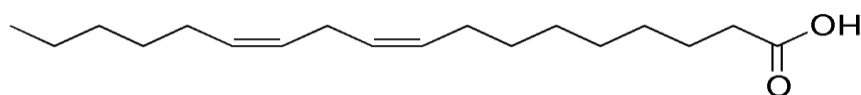
- služe kao izvor energije,
- gradivni su elementi fosfolipida, strukturnih elemenata ćelijskih membrana,
- sastojci su lipoproteina krvne plazme i
- prekursori su važnih jedinjenja sa hormonskim dejstvom, kao što su prostaglandini, leukotrieni, trombokساني (Dimić, 2005).

U ishrani supstitucija zasićenih masnih kiselina nezasićenim je veoma značajna, pošto takva ishrana dovodi do povećanja HDL ("dobrog" holesterola), odnosno do smanjenja LDL ("lošeg" holesterola) i triglicerida (Isang i Zhang 2007). Ova supstitucija izuzetno je značajna jer je dokazano da je ishrana bogata zasićenim masnim kiselinama povezana sa povećanjem bolesti kardiovaskularnog sistema, ateroskleroze i koronarne bolesti srca (Wang i sar., 2003). Unos polinezasićenih masnih kiselina je neophodan i iz razloga neophodnosti sinteze polinezasićenih masnih kiselina dugačkog lanca, kao što su eikosapentaenska i dokosaheksaenska kiselina, koje su prekursori hormonskih supstanci koje regulišu različite biohemijske procese u organizmu (Dimić, 2005).

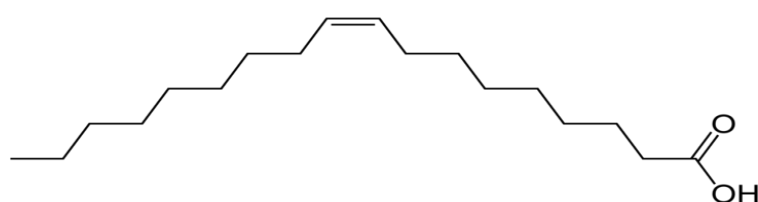
Nezasićene masne kiseline koje pripadaju grupi omega-6 i omega-3 masnih kiselina imaju značajno biološko delovanje i u malim koncentracijama. One su prekursori biosinteze eikozanoida (prostaglandina). Ove značajne komponente između ostalog kontrolišu mnoge sisteme u humanom organizmu i utiču pozitivno na aterosklerozu, kardiovaskularne bolesti, nivo triglicerida, krvni pritisak, artritis, pojavu astme, kao i mnoge druge bolesti (Lawrence, 2010). Omega masne kiseline poseduju i antiinflamatorno, antitrombotičko, antiaritmičko i vazodilatatorno delovanje, a deluju i na diabetes tip II, ulcerozni kolitis, Kronovu bolest (Voet i Voet, 2004).

Mali broj dosadašnjih istraživanja je baziran na utvrđivanju sadržaja masnih kiselina vrsta *Morus*. Ercisli i Orhan (2007, 2008) su određivali sadržaj masnih kiselina u plodovima vrste *M. alba*, *M. nigra* i *M. rubra*, i ustanovili sadržaj masnih kiselina po opadajućem redosledu C18:2, C16:0, C18:1, C18:0 i C14:0. Zavisnost sadržaja masnih kiselina u plodovima crnog duda u odnosu na genotip istraživali su Elmaci i Altrug (2002), koji su takođe identifikovali linolnu kiselinu (slika 15) kao dominantnu. Slični rezultati su pokazani i u studiji ispitivanja ulja dobijenog iz semena ploda crnog duda (Gecgel i sar., 2011). Nezasićena masna kiselina sa visokim udelom u svim dosadašnjim studijama je linolna kiselina, koja je esencijalna masna kiselina za ljudski organizam i potrebna je za formiranje ćelijskih membrana, vitamina D i različitih hormona (Watkins, 2005; Simopoulos, 2002; Innis, 1996). Nedostatak ove kiseline povezuje se sa nizom disfunkcija u organizmu (dermatitis,

opadanje kose, ćelavost, imunosupresija i srčana disfunkcija) (Lawrence, 2010). Kiselina koja se takođe nalazi u većem procentu u ispitanim uzorcima ploda i ulja crnog duda je oleinska kiselina (slika 15), koja sa jednom nezasićenom vezom spada u grupu omega-9 masnih kiselina. Oleinska kiselina se u velikom udelu nalazi u maslinovom ulju i utvrđeno je da je efikasna u smanjivanju nivoa holesterola i prevenciji kardiovaskularnih oboljenja (Dimić, 2005).



Linolna kiselina



Oleinska kiselina

Slika 15. Hemijska struktura linolne i oleinske kiseline

2.3. TAKSONOMSKI POLOŽAJ, BIOLOŠKE I HEMIJSKE KARAKTERISTIKE VRSTA RODA *Morus*

2.3.1. Taksonomija

Taksonomija duda (slika 16) je vrlo složena i komplikovana zbog postojanja velikog broja vrsta i podvrsta roda *Morus*. Do sada su registrovane 24 vrste roda *Morus* i jedna podvrsta sa najmanje 100 poznatih varijeteta (Hajjatpanah i sar., 2011). Uopšteno dud pripada rodu *Morus*, familiji *Moraceae* i taksonomija se ogleda u sledećoj podeli:

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Magnoliophyta*

Klasa: *Magnoliopsida*

Red: *Rosales*

Porodica: *Moraceae*

Rod: *Morus*

Slika 16. *Morus nigra* L.

Složenost taksonomije je intenziviran postojanjem sve većeg broja hibridnih vrsta usled popularnosti uzgajanja ove biljne vrste. Vrste koje su opšte prihvaćene su:

- *Morus alba* L. – eng. *white mulberry*

- *Morus australis* Poir. – eng. *chinese mulberry*
- *Morus celtidifolia* Kunth.
- *Morus insignis*
- *Morus mesozygia* Stapf. – eng. *african mulberry*
- *Morus microphylla* – eng. *texas mulberry*
- *Morus nigra* L. – eng. *black mulberry*
- *Morus rubra* L. – eng. *red mulberry*.

Vrste koje rastu u Srbiji i koje su predmet istraživanja ove doktorske disertacije su: *Morus alba* L. (beli dud) i *Morus nigra* L. (crni dud).

2.3.2. Geografsko poreklo i rasprostranjenost

Vrste roda *Morus* pronađene su u različitim klimatskim zonama, od umerenih do subtropskih na Severnoj hemisferi i tropskih na Južnoj, a mogu i da rastu u širokom intervalu klimatskih i topografskih uslova, kao i na različitim tipovima zemljišta.

Dud se koristi hiljadama godina i gaji se intenzivno širom sveta, prilagođen je širokom prostoru od Azije, Evrope, Severne i Južne Amerike do Afrike. Istorijski je poznat još iz radova velikog broja grčkih i rimskih pisaca (Ovidija, Plinija i Vergilija). Spominje se i u Bibliji: "Ako imate veru, malu kao gorušičino zrno možete reći ovom dudu: budi iskorenjen i zasađen u moru, i on će vas poslušati" (Luka 17:6). Smatra se da reč „Morus”, potiče od latinske reči „Mora” (kašnjenje), zbog zakasnelog širenja pupoljaka, a drugo objašnjenje je da dolazi od keltske reči „mor” (crno) koja se odnosi na boju ploda. Po nekim izvorima u Evropu je dospelo preko Persije, Male Azije, Jermenije i Kavkaza (Gangi, 2010).

Danas je raširen po celoj Evropi. U zemljama u kojima se najviše uzgaja, naročito u azijskim, Indiji i Kini, dud se koristi zbog listova koji služe kao hrana svilenim bubama. U jednom broju evropskih zemalja dud se uzgaja više zbog ploda nego zbog lista. Danas je Turska lider po organizovanom uzgajanju dudu, gde se najviše uzgaja *M. alba* (95%), zatim *M. rubra* (3%) i najmanje *M. nigra* (2%) (Ercisli i Orhan, 2007). Sve veća popularnost ove biljke pokazuju i liste „biljaka za budućnost” koje rod *Morus* svrstavaju u jednu od 20 biljaka koje će doživeti ekspanziju i veću zastupljenost u ishrani i fitonutrijentima (www.pfaf.org). U prilog govori i činjenica da je 160.000 tona soka od dudu i koncentrata dudu proizvedeno u Iranu tokom 2008. godine (Hojjatpanah i sar., 2011).

2.3.3. Opis biljke

Beli dud (*Morus alba* L.) raste u visinu i do 20 metara. Krošnja mu je okrugla, kora u početku žućkastosiva i glatka, kasnije sivosmeđa i duboko ispucana. Pupoljci su jajoliki, oko 6 mm veliki, smeđesivi. Listovi su naizmenični od 4 do 14 cm dugi i od 4 do 10 cm široki.

Plodovi su složeni, tipa zbirne koštunice, sočni, mesnati, 2-8,5 cm dugački, cilindričnog ili ovalnog oblika, bele do krem boje, slatki i jestivi (slika 17). Uzgaja se u drvoredima, živim ogradama, parkovima i baštama. U prve dve godine raste veoma sporo, a kasnije znatno brže. Ima razvijen koren, pa je pogodan za vezivanje erozivnih zemljišta (Katsube i sar., 2006). Originalno je uzgajan u Kini i imao je široku primenu kako u poljoprivredi, tako i u oblasti medicine.



Slika 17. Plod belog i crnog dudu

Crni dud (*Morus alba* L.) je spororastuće listopadno drvo koje raste do 15 metara u visinu, sa mnogo razgranatih stabljika. U narodu je poznat pod imenom murva ili šamdud. Kora stabla je višebojna, od zelene, narandžaste do tamno sive. Listovi su prosti, naizmenični, gusto raspoređeni, grubi, tamno zeleni, gornja površina je hrapava, donja dlakava, jajoliki su i imaju peteljku. Za dud je karakteristična i anizofilija (slika 18), tako da listovi mogu biti i nepravilno podeljeni na 2-3 režnja. Cvetovi su bele boje, jednopolni, raspoređeni u klasove u pazusima listova. Ženski cvetovi (slika 18) su grupisani u uspravne, valjkaste, kratke klasove, sa cvetnim omotačem koji ima 4 listića perijanta i 2 karpela, koji su prekriveni dugim, mekim dlakama. Muški cvetovi su u cvastima nalik na rese dužine 1,5-3 cm, cvetni omotač takođe ima 4 listića perijanta spojenih pri bazi i 4 prašnika (Chevallier, 1996). Složen plod je cvast srasla u jedno plodište, dudinju, slatkog ukusa, koja je sočna, bez izražene arome, tamnoljubičaste ili crne boje, sa mnogo semenki (slika 17). Kada se cvetovi opraše, plod počinje da bubri, sve dok na kraju ne postane skroz promenjen u teksturi i boji, sočan i pun soka (Lee i sar., 2008).

Dud se sadi duž puteva, po parkovima, ivicama parcela, oko vinograda, po dvorištima. Drvo dudu živi i do 250 godina. Voli toplo, dobro isušeno zemljište i ilovaču, a crni dud je pogotovo vredan gajenja, zbog raskošnog lišća i živopisnog oblika (Chevallier, 1996).



Slika 18. Anizofilija lista crnog duda i ženski cvet crnog duda

2.3.4. Fitohemijski sastav i biološka aktivnost vrsta roda *Morus*

Vrste roda *Morus* bile su predmet brojnih istraživanja, bilo da se radi o fitohemijskim ispitivanjima, biološkim, biohemijskim, fiziološkim i ekološkim studijama, a sve u cilju njihove bliže karakterizacije i iskorišćenja u medicinske ili prehrambene svrhe. Fitohemijska ispitivanja ukazuju na prisustvo različitih jedinjenja u vrstama roda *Morus*, od kojih su najviše ispitani i istraženi polifenoli prisutni u plodu (dudinjama). Međutim, za biološku aktivnost i terapijski efekat značajne su i druge klase sekundarnih biomolekula, koje su već pomenute u prethodnom poglavlju. Iako su pojedine vrste duda veoma poznate u Srbiji u tradicionalnoj medicini i ishrani, postoji iznenađujuće malo ili nimalo podataka u literaturi o fitohemijskom sastavu vrsta *M. alba* L. i *M. nigra* L., sa teritorije Srbije i zapadnog Balkana, koje su i predmet ove doktorske disertacije. Sva do sada objavljena istraživanja su rađena na vrstama koje su tipične za azijsko područje. S obzirom na to da su delovi stabla duda i njeni proizvodi našli primenu u ljudskoj ishrani, evidentna je potreba za daljom detaljnom karakterizacijom hemijskog sastava vrsta roda *Morus*.

Ispitivanja duda pokazuju da plod sadrži veliki broj jedinjenja, od kojih su najzastupljeniji ugljeni hidrati, polifenoli, masne kiseline i vitamini. Konkretno, crni dud sadrži oko 10% invertnog šećera (mešavina glukoze i fruktoze) i oko 2% kiselina: limunske, jabučne i asparaginske (Lee i sar., 2008). Zastupljenost šećera i kiselina uticalo je na upotrebu ploda u prehrambene svrhe, a utvrđivanje hemijskog sastava dudinja kao konstituenata funkcionalne hrane. Pojedina istraživanja pokazuju da su u plodu prisutne masti (0,48-1,11 %), proteini (0,96-1,73%) i dijetetska vlakna (0,57-11,75%) (Imran i sar., 2010). Vitamini koji su prisutni u plodu su vitamin C, E i B₂ (Yang i sar., 2010). Takođe, dokazano je prisustvo velike količine antocijana i drugih polifenolnih komponenata u dudinjama (Ozgen, 2009, Hojjatpanah, 2011). U zavisnosti od vrste duda i klimatskih uslova u kojima je uzgajan dud od fenolnih kiselina najzastupljenije su: *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, vanilinska i hlorogenska kiselina (Memon, 2010). Poslednjih godina pažnja je usmerena na masne kiseline koje su prisutne u plodu, ali i u ulju iz semena duda (koje je

sastavni deo ploda). Podaci koji su objavljeni pokazuju da je dominantna masna kiselina u plodu duda linolna kiselina (C18:2) (Ercisli i Orhan, 2007, 2008; Gecgel i sar, 2011).

Tek se poslednjih godina posvetilo više pažnje analizi lista duda, jer je predmet interesovanja najčešće bio plod. Ispitivanja su pokazala da list sadrži različite sastojke: minerale, vitamine, aminokiseline, sterole, flavonoide, alkaloidne, polisaharide i mikroelemente (Ouyang i sar., 2003). Detaljnije analize su pokazale da list duda osim proteina i ugljenih hidrata, sadrži i kalcijum, gvožđe, askorbinsku i folnu kiselinu, β -karoten, vitamine D i B₁ (Arabshahi-Delouee i sar., 2007). Identifikovano je i jedinjenje iz grupe polihidroksilnih piperidinskih alkaloida, 1-deoksinojirimicin (Nuengchamnong i sar., 2007), a detektovane su i značajne količine melatonina, hormona koji nastaje iz esencijalne aminokiseline triptofana i široko je rasprostranjen u životinjskom svetu, kao i kod mnogih viših biljaka (Pothinuch i Tongchitpakdee, 2011). Međutim, za dejstvo najbitnije je prisustvo fenola, naročito fenolnih kiselina i flavonoida: rutina, kvercetin i izokvercetin. U pogledu prisustva fenolnih kiselina, ispitivanjima su identifikovane: protokatehinska, vanilinska, siringinska, *p*- i *m*-kumarinska i hlorogenska kiselina kao najzastupljenija sa 60,5% do 67,2% u odnosu na ukupan sadržaj fenolnih kiselina u listovima kako *M. nigra*, tako i *M. alba* i *M. laevigata*. Takođe, istraživači su izolovali i druge klase fenolnih jedinjenja, pre svega antocijane (Memon i sar., 2010).

Koren i kora duda su poznati u tradicionalnoj kineskoj medicini i kao nosioci aktivnih principa registrovanih u Kineskoj Farmakopeji. Današnja istraživanja su bazirana na dokazivanju delovanja i sa tim ciljem su identifikovana jedinjenja: stilbeni, flavonoidi, derivati benzofurana i kumarini (Piao i sar, 2010). Dominantni stilben glikozidi su: malberozid A, *cis*-malberozid A i resveratrol-4,3'-di-O- β -D-glukopiranozid (Piao i sar, 2010). Identifikovane su i grupe flavonoida i fenolnih kiselina koje su povezane sa antioksidativnim (Chang i sar., 2011) i antimikrobnim delovanjem (Du i sar., 2003, Kuete i sar., 2009).

Pregled navoda iz literature, koji prikazuju hemijski sastav ispitivanih vrsta *Morus*, dat je u tabeli 4.

Tabela 4. Pregled podataka iz literature o analizi komponenata vrsta roda *Morus*

Deo biljke	Identifikovana jedinjenja	REFERENCA
<i>M. alba</i> L.		
PLOD	flavonoidi	Ercisli i Orhan, 2007, Pawlowska i sar., 2008, Yang i sar., 2010, Gundogdu i sar., 2011
	fenolne kiseline	Ercisli i Orhan, 2007, Memon i sar., 2010, Gundogdu i sar., 2011, Radojković i sar., 2012
	antocijani	Bae i Suh, 2007, Ercisli i Orhan, 2007, Du i sar., 2008, Pawlowska i sar., 2008
	masne kiseline	Yang i sar., 2010
	vitamini	Imran i sar., 2010, Yang i sar., 2010
	minerali	Ercisli i Orhan, 2007, Yang i sar., 2010, Imran i sar., 2010
	saharidi	Imran i sar., 2010, Gundogdu i sar., 2011
LIST	fenolne kiseline	Katsube i sar., 2006, Katsube i sar., 2009, Memon i sar., 2010, Radojković i sar., 2012
	melatonin	Pothinuch i Tongchitpakdee, 2011
	minerali	Lin i sar., 2009, Lin i Lai, 2009

	saharidi	Lin i sar., 2009, Ying i sar., 2011
	flavonoidi	Zhishen i sar., 1999, Sohn i sar., 2004, Katsube i sar., 2006, Lee i sar., 2008, Katsube i sar., 2009, Song i sar., 2009, Sun i sar., 2011
	alkaloidi	Neungchamnong i sar., 2007, Song i sar., 2009, Vichasilp i sar., 2012
	steroli	Zambakhidze i sar., 2005
KOREN	fenolne kiseline	Radojković i sar., 2012
	stilben glikozidi	Piao i sar., 2010
	alkaloidi	Bouillon i Meyer, 2007
	flavonoidi	Park i sar., 2003, Du i sar., 2003, Singab i sar., 2005, Chang i sar., 2011
<i>M. nigra</i>		
PLOD	flavonoidi	Ercisli i Orhan, 2007, Pawlowska i sar., 2008, Gundogdu i sar., 2011
	fenolne kiseline	Zadernowski i sar., 2005, Ercisli i Orhan, 2007, Memon i sar., 2010, Gundogdu i sar., 2011, Radojković i sar., 2012
	antocijani	Hassimotto i sar., 2006, 2006, Ercisli i Orhan, 2007, Pawlowska i sar., 2008, Ozgen i sar., 2009, Song i sar., 2009, Hojjatpanah i sar., 2011
	masne kisleine	Elmaci and Altug, 2002, Ercisli i Orhan, 2008, Yang i sar., 2010 Gecgel i sar., 2011
	minerali	Ercisli i Orhan, 2007, Imran i sar., 2010, Yang i sar., 2010
	saharidi steroli	Hassimotto i sar., 2006, Ozgen i sar., 2009, Gundogdu i sar., 2011 Gecgel i sar., 2011
LIST	fenolne kiseline	Song i sar., 2009, Memon i sar., 2010, Radojković i sar., 2012
	melatonin	Pothinuch i Tongchitpakdee, 2011
<i>M. laevigata W.</i>		
LIST	fenolne kiseline	Bidel i sar., 2007, Song i sar., 2009, Memon i sar., 2010
PLOD	minerali	Imran i sar., 2010
	flavonoidi	Bidel i sar., 2007, Song i sar., 2009
<i>M. atropurpurea Roxb.</i>		
PLOD	antocijani	Isabelle i sar., 2008, Song i sar., 2009, Wu i sar., 2011
	karoteni	Isabelle i sar., 2008
	vitamini	Isabelle i sar., 2008
LIST	flavonoidi	Zhishen i sar., 1999, Song i sar., 2009
<i>M. rubra</i>		
PLOD	fenolne kiseline	Ercisli i Orhan, 2007, Gundogdu i sar., 2011
	flavonoidi	Ercisli i Orhan, 2007, Gundogdu i sar., 2011
	antocijani	Ercisli i Orhan, 2007, Ozgen i sar., 2009
	minerali	Ercisli i Orhan, 2007
	masne kisleine	Ercisli i Orhan, 2007
	saharidi	Ozgen i sar., 2009, Gundogdu i sar., 2011
<i>M. indica L.</i>		
LIST	polifenoli	Arabshahi-Delouee i Urooj, 2007
<i>M. multicaulis Perr.</i>		
LIST	flavonoidi	Zhishen i sar., 1999
<i>M. mesozygia</i>		
KORA i KOREN	flavonoidi	Kuete i sar., 2009
<i>M. lhou</i>		
KORA KORENA	flavonoidi	Kim i sar. 2011

Biološka ispitivanja vrsta roda *Morus* pokazala su da plodovi, ekstrakti svih delova biljke i izolovane komponente pokazuju brojne biološke aktivnosti, što potvrđuje i široku primenu vrsta roda *Morus* u tradicionalnoj istočnjačkoj medicini. Godinama se čaj („Mon tea“, lokalno ime na Tajlandu) od usitnjenog lišća koristi kao antidijabetsko piće. U Japanu zauzima mesto na listi čajeva sa pozitivnim uticajem na opšte stanje organizma. Čajevi se pripremaju od polufermentisanog i potpuno fermentisanog lišća belog duda (Hansawasdi i

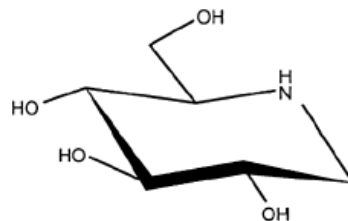
Kawabata, 2006; Sun i sar., 2011). List duda u narodnoj medicini ima najširu primenu u lečenju šećerne bolesti, oboljenja urinarnog trakta i kože (Butt i sar., 2008). Od ploda se pravi nakiseo sirup koji se koristi u narodnoj medicini za lečenje grozničavih stanja, lezija u ustima, kao lek protiv dizenterije, laksativ, antihelminetik, ekspektorans, hipoglikemik i emetik (Ercisli i Orhan, 2007). U Turskoj plodovi duda jedu se sveži, a koriste se i za proizvodnju marmelade, sokova, slatka, kao i prirodnih boja u kozmetičkoj industriji.

Do danas je ispitano i potvrđeno delovanje i aktivnost ekstrakata duda kroz više naučno-istraživačkih radova i studija, koje potvrđuju antioksidativnu, antitumornu i antimikrobnu aktivnost, kao i uticaj na određene tipove diabetesa, aterosklerozu i bolesti kože.

Prisustvo fenolnih jedinjenja, posebno različitih flavonoida (kvercetina, rutina, izokvercetina i astragalina) ukazalo je na visok antioksidativni potencijal (Cui i sar., 2006; Doi i sar., 2001; Du i sar., 2003, Katsube i sar., 2006). Po nekim istraživanjima sadržaj rutina i kvercetina, koji je veći u odnosu na crni i beli luk, omogućio je primenu ekstrakata lista duda u brojnim *in vivo* i *in vitro* oksidativnim procesima (Enkhmaa i sar., 2005; Katsube i sar., 2006; Chen i Li, 2007). Visok antioksidativni potencijal su pokazali i plodovi različitih vrsta *Morus*. Ercisli i Orhan (2007) su dokazali da plod duda, naročito crnog, ima veliki sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i askorbinske kiseline. Ispitana je korelacija između prisutnih komponenata i antioksidativne aktivnosti praćene različitim testovima (Oh i sar., 2002; Konezak-Islam i sar., 2003; Chen i sar., 2006; Memon i sar., 2010). Jedinjenja malberozid i oksiresveratrol su pokazala inhibitorni efekat lipidne peroksidacije kod pacova (Chung et al., 2003). U nekim uslovima kao što su dijabetes i kardiovaskularne bolesti, oksidativni stres ima različitih uticaja. Lipidna peroksidacija u slučaju dijabetesa smanjuje sadržaj glutaciona (GSH) i pod takvim uslovima ekstrakt duda utiče na smanjenje aktivnosti katalaze (Andallu i Varadacjariulu, 2003). Uticaj ekstrakata ploda belog duda na Parkinsonovu bolest dokazan je kroz istraživanje Kim i sar. (2010).

Ispitivanja ukazuju i da ekstrakti duda poseduju značajan antimikrobni potencijal (Park i sar., 2003). U ekstraktima lista belog duda dokazano je prisustvo flavonoida sa jakom antibakterijskom aktivnošću i sa minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) od 5 do 30 mg/ml (Nomura i sar., 2001; Sohn i sar., 2004). Takođe, različite frakcije duda, kao što su hloroformski ekstrakti, pokazali su antimikrobnu aktivnost prema *Bacillus subtilis*, a frakcije dobijene dodatkom sirćetne kiseline prema sojevima *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* i *Escherichia coli* (Kim i sar., 1993). Flavonoidi morusin, kuanon C (*kuwanon C*), sangenon B i D (*sanggenon B i D*), bioaktivni molekuli kore duda, pokazali su snažnu antimikrobnu aktivnosti protiv *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *B. subtilis*, *Micobacterium smegmatis* i nekih vrsta plesni (Nomura i sar., 1988). Park i sar. (2003) su odredili MIK (8,0 mg/ml) za kuanon G, izolovan iz etilacetatne frakcije ekstrakta lista duda, u odnosu na *Streptococcus mutans* koji je izazivač zubnog karijesa. Leahianon G (*leachianone G*) jedinjenje izolovano iz kore korena duda, u istraživanju Du i sar. (2003) je pokazalo antivirusni potencijal (IC₅₀ = 1,6 mg/ml) u odnosu na herpes simpleks virus tip 1 (HSV-1).

Morus ekstrakti su pozitivan uticaj pokazali i u zaustavljanju ateroskleroze, jer sprečavaju oksidativne modifikacije LDL. Dijetetska primena listova *M. alba* i glikozida flavonola je povezana sa smanjenjem aterosklerotskih lezija i oksidativnih modifikacija LDL receptora miševa (Katsube i sar., 2006; Enkhmaa i sar., 2005). U istraživanjima Harauma i saradnika (2007) otkriveno je značajano usporavanje oksidacije lipoproteina, 40% se smanjuju aterosklerotske lezije u aorti u apolipoproteinima miševa, ukoliko miševi kroz ishranu uzimaju 1% lista duda u prahu. Oralna upotreba ekstrakata kore duda utiče i na smanjenje LDL-oksidacije i LDL-agregacije (El-Beshbishy i sar., 2006). U dosadašnjim ispitivanjima list duda je pokazao i diuretičku, hipoglikemijsku i antihipertenzivnu aktivnost (Kelkar i sar., 1996). Hipoglikemijsko dejstvo povezuje se sa prisustvom alkaloida 1-deoksinojirimicina (slika 19), koji je poznat kao jedan od najpotentnijih inhibitora α -glukozidaze. Inhibicijom ovog enzima sprečava se razgradnja skroba i saharoze, a samim tim i apsorpcija glukoze, što rezultuje smanjenjem nivoa šećera u krvi (Nuengchamnonng i sar., 2007). Studija Hansawasdi i Kawabata (2006) je pokazala da svakodnevno konzumiranje čaja, pripremljenog od 1 g usitnjenog lista i vode (98°C), bitno utiče na inhibiciju saharaze, maltaze i α -glukozidaze. Korišćenje lišća duda u kombinaciji sa drugim biljkama ima pozitivan uticaj na diabetes tip II (Musabayane i sar., 2006; Lee i sar., 2008). Antidijabetično delovanje, koje je utvrđeno, se delimično pripisuje prisustvu vitamina B₂ u plodu duda, i ima značaj kao dopunska terapija.



Slika 19. 1-Deoksinojirimicin

Tradicionalno, list duda se koristi za ublažavanje nesanice, što se može objasniti terapijskim efektom melatonina, jedinstvenim molekulom koji je uključen u regulaciju cirkadijalnog ritma i ublažavanje poremećaja spavanja. Količine melatonina u listu duda veće su u odnosu na višnje, đumbir, šargarepe, banane i jagode, koji su već poznati kao izvori ovog jedinjenja. Iznenadjuće značajne količine ove supstance u listovima duda ukazuju da bi oni mogli biti dobar izvor fitomelatonina. Takođe, prijavljena su još neka dejstva ekstrakta lista duda, između ostalog smanjenje gojaznosti i inhibicija biosinteze melanina (Pothinuch i sar., 2011).

Dud i njegovi proizvodi našli su primenu i u vidu imunonutritivnih agenasa. Prisutni vitamini i antocijani u plodovima duda našli su široku upotrebu u obliku funkcionalne hrane i dodataka ishrani sa ciljem poboljšanja opšteg stanja organizma (Ercisli i Orhan, 2007). Chen i sar. (2006) su dokazali antitumorni uticaj antocijana (izolovanih iz duda) na ćelije karcinoma pluća A549, kao i citotoksičnu aktivnost ekstrakta duda u odnosu na ćelije hepatoma (raka jetre), sa IC₅₀ vrednosti manjom od 53 μ g/ml. Ispitani su uticaji i na ćelije

melanoma B16 miša i leukemije (Nam i sar., 2002). Polisaharidi *M. alba* povećavaju proliferaciju limfocita i smanjuju proizvodnju antitela B ćelija, pa samim tim imaju ulogu i u antiupalnim procesima (Kim i sar., 2000).

2.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

Slobodni radikali su zauzeli posebno mesto i postali predmet interesovanja u mnogim naučno-istraživačkim studijama poslednjih godina. Zanimanje za slobodne radikale nastalo je usled otkrića da su oni medijatori brojnih patologija (dijabetes, HIV infekcija, autoimunih, neurodegenerativnih, koronarnih, malignih, plućnih, inflamatornih i mnogih drugih bolesti) i da su deo kompleksnog patofiziološkog mehanizma oštećenja, a u pojedinim bolestima njihovo učešće je potencirano (Jovičić i sar. 1997a; 1997b). Po osnovnoj definiciji, slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, a mogu nastati transferom jednog elektrona na neradikalnu vrstu ili homolitičkim raskidanjem kovalentne veze (Cadenas i Davies, 2000). Nesporeni elektron slobodnoradikalne vrste može da se nalazi 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 ($\text{RO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$), na N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala ($\text{NO}\cdot$) ili na S-atomu, kao kod tiil radikala ($\text{RS}\cdot$). Nesporeni elektron imaju i atom vodonika ($\text{H}\cdot$) i halogena ($\text{Cl}\cdot$), alkalni metali ($\text{Na}\cdot$), kao i neki joni metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}). Takođe, slobodni radikali mogu biti neutralni, ali i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani.

Opšti termin reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS) obuhvata kiseonikove radikale i određene neradikalne vrste koje su oksidativna sredstva i/ili se lako prevode u radikale: HOCl, HOBr, O_3 , ONOO^- , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 . Međutim, pored ROS, značajnu grupu reaktivnih jedinjenja čine i reaktivne vrste hlora (*reactive chlorine species*, RCS), broma (*reactive bromine species*, RBS) i azota (*reactive nitrogen species*, RNS), čiji pregled je prikazan u tabeli 5. Pojam reaktivne vrste predstavlja opšti termin koji objedinjuje ROS, RNS i reaktivne vrste sumpora i halogena. Iako svi kiseonični radikali jesu ROS, svi ROS nisu samo radikalne vrste kiseonika (Halliwell, 2006).

Slobodni radikali se u organizmu stvaraju:

- 1) **u fiziološkim uslovima** tokom: procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, tj. ćelijskog disanja, oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom, autooksidacije brojnih malih molekula (npr. autooksidacija dopamina u mozgu),
- 2) **u inflamaciji** tokom procesa fagocitoze,
- 3) **u bolestima**: autoimune bolesti, neurodegenerativne, maligne, kardiovaskularne, bolesti nastale usled prisustva toksičnih supstanci, kao i u različitim nefiziološkim uslovima, kao što su ishemija, hipoksija, hiperoksija, reperfuzija i dr.,
- 4) **biotransformacijom ksenobiotika** tokom metabolisanja egzogeno unetih jedinjenja (hrana, lekovi, itd.) ili dejstvom spoljašnjih faktora sredine (UV zračenja, jonizujuće zračenje, aerozagađenje),

- 5) pri pojačanoj fizičkoj aktivnosti,
6) pri trovanju (Đukić, 2008).

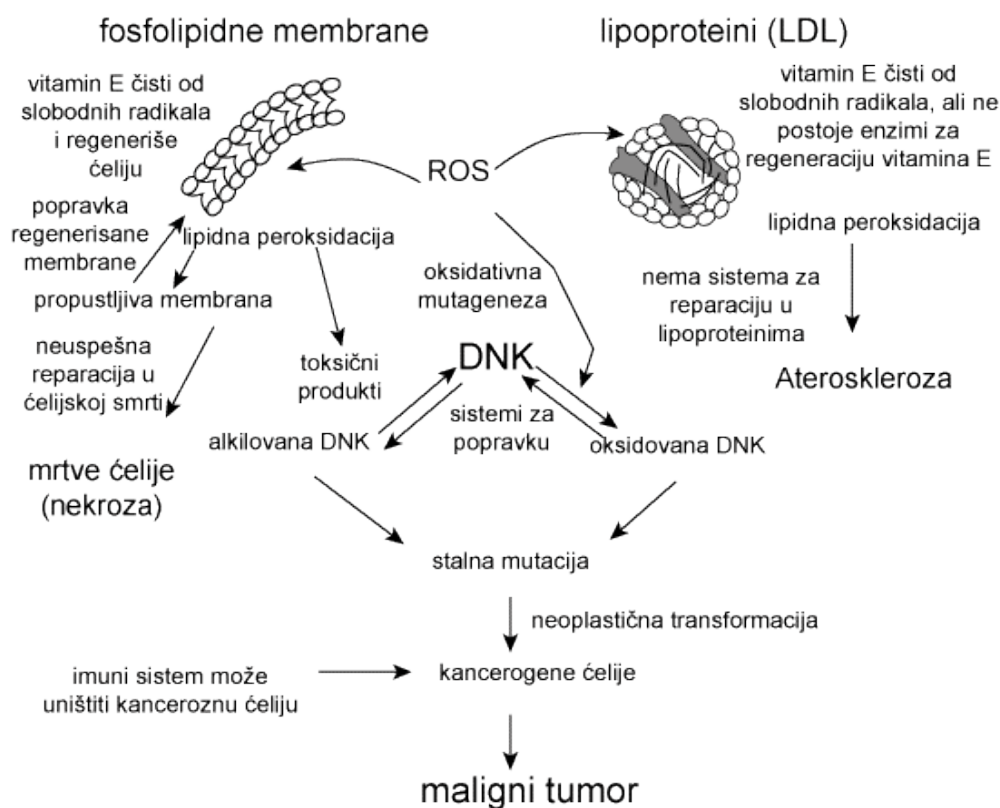
Tabela 5. Nomenklatura reaktivnih slobodnoradikalskih i neradikalskih vrsta

Slobodnoradikalске vrste		Neradikalске vrste		
ROS	$O_2^{\bullet-}$	Superoksid anjon radikal	H_2O_2	Vodonik peroksid
	HO^{\bullet}	Hidroksil radikal	$HOBr$	Hipobromna kiselina
	HO_2^{\bullet}	Hidroperoksil radikal	$HOCl$	Hipohlorna kiselina
	RO_2^{\bullet}	Peroksil radikal	O_3	Ozon
	RO^{\bullet}	Alkoksil radikal	$^1\Delta gO_2$	Singletni kiseonik
	$CO_3^{\bullet-}$	Karbonatni radikal	$ROOH$	Organski peroksidi
	$CO_2^{\bullet-}$	Ugljendioksidni radikal	$ONOO$	Peroksinitrit
	$^1\Sigma g^+O_2$	Singletni kiseonik	$ONOOH$	Peroksinitritna kiselina
RNS	NO^{\bullet}	Azotmonoksidni radikal	HNO_2	Nitritna kiselina
	NO_2^{\bullet}	Azotdioksidni radikal	NO^+	Nitrozil katjon
	NO_3^{\bullet}	Nitratni radikal	NO^-	Nitrozil anjon
			N_2O_3	Azot(III)-oksid
			N_2O_4	Azot(IV)-oksid
			$ONOO^-$	Peroksinitrit
			O_2NOO^-	Peroksinitrat
			$ONOOH$	Peroksinitritna kiselina
			NO^{2+}	Nitronijum katjon
			$ROONO$	Alkilperoksinitriti
			RO_2ONO	Alkilperoksinitrati
			NO_2Cl	Nitronijum hlorid
RCS	Cl^{\bullet}	Atomski hlor	$HOCl$	Hipohlorna kiselina
			NO_2Cl	Nitril (nitronijum) hlorid
				Hloramini
			Cl_2	Hlor (gas)
			$BrCl$	Brom hlorid
		ClO_2	Hlor (IV) oksid	
RBS	Br^{\bullet}	Atomski brom	$HOBr$	Hipobromna kiselina
			Br_2	Brom (gas)
			$BrCl$	Brom hlorid

Kod zdravih aerobnih organizama produkcija slobodnoradikalskih vrsta je u stalnoj ravnoteži sa antioksidativnim odbrambenim sistemom. Iako slobodni radikali imaju značajnu ulogu u nizu fizioloških procesa, poremećaj balansa između ovih reaktivnih vrsta i antioksidativnog sistema može da dovede do ozbiljnog narušavanja normalne homeostaze ćelije. Naime, narušavanje oksido-reduktivne ravnoteže usled povišenog nivoa slobodnih radikala, uz visok stepen njihove neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti, čiji uzrok su nesporeni elektroni, dovodi do stanja oksidativnog stresa. Kao posledica oksidativnog stresa

javljaju se tzv. oksidativna oštećenja, koja se izražavaju kroz različita patološka stanja (Đukić, 2008).

Uopšteno, pri povišenom nivou slobodnih radikala dolazi do oksidativnog stresa, koji može biti posledica povećanog izlaganja kiseoniku, prisustva toksina koji proizvode ROS, inflamatornih procesa i sl., ili inhibirane funkcije antioksidativnog sistema, koja se javlja pri npr. smanjenju aktivnosti enzima glutation peroksidaze i superoksid dismutaze. Oksidativni stres može da se manifestuje kroz različite odgovore ćelija, kao što su proliferacija i adaptacija. Proliferacija, kojom mnoge ćelije odgovaraju na umereni oksidativni stres npr. može biti dobra (npr. kod zarastanja rana), ali loša ako vodi fibrozi tkiva. Adaptacija, koja podrazumeva pokretanje antioksidativnog odbrambenog sistema, može delimično, povećano ili potpuno da zaštiti ćeliju od ROS, a uključuje i povećanje koncentracija intracelularnog Ca^{2+} i prelaznih metala koji mogu da katalizuju slobodnoradikalske reakcije. Međutim, oksidativni stres može da izazove ozbiljna oštećenja ćelije, odnosno lipida, DNK, proteina, ugljenih hidrata i dr., što u nekim slučajevima može biti inicijalna reakcija za adaptacione procese (slika 20, Lawrence 2010). Takođe, oksidativno oštećenje može da izazove i starenje ćelije (ćelija preživljava, ali gubi sposobnost deobe), ali i njenu smrt. Naime, ako u ćeliji ne dođe do zamene oštećenih biomolekula, mogu da se jave trajna oksidativna oštećenja ili može da dođe do pokretanja procesa poput apoptoze ili nekroze, koji neizbežno dovode do umiranja ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2007).



Slika 20. Posledice oksidativnog stresa na ćelijske membrane, lipoproteine i DNK

Slobodnoradikalske reaktivne vrste mogu da budu uzročnici bolesti, kao što su biološke posledice izloženosti povišenoj radijaciji ili insuficijencija selen i tokoferola u ishrani. Oksidativni stres je najčešće uzrok bolesti imunog sistema, ishemije, reakcija koje izazivaju lekovi ili toksini, starenje i niz uticaja koji izazivaju poremećaj funkcije jetre, srca i kardiovaskularnog sistema, crvenih krvnih zrnaca, respiratornog sistema, bubrega, nervnog sistema i dr. Uopšteno, kliničke studije su pokazale da se povišeni nivo ROS, odnosno oksidativna oštećenja koja oni izazivaju, mogu dovesti u direktnu vezu sa nizom oboljenja, poput ateroskleroze, vazospazma, bolesti bržeg starenja, kancera, reume, moždanog udara, astme, artritisa, infarkta srca, dermatitisa, kataraktogeneze, oštećenja retine, hepatitisa, oštećenje jetre (Halliwell i Gutteridge, 2007). Ishrana bogata biljkama doprinosi smanjenju rizika od razvijanja ovih bolesti, zahvaljujući mnoštvu antioksidanasa prisutnih u njima (Halliwell, 2009).

2.4.1. ANTIOKSIDANSI I ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA

Opšta definicija antioksidanasa podrazumeva sve supstance koje u koncentracijama znatno nižim od koncentracije supstrata koji može da se oksiduje, značajno smanjuju ili sprečavaju njegovu oksidaciju. U širem smislu, antioksidans je zapravo agens koji onemogućava, sprečava ili uklanja oksidativna oštećenja ciljanog molekula (Halliwell i Gutteridge, 2007). Neki antioksidansi se sintetišu u organizmu (endogeni), a drugi (egzogeni) unose hranom ili upotrebom dijetetskih suplemenata. Grupu endogenih antioksidanasa čine enzimi (superoksid-dismutaza, katalaza i Se-glutation peroksidaza) koji metabolišu superoksid anjon radikal, vodonik peroksid i lipidne perokside, neenzimski molekuli (glutation, histidin-peptidi, transferin i feritin, dihidrolipoiniska kiselina, redukovani oblik koenzima Q, melatonin, urati i protein-tioli plazme), kao i neki hemijski elementi (cink i selen). Ovi sistemi su međusobno komplementarni, jer deluju sinergistički protiv različitih radikala u različitim ćelijskim prostorima. Međutim, i pored postojanja odbrambenih antioksidanasa, koji su sposobni da suzbiju stvaranje slobodnih radikala ili prekinu lančane reakcije koje oni iniciraju, do određenih oštećenja ipak dolazi. Stoga su odbrambeni sistemi humanog organizma dopunjeni reparativnim antioksidansima, uglavnom enzimima (proteaze, lipaze, transferaze i enzimi koji repariraju DNK). Zbog ograničene efikasnosti endogenih odbrambenih sistema i postojanja nekih patofizioloških faktora (zagađenje vazduha, pušenje, UV- i jonizirajuće zračenje, ishrana bogata polinezasićenim masnim kiselinama, inflamatorni procesi, ishemija, itd.) koji doprinose povećanom stvaranju slobodnih radikala, neophodno je, hranom ili na neki drugi način, uneti egzogene antioksidanse koji će umanjiti kumulativni efekat oksidativnih oštećenja tokom života. Najpoznatiji i najznačajniji egzogeni antioksidansi su vitamini C, E i A, karotenoidi, polifenoli i drugi (Pietta, 2000; Fang i sar., 2002).

Ustanovljeno je da redovno korišćenje namirnica biljnog porekla i dijetetskih suplemenata sa visokim antioksidativnim potencijalom u svakodnevnoj ishrani predstavlja važan i efikasan vid preventive ne samo kardiovaskularnih oboljenja, već i procesa starenja kože i vezivnih tkiva, nekih degenerativnih oboljenja lokomotornog i kardiovaskularnog sistema (reumatoidni artritis, hipertenzija, ateroskleroza), degenerativnih očnih bolesti (katarakta), kognitivne disfunkcije i različitih neurodegenerativnih procesa (senilna demencija), astme, nekih oblika diabetesa i karcinoma, tj. bolesti povezane sa oksidativnim stresom (Maksimović, 2008) . U cilju ispitivanja uticaja različitih agenasa na nivo slobodnih radikala kako u hrani, tako i u biološkim sistemima, metode za određivanje neutralizacije slobodnih radikala, odnosno antioksidativnog potencijala imaju široku primenu. Određivanjem antioksidativnog statusa u biološkim sistemima može da se prati uticaj ishrane ili dodataka ishrani na oksidativni stres i doprinos u prevenciji bolesti čiji su uzročnici oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002).

Uopšteno, testovi za određivanje antioksidativnog potencijala u biološkim sistemima i namirnicama mogu biti zasnovani na:

- 1) transferu elektrona,
- 2) sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i
- 3) inhibiciji lipidne peroksidacije.

Zbog velikog broja reaktivnih hemijskih vrsta koje narušavaju homeostazu ćelije i raznolikosti mehanizma njihovog delovanja, nemoguće je definisati jednu metodu za određivanje antioksidativne aktivnosti. U procesu evaluacije antioksidativnog potencijala ispitivane supstance, potrebno je izabrati kombinaciju više testova koji se zasnivaju na različitim principima i pokazuju antioksidativni potencijal ispitivane supstance putem različitih mehanizama delovanja. U tabeli 6 (Lesjak, 2011) navedene su neke od metoda koje se mogu primeniti za određivanje antioksidativnog potencijala.

Tabela 6. Primeri metoda za određivanje antioksidativnog potencijala u biološkim sistemima i namirnicama

METODA	PRINCIP
Transfer elektrona	
Određivanje neutralizacije DPPH [•] radikala Određivanje redoks potencijala Određivanje neutralizacije ABTS ^{•+} radikala	merenje procenta neutralizacije stabilnog DPPH [•] radikala (Espin i sar., 2000) Reducing power metoda, praćenje redukcione sposobnosti na osnovu transformacije Fe ³⁺ → Fe ²⁺ (Oyaizu, 1986) FRAP test (<i>ferric ion reducing antioxidant power</i>), merenje procenta inhibicije redukcije Fe ³⁺ -tripiridiltriazin kompleksa (MacDonald-Wicks i sar., 2006) TEAC test (<i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>), merenje procenta neutralizacije ABTS ^{•+} radikala i poređenje sa Trolox-om (Sánchez-Moreno, 2002)
Sposobnost hvatanja slobodnih radikala	
Određivanje kapaciteta hvatanja superoksid anjon radikala	merenje procenta inhibicije stvaranja O ₂ ^{•-} , generisanog u reakciji fenazin-metilsulfata (PMS) u prisustvu NADH i molekuskog kiseonika ili hipoksantin/ksantin-oksida za sistem (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije stvaranja etena u reakciji generisanog O ₂ ^{•-} sa α-

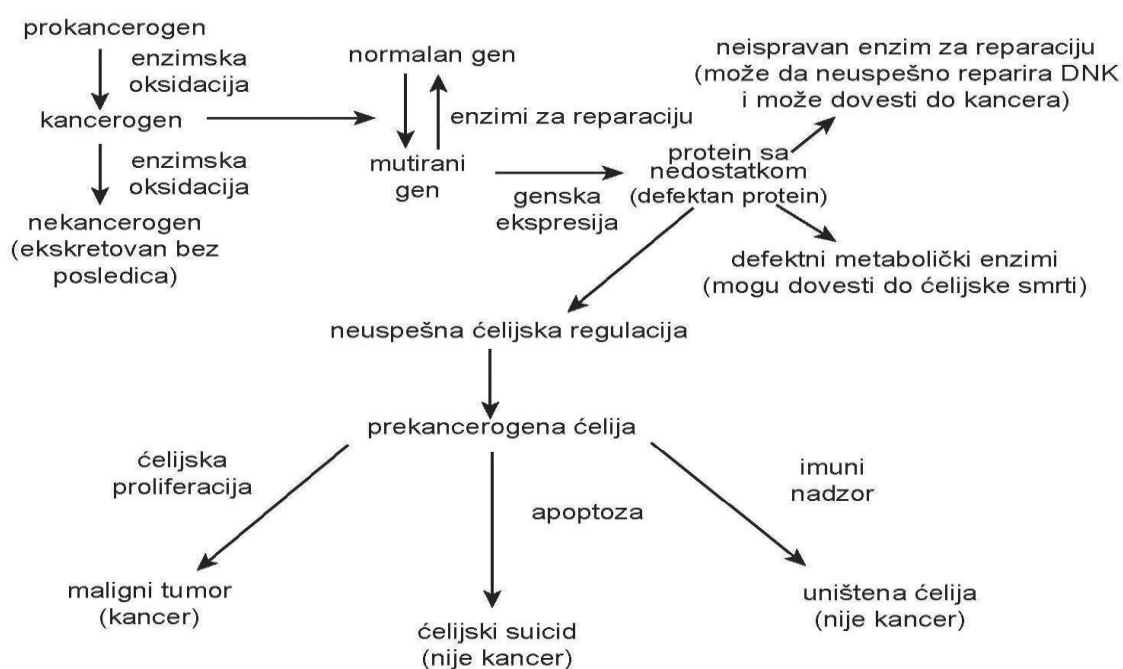
Određivanje kapaciteta hvatanja hidroksil radikala	ketometiolbuternom kiselinom (KMB) (MacDonald-Wicks i sar., 2006) „hvatanje“ generisanog $O_2^{\bullet-}$ 5,5-dimetil-1-pirolin- <i>N</i> -oksidom (MacDonald-Wicks i sar., 2006) „deoksiriboza test“, merenje procenta inhibicije stvaranja malonildialdehida (MDA) (Sánchez-Moreno, 2002) HORAC test (<i>hydroxyl radical averting capacity</i>), merenje procenta inhibicije hidroksilacije <i>p</i> -hidroksibenzojeve kiseline HO^{\bullet} (MacDonald-Wicks i sar., 2006) 3D test (<i>damaged DNA detection</i>), merenje procenta inhibicije stepena oštećenja DNK izazvanog HO^{\bullet} (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije peroksidacije lipozoma ili linoleinske kiseline izazvane ROO^{\bullet} generisanim iz azo jedinjenja (Sánchez-Moreno, 2002) TRAP test (<i>total radical-trapping antioxidant parameter assay</i>), određivanje antioksidantnog statusa humane plazme praćenjem potrošnje kiseonika tokom oksidativnog procesa (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks i sar., 2006)
Određivanje kapaciteta hvatanja peroksil radikala	ORAC test (<i>oxygen radical absorbance capacity assay</i>), merenje procenta inhibicije promene fluorescencije B-fikoertrina ili fluoresceina u prisustvu azo-generatora ROO^{\bullet} (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks i sar., 2006) merenje procenta inhibicije izbeljivanja karotenoida krocina u prisustvu azo-generatora ROO^{\bullet} (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje kapaciteta hvatanja vodonik-peroksida	merenje procenta inhibicije skopoletina u nefluorescentni proizvod pod dejstvom peroksidaze iz rena (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije hemiluminiscencije pobuđenog aminoftalata (MacDonald-Wicks i sar., 2006)
Određivanje kapaciteta hvatanja hipohlorne kiseline	merenje procenta inhibicije oslobađanje etena u sistemu mijeloperoksidaza/ H_2O_2 / $NaCl$ (Sánchez-Moreno, 2002) merenje procenta inhibicije α 1-antiproteinaze (Sánchez-Moreno, 2002)
Određivanje kapaciteta hvatanja azot(II)-oksida	merenje procenta inhibicije nitritnih jona (Green i sar., 1982)
Određivanje kapaciteta hvatanja peroksinitrita	merenje procenta inhibicije promene fluorescencije dihidrorodamina 123 u fluorescentni rodamin 123 (Sánchez-Moreno, 2002)
Lipidna peroksidacija	
Inhibicija lipidne peroksidacije	merenje potrošnje kiseonika (Laguerre i sar., 2007) izbeljivanje β -karotena (Laguerre i sar., 2007) praćenje formiranja primarnih produkata oksidacije hidroperoksida (Laguerre i sar., 2007) praćenje formiranja sekundarnih produkata oksidacije malonildialdehida (Laguerre i sar., 2007)

2.5. ANTIKANCEROGENO DELOVANJE

U savremenoj populaciji sve veći procenat uzroka smrtnosti su hronična oboljenja kao što su infarkt, moždani udar i kancer. Još u XIX veku konstatovano je da porast industrijalizacije povećava broj obolelih od kancera (Tanchou, 1843; World Health Organization, 1997). Kancer je oboljenje kod kojeg su procesi proliferacije, razvitka i smrti ćelije poremećeni. Kancerogeneza je složeni proces prelaska normalne ćelije u maligno stanje (slika 21), a agensi koji indukuju taj proces zovu se kancerogeni. Kancerogeni procesi mogu da započnu u gotovo svakom organu, ali tkiva kod kojih je proliferacija ćelija inače

intenzivnija i koja su hronično izložena spoljašnjim uticajima (pluća, creva, itd.) su posebno podložna. Prokancerogene supstance mogu biti konvertovane oksidativnim metabolizmom (najčešće u jetri) u kancerogene, koji mogu ući u cirkulaciju i biti preuzeti u ćelije specifičnih tkiva i dovesti do mutacija DNK ćelija. Mutirani gen može proizvesti defektne proteine koji mogu imati različite uticaje na ćeliju, ćeliju čine neodrživom (kao takva neće preživeti) ili ćeliju transformišu u prekancerogenu, što može voditi apoptozi, uništenju od strane imunog sistema, ili ćelija može preživeti i preći u formu kancerogenog tumora (Lawrence, 2010).

Svako nagomilavanje ćelija preko one količine koja je potrebna za razvoj, oporavak ili funkciju tkiva naziva se tumor. Tumor može biti benigni ili maligni, gde maligni tumor brže raste i ima tendenciju invazije na susedna tkiva (Bogdanović, 2000).



Slika 21. Kancerogeneza

Brojna laboratorijska i epidemiološka istraživanja nisu u potpunosti utvrdila faktore koji uslovljavaju pojavu kancerogenih oboljenja. Doll i Peto (1981) su u svojim istraživanjima pokazali da je za 35% kancera odgovorna ishrana. Centralnu ulogu ishrane u sprečavanju kancerogenih pojava potvrdio je i Svetski fond za ispitivanje kancera (World Cancer Research Fund, 1997). Veliki broj istraživanja potvrđuje zaštitni efekat biljne ishrane koji je i prihvaćen od strane nutricionista (Block i sar., 1992; Steinmetz i Potter, 1996; World Cancer Research Fund, 1997).

Tokom razvoja medicinskih nauka, priroda je oduvek predstavljala bogat i neiscrpan izvor novih biološki aktivnih supstanci, uključujući i antikancerogene supstance. Postoji veliki broj biljnih vrsta koje su kao izvor antitumorskih jedinjenja korišćene u tretmanima ili prevenciji kancera (Reddy i sar., 2003). Sprovedene su različite terapije kancera, uključujući i

korišćenje prirodnih produkata iz viših biljaka. Stoga, postoji velika potreba da se istraže efikasni, neiscrpní izvori prirodnih supstanci. Takođe je bitno i razumevanje mehanizama antitumorskih agenasa zbog buduće primene u terapiji. Postoji veliki broj biljnih vrsta koje su kao izvor antitumorskih jedinjenja korišćene u tretmanima ili prevenciji kancera (Hsu, 2008).

Razvoj onkologije, naučna ispitivanja i kliničko lečenje tumora otpočeli su početkom XX veka, ali je tek razvojem molekularne biologije omogućeno bolje razumevanje tumora. Ispitivanja se vrše na izolovanim ćelijama koje se uzgajaju *in vitro*, kao i na eksperimentalnim životinjama, koja obično zahtevaju velike doze kancerogena da bi se dobio veliki prinos ćelija kancera u toku eksperimenta. Međutim, indukcija kancera u ljudskom organizmu zahteva njegovo izlaganje kompleksnom sklopu kancerogenih stimulanasa tokom dužeg vremenskog perioda. *In vitro* biološki testovi na ćelijskim linijama se mogu koristiti za skrining prirodnih proizvoda ili sintetskih organskih jedinjenja radi otkrivanja njihove potencijalne aktivnosti u terapiji tumora. U ovim testovima koriste se neoplastične ćelijske linije humanog porekla ili poreklom od tumora drugih sisara. Sposobnost jedinjenja koje se testira da inhibira rast ovih tumorskih ćelija u kulturi predstavlja indikaciju njegove potencijalne vrednosti kao terapijskog sredstva *in vivo* (Lieberman i sar., 2001).

In vitro citotoksična ispitivanja se koriste kao brze metode za identifikaciju potencijalnih antineoplastika. Antineoplastici su lekovi koji inhibiraju rast i razvoj abnormalne mase tkiva (*neoplasm*) kao rezultat abnormalnog deljenja ćelija (*neoplasia*) (Briemann i sar., 2006). Primeri citotoksičnih agenasa su hemijske supstance, određene imune ćelije ili pojedini tipovi otrova (npr. otrovi zmija ili pauka). Citotoksičnost dovodi i do zaustavljanja aktivnosti rasta i deljenja ćelija (opadanje sposobnosti za rast) ili do aktiviranja genetskog programa za kontrolisano ubijanje ćelije (*apoptosis*) (Promega Corporation, 2006; Promega Corporation, 2007). Jedan od načina citotoksičnog dejstva hemijskih jedinjenja je i aktivacija apoptotičkih mehanizama, što predstavlja i jedan od načina lečenja karcinoma i zaustavljanja rasta tumora (Thompson, 1995).

Farmaceutska industrija u velikoj meri koristi citotoksična ispitivanja za potvrđivanje efekata hemijskih jedinjenja na životni ciklus ćelije. Istraživači tragaju za citotoksičnošću određenog jedinjenja ako postoji interesovanje da se to jedinjenje može primeniti kao terapijski agens za sprečavanje progresivnog deljenja ćelija kancera ili se žele potvrditi netoksične osobine leka koji pretenduje da ima terapijsku primenu.

Ocena celovitosti ćelijske membrane je jedan od načina za merenje citotoksičnih efekata. Jedinjenja koja ispoljavaju citotoksične efekte često narušavaju integritet membrane. Boje kao što su „trypan blue“ ili propidijum jodid pod normalnim okolnostima ne mogu ući unutar zdrave ćelije, međutim, ako je ćelijska membrana oštećena boja može slobodno da prodre unutar ćelije i ostane u njoj (Riss i Moravec, 2004). Integritet membrane se može proceniti i na osnovu procene prelaska supstanci koje se inače normalno nalaze unutar ćelije, u okruženje ćelije. U ovakvim ispitivanjima najčešće se meri aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) (Decker i Lohmann-Matthes, 1988).

2.6. TOKSIČNOST I GENOTOKSIČNOST

U cilju maksimalnog smanjenja rizika od primene prirodnih agenasa (biljaka, delova biljke ili njihovih ekstrakata) neophodno je poznavati njihovu potencijalnu toksičnost i genotoksičnost. Genotoksikologija je multidisciplinarno područje istraživanja koje uključuje detektovanje oštećenja DNK i narušavanje procesa nasleđivanja, kao i razumevanje bioloških posledica oštećenja DNK. U poslednjih pet decenija razvijeni su brojni test sistemi za identifikovanje jedinjenja koja deluju na DNK sa primarnim ciljem da se ljudi zaštite od oštećenja naslednog materijala i posledica takvih oštećenja. Među najpoznatijim posledicama su svakako indukcije kancera (Pitot, 1986; Silberhorn i sar., 1990; Tchounwou i sar., 1996; Morales i sar., 2000) i ubrzavanje starenja. Oštećenja u germinativnim ćelijama vode ka naslednim bolestima i uzrokuju smanjenje fertiliteta. Veliki broj testova koji se izvode na sisarima ili njihovim ćelijama *in vitro* zahteva koncentrisanje uzoraka, što menja prirodu delovanja.

Biohemijski testovi za biljke, koji se uglavnom odlikuju većom osetljivošću u odnosu na ostale sisteme, pokazali su se uspešnim u različitim situacijama (Grant i sar., 1999). Kao posebno podesan pokazao se Allium test koji se izvodi na običnom luku, *Allium cepa*. Levan je još 1938. godine uveo u praksu Allium test za ispitivanje genotoksičnih potencijala i od tada je ovaj test uspešno upotrebljen u istraživanjima mnogo puta, u izvornom ili modifikovanom obliku, za ispitivanje različitih jedinjenja rastvorljivih ili nerastvorljivih u vodi (Fiskesjö i sar., 1981; Rank i Nielsen, 1997; Rank i sar., 2002; Kalcheva i sar., 2009), prirodnih voda (Fiskesjö, 1985; Majer i sar., 2003; Vujošević i sar., 2008), vode za piće (Al-Sabti i Kurelec, 1985), snega (Blagojević i sar., 2009) i otpadnih voda (Fiskesjö, 1993; Monarca i sar., 2000). Ispitivanjem efekata jedinjenja žive, dihlorfenola, benzopirena i različitih nitrozoguanidina pokazano je da je ovaj test podjednako osetljiv (u nekim slučajevima i osetljiviji) u odnosu na testove koji se izvode na ćelijama sisara, uključujući i čoveka (Fiskesjö i sar. 1981). Takođe, pokazano je da testiranje istih genotoksičnih supstanci (akridina i maleičnog hidrazida) u različitim laboratorijama daje ponovljivo iste rezultate (Rank i sar., 2002). Veliku osetljivost Allium testa dobro ilustruje sposobnost detekcije potencijalne genotoksičnosti u vodi za piće. Tako su Al-Sabti i Kurelec (1985) utvrdili indukciju hromozomskih aberacija kao posledicu prisustva sporednih produkata hlorovanja vode. Evseeva i sar. (2003) ispitivali su ovim testom nivo genotoksičnosti u vodenim rezervoarima u čijoj blizini su smeštene ćelije za čuvanje industrijskog radijuma. Iako koncentracije radijuma i drugih radioaktivnih elemenata u vodi ne prelaze dozvoljene granice, Allium test pokazuje povećane nivoe genotoksičnosti koja raste sa koncentracijom elemenata. Prednosti ovog sistema su velika osetljivost, sličnosti u hromozomskoj organizaciji sa ljudima, dobra korelacija sa drugim sistemima i mogućnost ispitivanja uticaja u različitim uslovima (Rank, 2003).

Danas je u upotrebi modifikacija testa (Rank i Nielsen, 1993) označena kao *Allium anafazno-telofazni test*. Najvažnije prednosti ovog test sistema su sličnost hromozomske organizacije sa genomom čoveka, veća osetljivost u poređenju sa drugim test sistemima i

moгуćnost upotrebe u različitim uslovima (Grant i sar., 1999). Sem toga, test je relativno jednostavan i lako izvodljiv, ekonomičan, toleriše širok raspon pH vrednosti, nema potrebe za prečišćavanjem uzoraka i istovremeno se testira toksičnost i genotoksičnost. S obzirom da ovaj test pokazuje odličnu korelaciju sa testovima koji se obavljaju na sisarima u uslovima *in vivo* (Fiskesjö, 1985), rezultati se mogu sa visokom pouzdanošću ekstrapolirati na ljudski organizam. Ovim testom ispituje se potencijalna sposobnost uzoraka da indukuju promene koje se očitavaju u ćelijskoj deobi i porede sa kontrolama, pozitivnom, koju čini poznati mutagen i negativnom, koja je voda standardnog kvaliteta.

2.7. EKSTRAKCIJA I EKSTRAKTI LEKOVITOG BILJA

Ekstrakcija je tehnološka operacija kojom se iz droga biljnog i životinjskog porekla ekstrahuju, odnosno izdvajaju aktivni principi pomoću određenog rastvarača, ekstragensa. Operacija ekstrakcije ima veliki značaj u savremenoj tehnologiji i farmaciji, široko se primenjuje za proizvodnju galenskih preparata i hemijski čistih farmakološki aktivnih supstanci (Lepojević, 2000). Aktivni principi ekstrahuju se iz droga različitim metodama (maceracijom, perkolacijom i dr.) i pod različitim uslovima (usitnjenost droge, odnos droge i rastvarača, temperatura i pritiskak ekstrakcije, ekstragens(i) i dr.), što zavisi od vrste farmaceutskog oblika koji se želi dobiti, prirode lekovite supstance, stanja droge i drugih faktora (Vićentijević, 2001).

Ekstrakti su tečni, praškasti, odnosno granulisani preparati, dobijeni ekstrakcijom droge propisanim rastvaračem. Upotrebljeni rastvarač se posle ekstrakcije delimično, odnosno potpuno odstrani. Jugoslovenska farmakopeja (*Ph. Jug. IV*) propisuje tečne i suve ekstrakte. U zavisnosti od karaktera rastvarača koji je korišćen za dobijanje ekstrakta, razlikuju se: vodeni ekstrakti (*Extracta aquosa*), alkoholni ekstrakti (*Extracta spiritiosa*) i etarski ekstrakti (*Extracta etherea*). Tečni ekstrakti (*Extracta fluida*) su ekstrakti droga koji se najčešće izrađuju tako da jedan deo tečnog ekstrakta sadrži aktivne principe iz jednog dela droge, i naziva se tečni ekstrakt 1:1. Ponekad se tečni ekstrakti dobijaju i u drugim odnosima. Suvi ekstrakti (*Extracta sicca*) su ekstrakti droga iz kojih je pogodnim postupkom potpuno uklonjen rastvarač, sadrže više od 95% suvog ostatka. Za uparavanje, odnosno ugušćivanje tečnog ekstrakta i dobijanje suvih ekstrakata, najčešće se koristi, u laboratorijskim uslovima, rotacioni vakuum uparivač. Pomoću ovog uređaja ekstrakt se uparava pod sniženim pritiskom, a sam proces se može prekinuti kada se postigne željena gustina ekstrakta ili se uparavanje izvodi do potpunog uklanjanja rastvarača. Za sušenje ugušćenog ekstrakta najčešće se primenjuje vakuum sušnica i to na temperaturi 65-70°C. Sušenje se izvodi dok se masa suvog ekstrakta ne ustali, odnosno do konstantne mase (Lepojević, 2000). Suvi ekstrakti su izrazito higroskopni, pa se u procesu izrade preparata dodaju adsorbensi, najčešće Aerosil® i trikalcijum-fosfat, da bi se procenat vlage smanjio. Ovako adsorbovani suvi ekstrakti pokazuju stabilnost i u sredini sa 90% relativne vlažnosti vazduha. Oni se mogu rastvarati u vodi ili alkoholu i tako formirati tečne ekstrakte ili tinkture (Đorđević, 2008; *Ph. Eur. VI*).

Danas se teži da svi ekstrakti budu standardizovanog i kontrolisanog kvaliteta. Uz ujednačen kvalitet droge, opremu i ustaljen način izvođenja procesa ekstrakcije, trebalo bi dobijati i ekstrakte standardnog kvaliteta. Zbog neujednačenog kvaliteta droge i rastvarača, kvalitet ekstrakta je promenljiv. Zato je sada uobičajeno da se standardizacija ekstrakta vrši na osnovu količine određenog sastojka droge, odnosno nekog „marker“ jedinjenja koje je uvek prisutno u tkivu droge i posle u dobijenom ekstraktu (Kovačević, 2002).

Usitnjenost biljnog materijala

Kako se za ekstrakciju najčešće koriste droge, a ređe sveži biljni delovi, izdvajanje aktivnih materija iz droga uslovljeno je anatomskom građom samih droga. Za ekstrakciju kore, korena, plodova i semenki glavni uslov je odgovarajuća usitnjenost polaznog materijala. Usitnjavanjem se povećava specifična površina materijala, a time i mogućnost kontakta pojedinih čestica sa rastvaračem za ekstrakciju. U slučaju prevelike usitnjenosti ekstrakcija je otežana, jer se zasićenija ekstrakciona tečnost teško probija i kroz malo deblji sloj droge, pogotovo u prisustvu supstanci koje jako bubre. Osim toga, od jako usitnjene droge ekstrakt se teško odvaja, a jako usitnjena droga može naknadno adsorbovati već ekstrahovanu aktivnu materiju. Step en usitnjenosti biljnog materijala i čvrstih supstanci propisan je farmakopejama (*Ph. Jug. IV, Ph. Eur. 6*) i označen je arapskim brojevima u zagradi iza naziva droge ili preparata. Pri kontaktu rastvarača sa usitnjenim biljnim materijalom u oštećenim biljnim ćelijama dolazi do ispiranja, tj. rastvaranja njihovog sadržaja. U neoštećene ćelije rastvarač najpre mora da prodre. Bubrenjem membrana postaje manje čvrsta, pojavljuju se intermicelarni prostori i rastvarač ulazi u ćeliju. Zatim bubri protoplazma, a sadržaj ćelija se rastvara i ukoliko se nalazi u molekularnom rastvoru, izlazi difuzijom kroz intracelularne prostore u okolnu tečnost dok se ne uspostavi ravnoteža koncentracija unutar i izvan ćelija (Jovanović, 2003). Droga koja se ekstrahuje mora biti usitnjena do određenog stepena koji varira u relativno uskim granicama (1-5 mm). Najčešće se postavlja ograničenje da udeo sitnih čestica, čiji je prečnik manji od 0,5 mm, ne bude veći od 10% (Gorunović i Lukić, 1995).

Izbor rastvarača za ekstrakciju

Izbor ekstragensa se vrši tako da omogućava što kvantitativnije iscrpljenje droge, odnosno ostvarenje visokih prinosa ekstrakcije. Takođe, neophodno je voditi računa i o selektivnosti ekstrakcije, odnosno dobijanju ekstrakata sa minimalnim sadržajem primesa, a maksimalnim sadržajem željenih aktivnih principa. Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi od stepena hidrofilitnosti supstance koja se želi dobiti ekstrakcijom, pri čemu se može koristiti poznato pravilo, slično se rastvara u sličnom (Lepojević, 2000).

Za ekstrakciju lekovitog bilja koristi se čitav niz različitih organskih rastvarača, kao što su etiletar, metilenhlorid, hloroform, benzol i dr. Većina organskih rastvarača je toksična za humani organizam. Takođe, oni nisu selektivni, tako da rastvaraju i visoko molekulske

sastojke, kao što su smole, voskovi, masna ulja i boje. Ekstrakti dobijeni upotrebom ovih rastvarača najčešće predstavljaju prvu fazu u proizvodnji farmakološki aktivnih supstanci. Upotrebljeni organski rastvarači iz ovakvih sistema uklanjaju se uparavanjem pod sniženim pritiskom, ali u krajnjem proizvodu rastvarač uvek zaostaje u određenoj količini (Vidović, 2011).

Mešanjem alkohola i vode u različitim kvantitativnim odnosima dielektrična konstanta smeše se menja u širokim granicama, što omogućava primenu ovakvih smeša za ekstrakciju velikog broja supstanci iz biljnog materijala. Neophodno je istaći da rastvarač ne utiče samo na ekstrakciju neke određene grupe jedinjenja, već i ukupna količina ekstrahovanih materija zavisi od polarnosti rastvarača (Lepojević, 2000). Prednost ovog rastvarača, pored toga što se može koristiti za ekstrakciju čitavog niza različitih supstanci, je njegova netoksičnost u odnosu na ljudski organizam. Primenom smeše etanola i vode, kao relativno polarnog rastvarača, mogu se iz polaznog materijala ekstrahovati polarne komponente kao što su fenoli, flavonoidi, tanini, šećeri, glikozidi, soli, neki vitamini i druga jedinjenja. (Vidović, 2011). Kako izbor rastvarača za ekstrakciju u velikoj meri određuju komponente koje se žele izdvojiti, nije najjednostavnije odrediti koji je rastvarač najpogodniji (čak i procenat etanola u ekstragensu kod ekstrahovanja polarnih supstanci), pa se zato za određivanje najpogodnijeg rastvarača pri ekstrakciji lekovitog bilja sve više primenjuje optimizacija procesa ekstrakcije. Na taj način se sa sigurnošću može tvrditi da se primenjenim ekstragensom dobija ekstrakt najboljih osobina u odnosu na željene karakteristike (Xu i Diosady, 2010).

Ugljendioksid u superkričnom stanju je rastvarač pozitivnih karakteristika i on se primenjuje za dobijanje ekstrakta visoke čistoće koji se koriste u farmaceutskoj i/ili prehrambenoj industriji.

2.7.1. EKSTRAKCIJA I OPTIMIZACIJA

Većina aktivnih supstanci sadržanih u lekovitom bilju lako podleže hemijskim promenama, pod uticajem enzima ili drugih pratećih supstanci prisutnih u prirodnom materijalu, koje dovode do smanjenja ili gubitka lekovitih svojstava. Hemijske promene aktivnih sastojaka mogu nastati i u toku ekstrakcije, pod uticajem upotrebljenog rastvarača ili primenjenog tehnološkog režima (Pekić, 1980). Samim tim ekstrakcija zavisi od velikog broja procesnih parametara (veličine čestica, vremena, temperature, pritiska ekstrakcije, ekstragensa, itd.). Iz ovih razloga, u cilju dobijanja ekstrakta što boljeg kvaliteta, potrebno je operaciju ekstrakcije dobro proučiti i obezbediti odgovarajuće uslove. Danas je razvijen veliki broj matematičkih modela koji opisuju zavisnost procesa ekstrakcije od različitih parametara. U novije vreme razvojem računarskih programa empirijski modeli zasnovani na postupku odzivne površine dobijaju na značaju u opisivanju ne samo ekstrakcije, već i drugih difuzionih operacija.

Metoda odzivne površine

Klasičan pristup eksperimentalnom radu istraživanja uticaja pojedinačnih faktora na neku pojavu ili proces (*one at a time design*) uključuje dosta napora i vremena, a u slučajevima kada su interakcije faktora značajne nije u potpunost tačan (Romagnoli i Gualtieri, 2009; Ozdemir i sar., 2008). Najefikasniji put povećanju vrednosti istraživanja i skraćivanju vremena njegovog trajanja je planiranje eksperimenata (*DOE, Design of Experiments*). Za klasičan pristup eksperimentalnom radu potrebno je izvesti više hiljada eksperimenata, koje je teško analizirati, ali i izvesti, pa se u praksi broj eksperimenata redukuje smanjenjem broja ispitivanih faktora ili brojem njihovih ponavljanja, što za posledicu ima smanjenje pouzdanosti zaključaka izvedenih iz eksperimentalnih istraživanja (Lazić, 2004). Problem brojnosti eksperimenata i pouzdanosti zaključaka danas se rešava primenom planiranja eksperimenata.

Metoda odzivne površine (*RSM-response surface methodology*) spada u najčešće korišćene postupke statistički planiranih eksperimenata (Myers i Montgomery, 2002). Ovu metodu su uveli Box i Wilson (1951), a kasnije je popularizovao Montgomery, a može se definisati kao empirijska statistička tehnika primenjena za regresionu analizu podataka dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina (Allen, 2006; Myers i Montgomery, 2002). Svaka od jednačina naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina, koja se može prikazati u tri dimenzije ili kao konturne površine, u dve dimenzije (Brereton, 2007; Montgomery i Runger, 2003; Cox i Reid, 2000). Odzivne funkcije su polinomskog oblika s obzirom na to što se kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma. Ovakvi modeli su posebno pogodni za rešavanje optimizacionih problema, jer je njima moguće opisati interakcije velikog broja faktora, a procena kvaliteta fitovanja polinomskih modela se može lako odrediti (Lazić, 2004). Suština statističkog planiranja eksperimenata je u pronalaženju optimalnog rešenja (modela), čak i kad nije moguće utvrditi deterministički matematički model. Definisanje značajnosti pojedinih faktora moguće je uraditi pomoću Studentovog t-testa, odnosno t-vrednosti povezanih sa svakim od koeficijenata polinoma, koje ukazuju koji faktori su značajni, odnosno koje od interakcija su bitne za posmatrani odziv. U istraživanjima se najčešće koriste sledeći planovi: Box-Behnken dizajn (BBD), centralni kompozitni plan (CCD), potpuni eksperimentalni plan i dr. Metoda odzivne površine koristi se za opisivanje brojnih procesa (Cacae i Mazza, 2003; Shi i sar., 2003; Pathirana i Shahidi, 2005; Spingo i sar., 2007; Wang i sar., 2008; Pompeu i sar., 2009; Jokić, 2010; Wijangaard i Bruton, 2010).

2.7.2. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Superkritična ekstrakcija (*Supercritical fluid extraction, SFE*) predstavlja dobru alternativu klasičnim postupcima ekstrakcije. Ona predstavlja ekstrakciju gasovima pod

pritiskom i temperaturom iznad kritičnih vrednosti. Superkritični fluid nema definisano agregatno stanje, već se njegove fizičko-hemijske karakteristike nalaze između karakteristika gasa i tečnosti. Gustina superkritičnih fluida slična je gustini tečnosti, a viskozitet sličan viskozitetu gasa (Pasquli, 2008). Jedan od najčešće korišćenih gasova u procesu superkritične ekstrakcije je ugljendioksid. Iznad temperature od 31,06°C i pritiska od 7,38 MPa ugljendioksid prelazi u superkritično stanje. Iznad kritične tačke se malim promenama pritiska i/ili temperature menjaju i osobine superkritičnog gasa kao ekstragensa, čime je omogućena selektivna ekstrakcija. Povećanjem pritiska raste zapreminska masa i dielektrična konstanta, odnosno moć rastvaranja ekstragensa. Ugljendioksid u superkritičnom stanju ima osobine nepolarnog rastvarača, pa se njegovom primenom iz ispitivanog materijala mogu ekstrahovati nepolarne komponente: etarska ulja, masne kiseline, jedinjenja sterolne strukture, određeni vitamini, voskovi, itd.

Osnovna prednost superkritične ekstrakcije u odnosu na druge postupke ekstrakcije je ta što se izvodi na umerenim temperaturama, pa se može primeniti za separaciju slabo isparljivih i termolabilnih komponenata. Zbog toga je ovaj način ekstrakcije od posebnog interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju (Skala i sar., 2002).

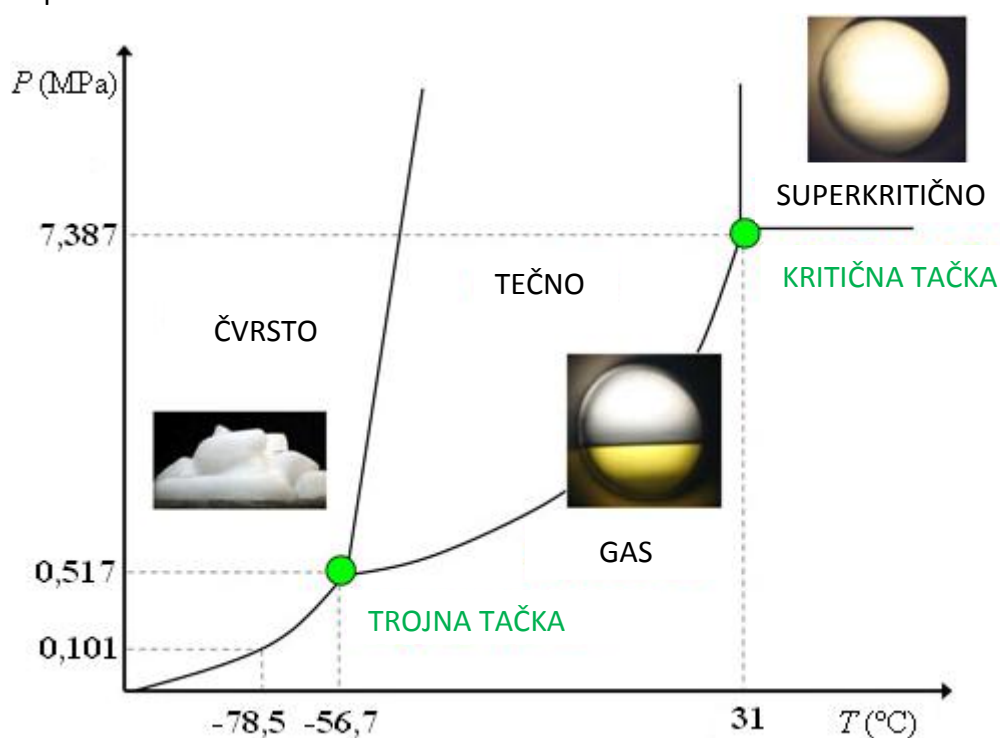
Ovaj način ekstrakcije, osim već navedenih, ima mnoge druge prednosti u odnosu na postupak ekstrakcije organskim rastvaračima:

- superkritični fluid ima slične osobine kao i organski rastvarači, ali s boljom difuzijom, nižim viskozitetom i manjim površinskim naponom fluida,
- razdvajanje ekstrakta od rastvarača je lako i brzo zbog mogućnosti regulisanja isparljivosti komponenata promenom pritiska i temperature,
- dodavanjem kosolventa, odnosno modifikatora (metanola, etanola, vode i dr.) moguće je poboljšati rastvaranje i ekstrakciju polarnih supstanci čime se postiže veća selektivnost prilikom ekstrakcije,
- nema zaostajanja rastvarača u dobijenom ekstraktu za razliku od upotrebe organskih rastvarača,
- rastvarači (gasovi i voda) korišćeni u superkritičnoj ekstrakciji su jeftini i sigurni za okolinu, troškovi odlaganja nisu visoki, a u industrijskim procesima moguće je i recikliranje rastvarača,
- moguće je ekstrahovanje komponenata sa visokim temperaturama ključanja na relativno niskim temperaturama,
- proces je ekološki prihvatljiv,
- za ekstrakciju superkritičnim fluidima se mogu primeniti postrojenja različitih kapaciteta, nivoa od analitičkih (manje od grama do nekoliko grama uzorka), preparativnih (nekoliko stotina grama uzorka), poluindustrijskih postrojenja (kilogram uzorka) do velikih industrijskih postrojenja (tone sirovine; npr. postrojenje za dekofeinizaciju kafe i čaja) (Lang i Wai, 2001; Luque de Castro i Jimenez-Carmona, 2002; King 2002; Wang i Weller, 2006; Norhuda i Jusoff, 2009; Sahena i sar., 2009).

Nedostaci ekstrakcije superkritičnim fluidima u poređenju sa drugim postupcima ekstrakcije ogledaju se u sledećem:

- rad pri relativno visokim pritiscima,
- veliki utošak energije za komprimovanje gasova,
- veći energetske troškovi usled složene regeneracije rastvarača,
- veliki investicioni troškovi za procesnu opremu,
- kompleksnost procesa.

Pogodnom kombinacijom pritiska i temperature može se podešavati željeni efekat rastvaranja, odnosno može se postići određena selektivnost ugljendioksida kao ekstragensa (Zeković, 1998). Područja pritiska i temperature u okviru kojih se mogu izolovati različiti ekstrakti prikazani su na slici 22.



Slika 22. Fazni dijagram (pritisak-temperatura) za CO₂

Prednosti ugljendioksida u odnosu na ostale gasove, koji se primenjuju za SFE, su sledeće:

- netoksičan je u odnosu na humani organizam i spada u GRAS ekstragense (Martenis, 2001),
- nezapaljiv,
- jeftin je i lako dostupan,
- bez mirisa i ukusa, što mu omogućava upotrebu u prehrambenoj industriji,
- omogućava frakcionisanje i selektivnu ekstrakciju,
- ne ekstrahuje pesticide, kao ni proizvode njihove degradacije,

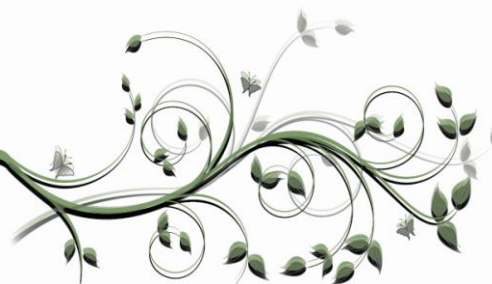
- ima relativno niske vrednosti kritičnih parametara u odnosu na ostale gasove koji se primenjuju u ovoj tehnologiji,
- lako se odvaja od ekstrakata,
- njegova upotreba spada u ekološki bezbedne tehnologije, tzv. “environmental friendly” (El-Aty i sar., 2009).

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju se izvodi pomoću uređaja koji je prikazan na slici 23. Ekstrakcija se vrši ugljendioksidom u ekstraktoru na određenoj temperaturi, određenom pritisku i pri određenom protoku ekstragensa, a dobijeni ekstrakt se od ugljendioksida odvaja u separatoru pri uslovima sniženog pritiska i temperature, odnosno pri uslovima pod kojim ugljendioksid prelazi u gasovito stanje. O ekstrakciji roda *Morus* superkritičnim ugljendioksidom nema podataka u naučnoj literaturi.



Slika 23. Slika ekstraktora i uređaja za ekstrakciju

3. EKSPERIMENTALNI DEO



Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Deo istraživanja je urađen u laboratorijama Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Biološkog instituta "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, Instituta za virologiju, vakcine i serume (Torlak) u Beogradu, Instituta za prehrambene tehnologije (FINS) u Novom Sadu, Poljoprivrednog instituta u Osijeku i Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, Hrvatska, Fakulteta za hemiju i hemijsku tehnologiju Univerziteta u Ljubljani, Slovenija, SP laboratoriji Novi Bečej i Fabrici za preradu voća, povrća, proizvodnju sokova, nektara i osvežavajućih bezalkoholnih pića "Nectar", Bačka Palanka.

3.1. MATERIJAL

3.1.1. SIROVINE

Biljni materijal je sakupljen na teritoriji Republike Srbije tokom 2010. godine. Materijal je pregledan i kolektovan u kolekciji primeraka jemstva (eng. *Voucher collection*) Herbarijuma BUNS. Determinaciju je izvršio dr Goran Anačkov, docent na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Republika Srbija. U tabeli 7 prikazani su osnovni podaci o brojevima vaučera, lokalitetu i datumu sakupljanja biljnog materijala.

Tabela 7. Podaci iz vaučera ispitanih vrsta roda *Morus*

Broj vaučera	Vrsta	Lokalitet	Način uzgajanja	Datum determinacije
2-1794	<i>Morus alba</i> L. 1753 <i>Moraceae</i>	Kač UTM 34T DR 2 11	subspontano	Jun 2010.
2-1795	<i>Morus nigra</i> L. 1753 <i>Moraceae</i>	Novi Sad, Rimski šančevi UTM 34T DR 2 01	subspontano	Jun 2010.

Sakupljeni plod ispitivanih vrsta dudu je nakon branja odložen u plastične vreće i čuvan u zamrzivaču. List i koren dudu je osušen prirodnim putem (u hladu, na promaji) i nakon toga čuvan u papirnim vrećama, nepropustljivim za vlagu, na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svetlosti.

3.1.2. KARAKTERIZACIJA PLODA *Morus* VRSTE

Određivanje sadržaja suve materije

Suva materija predstavlja sadržaj svih komponenata ispitivanog uzorka bez vode. Sastoji se od rastvorljivih (šećeri, kiseline i druge rastvorljive materije) i nerastvorljivih materija (skrob, celuloza, hemiceluloza, protopektin i dr.). Određivanje suve materije je jedna od najvažnijih i najviše korišćenih hemijskih metoda u ispitivanju kvaliteta sirovina, pomoćnih sirovina, poluproizvoda i proizvoda od voća ili povrća. Kod svih vrsta voća, sadržaj suve materije je primarna karakteristika. Može se odrediti:

- sušenjem i
- refraktometrijski.

Određivanje sadržaja suve materije sušenjem (suvi ostatak) podrazumeva određivanje ukupne suve materije koja se nalazi u ispitivanom materijalu. Suvi ostatak u plodu ispitivanih vrsta *Morus* određena je po standardnoj metodi (AOAC, 1984).

Refraktometrijski određen sadržaj suve materije predstavlja u vodi rastvorljive supstance. Suva materija refraktometrijski u plodu ispitivanih vrsta *Morus* određena je na digitalnom refraktometru (ATR-ST, Schmidt-Haensch, Germany) primenom standardne metode (AOAC, 1984).

Određivanje kiselosti

Za kvalitet plodova od velikog značaja je i sadržaj organskih kiselina (limunska, askorbinska, jabučna, vinska, oksalna, sirćetna i dr.). Organske kiseline utiču na ukus, boju, stabilnost i održivost kvaliteta. Odnos šećera i kiselina je veoma bitan i koristi se za određivanje stepena zrelosti voća (Vračar, 2001). Kiselost ispitivanog dudu određena je standardnom titracionom metodom (AOAC, 1984) i izražena je u odnosu na limunsku kiselinu.

Određivanje pH vrednosti

Za kvalitet voća i mikrobiološku održivosti bitna karakteristika je pH vrednost, tj. aktuelni aciditet (Vračar, 2001). pH vrednost ispitivanih vrsta dudu je određena standardnom metodom (AOAC, 1984) korišćenjem digitalnog pH-metra (Crison, Basic 20+, Espanola).

Određivanje sadržaja redukujućih šećera

Posle vode, ugljeni hidrati su najzastupljeniji sastojci namirnica biljnog porekla. Sačinjavaju oko 80-90% suvih materija voća i predstavljaju važan izvor i rezervnu hranu

organizma (Vračar, 2001). Sadržaj redukujućih šećera u ispitivanim uzorcima duda određeni su volumetrijskom metodom po Luff-Schoorl-u (AOAC, 1984).

3.1.3. OSNOVNA HEMIJSKA ISPITIVANJA DROGE *Morus* VRSTE

Osnovnim hemijskim (gravimetrijskim) ispitivanjima droga dobijaju se podaci o parametrima koji definišu opšti kvalitet droga.

U osnovna hemijska ispitivanja ubrajaju se:

- određivanje gubitka sušenjem (vlage),
- određivanje ostatka posle žarenja (pepela) i
- određivanje u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO_2).

Određivanje gubitka sušenjem (vlage)

Sušenje biljnog materijala predstavlja najbolji način njegovog čuvanja, jer se sprečava razvoj mikroorganizama i zaustavljaju enzimski procesi. Sadržaj vlage u listu i korenu ispitivanih vrsta *Morus*, osušenih prirodnim putem, određen je gravimetrijskim postupkom prema *Ph. Jug. IV*.

Određivanje ostatka posle žarenja (pepela)

Količina neisparljivih mineralnih materija, koja se dobija posle potpunog sagorevanja droge, predstavlja ostatak posle žarenja (pepeo). Sadržaj pepela u listu i korenu određen je gravimetrijskim postupkom koji propisuje *Ph. Jug. IV*.

Određivanje u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO_2)

U kiselini nerastvorljivi pepeo (SiO_2), predstavlja deo pepela koji se ne rastvara u razblaženoj HCl. Sadržaj SiO_2 u listu i korenu ispitivanih vrsta *Morus*, određen je gravimetrijskim postupkom prema *Ph. Jug. IV*, neposredno posle određivanja sadržaja pepela.

3.1.4. PRIPREMA MATERIJALA ZA EKSTRAKCIJU

Pre procesa ekstrakcije uzorci ploda su usitnjeni u blenderu. Uzorci listova i korena duda su samleveni u mlinu i određen im je srednji prečnik čestica. Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala određen je pomoću seta sita (Erweka, Nemačka) i jednačine:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right)$$

gde su: d - srednji prečnik čestica, m_i - maseni procenat i -te frakcije (%) i d_i - srednji prečnik i -te frakcije.

3.1.5. HEMIKALIJE I REAGENSI

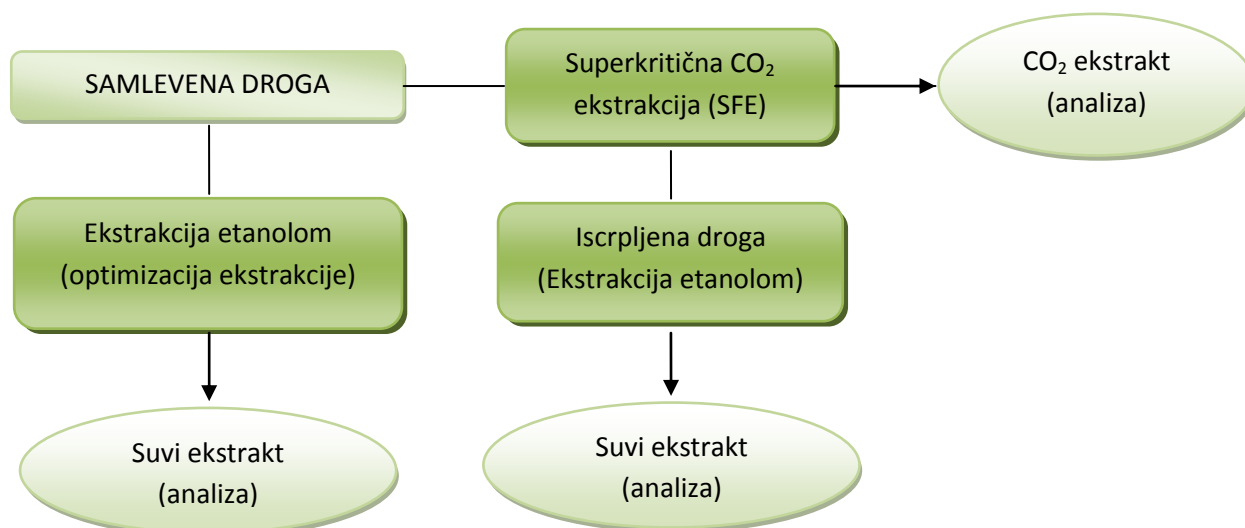
Linolna kiselina (99%), β -karoten (95%), Tween 40, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), trihlorsirćetna kiselina (TCA), Folin-Ciocalteu reagens, butilovani hidroksitoluen (BHT), askorbinska kiselina, etilendiamintetraacetat dihidrat (EDTA), ferosulfat heptahidrat, ferihlorid, galna kiselina, protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina, sinapinska kiselina, siringinska kiselina, ferulna kiselina, rutin, 1-heksanal, metil metan sulfonat i 3-[4,5-dimetilhumtiazol-2-ol]-2,5-dihemultetrazolijum-bromid (MTT) su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Nemačka). Dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoniloksid (DMSO) i etanol HPLC čistoće proizvedeni su u J. T. Baker (Deventer, Holandija), dok su metanol HPLC čistoće, mravlja kiselina za HPLC, kao i kvercetin proizvedeni u kompaniji Merck (Darmstadt, Nemačka). Grain FAME Mix proizvod je kompanije Supelco (Bellefonte, SAD). Propanal, 1-heptanal pentanal i 1-oktanal nabavljeni su od dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Nemačka). Ultračista voda je dobijena u laboratoriji, korišćenjem sistema Millipore, Elix UV i Simplicity Water Purification System-a (Molsheim, Francuska). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su bili stepena analitičke čistoće.

3.2. METODE

3.2.1. DOBIJANJE EKSTRAKATA

Ekstrakcija ploda, lista i korena dve pomenute vrste duda podrazumevala je optimizaciju procesa ekstrakcije etanolom, dobijanje etanolnih ekstrakata pri optimalnim uslovima ekstrakcije i superkritičnu ekstrakciju lista duda. Dobijanje ekstrakata duda šematski je prikazano na slici 24 i obuhvatalo je sledeće faze:

1. Optimizacija procesa ekstrakcije lista i ploda duda i dobijanje optimalnih parametara ekstrakcije etanolom,
2. Dobijanje etanolnih ekstrakata duda (ploda, lista i korena) na optimalnim uslovima ekstrakcije,
3. Superkritična CO₂ ekstrakcija lista duda i
4. Dobijanje etanolnih ekstrakata iscrpljene droge lista (droga zaostala nakon superkritične CO₂ ekstrakcije).



Slika 24. Šematski prikaz dobijanja ekstrakata lista duda

Ovako dobijeni ekstrakti su dalje analizirani radi utvrđivanja sastava, aktivnosti, delovanja i moguće upotrebe.

3.2.1.1. EKSTRAKCIJA ETANOLOM

Samleveni uzorci lista duda ekstrahovani su etanolom kao ekstragensom. U cilju određivanja optimalnih parametara ekstrakcije etanolom primenjen je Model odzivne površine (RSM). Određivanjem optimalnih parametara ekstrakcije određene su vrednosti koncentracije etanola, temperature i odnosa droga:rastvarač koje su korišćene za dobijanje ekstrakata koji su dalje ispitivani.

Metod odzivne površine

RSM je skup statističkih i matematičkih metoda pogodnih za razvoj, poboljšanje i optimizaciju procesa u kojima karakteristika od važnosti (npr. prinos ekstrakcije) zavisi od nekoliko promenljivih, a krajnji cilj je optimizacija te karakteristike. Ova metoda ima važnu primenu u izradi modela, razvoju i formulisanju novih proizvoda, kao i u unapređenju postojećih proizvodnih modela. Takođe, na ovaj način se jasno definiše uticaj nezavisnih promenljivih na proces, samih ili u kombinaciji.

Optimizaciju pomoću RSM moguće je podeliti u tri faze:

1. *Određivanje nezavisnih parametara i njihovih nivoa.* Kako je nemoguće odrediti uticaj svih parametara, potrebno je izabrati parametre sa najvećim uticajem. Za odabrane parametre vrlo je važno odrediti nivoe ispitivanja jer je uspeh optimizacije procesa direktno povezan sa njima. Pogrešno odabrani nivoi dovode do neuspešne optimizacije. Kako bi se

izvršilo modelovanje procesa realne vrednosti ispitivanih parametara se prevode u kodirane vrednosti koje se dalje koriste u modelovanju.

Opšta jednačina koja se koristi za kodiranje realnih vrednosti parametara ima oblik:

$$X = \frac{x - [x_{max} + x_{min}]/2}{[x_{max} - x_{min}]/2}$$

gde je:

x – prava vrednost promenljive,

X – kodirana vrednost promenljive,

x_{max} – maksimalna vrednost prave vrednosti promenljive i

x_{min} – minimalna vrednost prave vrednosti promenljive.

2. *Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog modela, predviđanje i provera jednačine modela.* Kompjuterski programski paketi nude optimalni model zasnovan na posebnom kriterijumu i podacima koje unosi korisnik. Ovi modeli se razlikuju jedan od drugog po izboru eksperimentalnih tačaka i broju ponavljanja. Nakon izbora modela, određuje se jednačina modela i regresioni koeficijenti (Bas i sar., 2007). Za optimizaciju eksperimentalnih rezultata u metodi odzivne površine najčešće se koristi model Box-Behnken sa tri promenljive, koji predstavlja kvadratnu jednačinu ili njen skraćeni oblik:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_{ii}^2 + \sum b_{ij} X_i X_j$$

gde su:

Y – odzivna funkcija,

b_0 – odsečak,

b_i – linearni koeficijent,

b_{ii} – kvadratni koeficijent,

b_{ij} – koeficijent interakcije,

X_i, X_j – kodirane vrednosti nezavisno promenljivih (Wang i sar., 2008).

Nakon određivanja koeficijenata, proračun odziva se izračunava pomoću jednačine modela. Pogodnost modela, odnosno provera da li model odgovara eksperimentalnim uslovima, obično se tumači na osnovu koeficijenata determinacije (R^2), kao mere odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata.

3. *Grafičko prikazivanje jednačine modela i određivanje optimalnih radnih uslova.* Jednačina modela grafički može biti prikazana na dva načina, u dve ili tri dimenzije. Trodimenzionalni dijagram se naziva odzivna površina i on pokazuje povezanost odziva i nezavisno promenljivih. Dvodimenzionalni dijagram, u obliku kontura, daje dobru sliku oblika odzivne površine. Kada ovaj dijagram pokaže elipsu ili krug, centar sistema daje maksimum ili minimum odziva. Ukoliko dijagram pokaže hiperbolu ili parabolu, fiksna tačka se naziva prevojna tačka i ona nije ni minimum ni maksimum.

Fiksna tačka (minimalna ili maksimalna) je tačka u kojoj je prvi izvod date funkcije jednak nuli:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = b_1 + 2b_{11}x_1 + b_{12}x_2 + b_{13}x_3 = 0$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_2} = b_2 + 2b_{22}x_2 + b_{12}x_1 + b_{23}x_3 = 0$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_3} = b_3 + 2b_{33}x_3 + b_{13}x_1 + b_{23}x_2 = 0$$

Izračunate vrednosti X_1 , X_2 i X_3 označavaju kodirane vrednosti nezavisnih promenljivih koje daju najveći ili najmanji odziv (Bas i sar., 2007).

Sve vrednosti nezavisno promenljivih u ovom radu ispitivane su na 3 nivoa (-1, 0, 1), a njihove kodirane i nekodirane vrednosti date su u tabeli 8.

Tabela 8. Kodirane i nekodirane vrednosti nivoa nezavisno promenljivih

Nezavisne promenljive	Simbol	Nivoi		
		(-1)	(0)	(+1)
Rastvarač (%)	X_1	40	60	80
Temperatura (°C)	X_2	40	60	80
Rastvarač:droga (ml/g)*	X_3	10	20	30
Vreme (min)**		20	40	60

*ekstrakcija lista
**ekstrakcija ploda

Ispitana su tri procesna parametra: rastvarač (koncentracija etanola), temperatura i odnos rastvarač:droga. Praćen je uticaj varirajućih parametara na prinos ekstrakcije, ukupni sadržaj fenola i flavonoida, i antioksidativnu aktivnost (DPPH test). U tabeli 9 prikazan je dizajn po kom su urađeni eksperimenti u cilju optimizacije ekstrakcije etanolom.

Tabela 9. Eksperimentalni dizajn optimizacije ekstrakcije etanolom

R. br.	LIST			PLOD		
	Koncentracija etanola (%)	Temperatura (°C)	Rastvarač:droga (ml/g)	Koncentracija etanola (%)	Temperatura (°C)	Vreme (min)
1	40	40	20	40	40	40
2	40	60	10	40	60	20
3	40	80	20	40	80	40
4	40	60	30	40	60	60
5	60	40	10	60	40	20
6	60	80	10	60	80	20
7	80	60	10	80	60	20
8	80	80	20	80	80	40
9	80	60	30	80	60	60
10	60	80	30	60	80	60
11	60	60	20	60	60	40
12	60	60	20	60	60	40
13	60	60	20	60	60	40
14	60	60	20	60	60	40
15	60	60	20	60	60	40
16	80	40	20	80	40	40
17	60	40	30	60	40	60

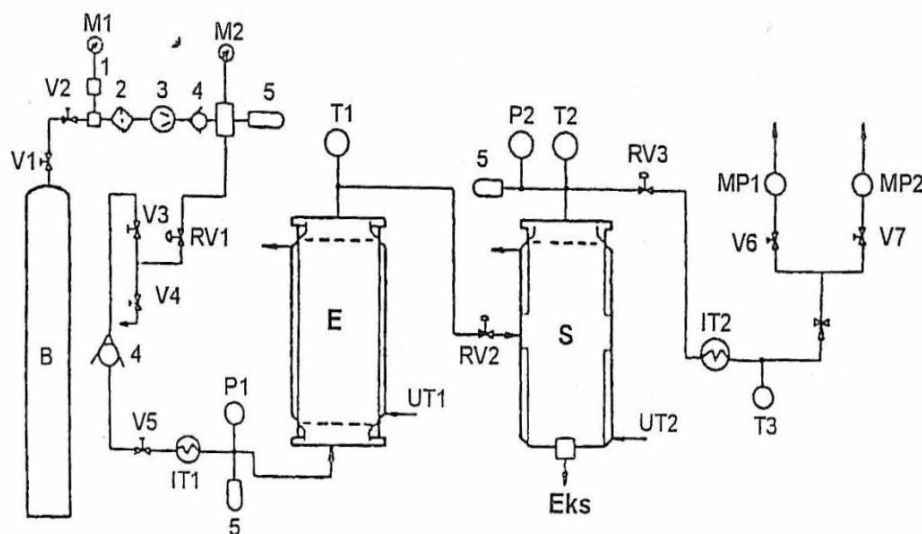
Statistička obrada eksperimentalnih podataka urađena je komercijalnim programom Design-Expert®, ver. 7 (Stat Ease, SAD). Analiza varijanse (ANOVA) je primenjena pri obradi podataka sa kriterijumom da je stepen pouzdanosti 95,0%.

Nakon dobijanja optimalnih parametara ekstrakcije etanolom uzorci su pripremani na sledeći način: 10 g uzorka ekstrahovano je sa odgovarajućom zapreminom ekstragensa na modelom propisanoj temperaturi, u vodenom kupatilu, u periodu od 90 minuta. Nakon filtracije, dodata je nova zapremina ekstragensa i postupak ponovljen dva puta, u cilju iscrpljenja droge. Nakon toga, filtrati su spojeni i određena je ukupna zapremina dobijenog tečnog ekstrakta koji je uparen na rotacionom vakuum uparivaču do suva. Dobijeni ekstrakti sušeni su na temperaturi od 60°C do konstantne mase. Isti postupak ekstrakcije je primenjen za sve delove, plod, list i koren obe ispitivane vrste *Morus*. Jedina razlika je ta što je rastvarač za ekstrakciju ploda sadržao 0,5% sirćetne kiseline. Tako dobijeni suvi ekstrakti ploda, lista i korena crnog i belog duda preneti su u staklene bočice, koje su zatvorene i čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C.

3.2.1.2. SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA

Ekstrakti lista crnog i belog duda dobijeni su superkričnom ekstrakcijom ugljendioksidom primenom uređaja čiji su osnovni delovi dati na slici 25 (Zeković, 1998). Masa uzorka u ekstraktoru za ispitivane vrste duda je iznosila 100,0 g. Ekstrakcija *M. alba* i *M. nigra folium* izvršena je na pritisku 100 bar i na temperaturi od 40°C, pri protoku

ugljendioksida od 0,194 kg/h. Vreme ekstrakcije iznosilo je 17 sati. Prinos ekstrakcije praćen je nakon 15, 30, 45, 60, 90, 120 minuta i na svaki sat do ukupnog vremena od 17 sati.



Slika 25. Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom

- 1 - merni konektor; 2 - filteri; 3 - kompresor sa dijafragmom; 4 - kontrolni ventil;
 5 - sigurnosni ventil; B - boca sa ugljendioksidom; V - ventil; M - manometer;
 RV - regulacioni ventil; IT - izmenjivač toplote; P - manometar; E - ekstraktor (V = 200 ml); T - termometar; UT - ultratermostat; S - separator (V = 200 ml); Eks - ekstrakt;
 MP - merač protoka

Iscrpljena droga zaostala nakon ekstrakcije superkričnim ugljendioksidom je ekstrahovana etanolom po predhodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.2.1.1.). Dobijeni suvi ekstrakti lista belog i crnog duda su preneti u staklene bočice, koje su zatvorene i do analize čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C.

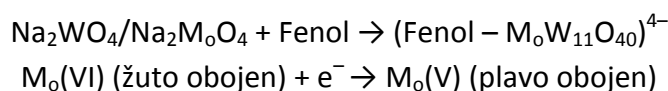
3.2.2. ISPITIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA EKSTRAKATA

3.2.2.1. Ukupan prinos ekstrakcije

Ukupan prinos ekstrakcije određen je primenom standardne metode po *Ph. Jug.* IV (1984). Nakon filtracije od dobijenog tečnog ekstrakta, otpipetira se 50 ml, prenosi u prethodno izmeren balon i uparava do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Upareni ekstrakt se suši u sušnici na temperaturi od 105°C u toku 3 sata i do konstantne mase. Za svaki uzorak postupak ekstrakcije je ponovljen tri puta. Prinos ekstrakcije dat je kao g suvog ekstrakta/100 g droge (% , m/m).

3.2.2.2. Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima duda određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singelton i Rosi, 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- $M_oW_{12}O_{40}$)⁴⁻:

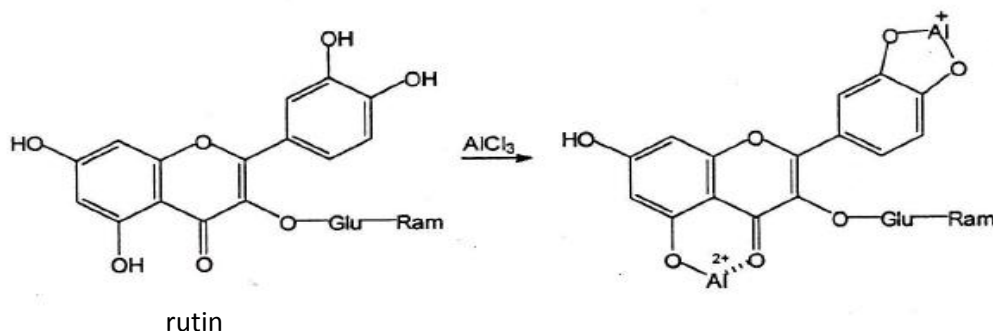


Reakcija na kojoj se zasniva merenje sadržaja ukupnih fenolnih komponenata nije specifična, jer na isti način sa Folin-Ciocalteu reagensom mogu da reaguju još neka jedinjenja. Da bi se odredio sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenata u nekom uzorku potrebna je primena kvalitativne i kvantitativne analitičke metode, odnosno HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*), koja je i najčešće korišćena metoda za određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih komponenata.

Suvi ekstrakt duda je rastvoren u destilovanoj vodi u različitim koncentracijama. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem ekstrakta duda (0,1 ml), 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml reagensa Folin-Ciocalteu i 1,5 ml 20% Na_2CO_3 . Kao slepa proba koristi se smeša u koju je umesto 0,1 ml uzorka dodato 0,1 ml destilovane vode. Nakon inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancu ispitivane smeše na talasnoj dužini od 750 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Ukupan sadržaj fenola u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta hlorogenske kiseline po g suvog ekstrakta \pm standardna devijacija (mg EHK/g \pm SD).

3.2.2.3. Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u suvim ekstraktima duda određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (1989). Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj osobini da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito važan je Al-kompleks (slika 26).



Slika 26. Struktura rutina i njegov kompleks sa aluminijumom

Suvi ekstrakt duda je rastvoren u destilovanoj vodi u različitim koncentracijama. Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 1 ml uzorka sa 4,0 ml destilovane vode i 0,3 ml 5% Na-nitrita. Kao slepa proba koristi se smeša u koju je umesto 1 ml uzorka dodato 1 ml destilovane vode. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 6 minuta. Nakon inkubacije u reakcionu smešu doda se 0,3 ml $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 5 minuta kasnije još 2 ml 1 M NaOH. Dobijena smeša se dopuni destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 ml. Apsorbanca uzorka se meri na talasnoj dužini od 510 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Ukupan sadržaj flavonoida u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta rutina po g suvog ekstrakta \pm standardna devijacija (mg RE/g \pm SD).

3.2.2.4. Sadržaj antocijana

Za određivanje sadržaja antocijana u ekstraktima ploda vrsta *Morus* primenjene su Singl pH i pH diferencijalna metoda. Kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva se na osobini antocijana da pri promeni pH sredine reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promena apsorpcionog spektra. Sadržaj ukupnih antocijana određuje se „singl“ metodom, jer je izmerena apsorbanca rastvora antocijana pri pH 1 proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana. Određivanje sadržaja monomera antocijana izvodi se pH diferencijalnom metodom, koja se zasniva na osobini monomera antocijana da su pri pH 1 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalskom obliku (bezbojni).

Suvi ekstrakt duda je rastvoren u destilovanoj vodi u različitim koncentracijama. Odmerena je zapremina od po 0,25 ml rastvora ekstrakta i preneti u dva odmerni suda od 10 ml, koji su zatim dopunjeni puferom pH 1, odnosno pH 4,5. Nakon 15 minuta izmerene su apsorbanca na 515 nm i 700 nm. Koncentracija ukupnih antocijana u prečišćenom ekstraktu (C_{uk}) izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{uk} = \frac{A_{uk} M F 1000}{\epsilon l}$$

gde su:

$$A_{uk} = (A_{515} - A_{700})_{pH 1}$$

M = 449,2 g/mol (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

F = 20 (faktor razblaženja ekstrakta)

$\epsilon = 26900 \frac{1}{\text{mol cm}}$ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida)

l = 1 cm (debljina kivete)

Koncentracija nedegradiranih - monomernih antocijana (C_{mon}) u ekstraktu izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{\text{mon}} = \frac{A_{\text{mon}} M F 1000}{\epsilon l}$$

gde je:

A_{mon} – apsorbanca razblaženog ekstrakta, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{\text{uk}} = (A_{515} - A_{700})_{\text{pH}_1} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH}_{4,5}}$$

Izračunate koncentracije C_{uk} i C_{mon} u ekstraktima izražene su kao mg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida po g suvog ekstrakta \pm SD (mg C3G/g).

3.2.2.5. HPLC analiza polifenolnih komponenti

Sadržaj polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima vrsta *Morus* određen je HPLC tehnikom, koja je jedna od najviše korišćenih metoda za analizu biljnih fenola. Fenolne materije se obično analiziraju korišćenjem različitih vrsta detektora kao što su: UV-VIS detektori sa fotodiodnim nizom (PDA), diodnim nizom (DAD), kao i UV fluorescentni detektori. Primena DAD detektora obezbeđuje skeniranje celog UV-VIS područja od 210-650 nm (Živković, 2009). Određivanje polifenolnih komponenata u suvim ekstraktima dudu urađeno je na aparatu HPLC Agilent 1200 serije (Agilent Technologies, SAD). Korišćena je kolona Agilent, Eclipse XDB-C18 (4,6 x 50 mm, 1,8 μ m). Detekcija razdvojenih pikova izvršena je primenom detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 280, 330 i 350 nm, a apsorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 210 do 400 nm, R 500/100 nm. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A – metanol i B – 1% mravlja kiselina (v/v). Razdvajanje komponenata je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-10 min, 10-25% A; 10-20 min, 25-60% A; 20-30 min, 60-70% A. Završetak analize, odnosno „stop time“ je podešen na 45 min, nakon čega je koloni ostavljeno vreme da se uravnoteži na početne uslove 10% A, tako što je „post time“ podešen na 10 min. Protok mobilne faze iznosio je 1 ml/min. Automatski je injektovano 5 μ l uzorka korišćenjem autosamplera. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30°C (Mišan i sar., 2011).

Za HPLC određivanja su korišćeni suvi ekstrakti dudu rastvoreni u mobilnoj fazi (A:B, 1:1, v/v) koji su pre injektovanja u aparat profiltrirani kroz filtere sa porama veličine 0,45 μ m (Reg Cellulose filters, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Nemačka). Polifenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. U tabeli 10 je prikazan spisak svih standarda i njihovih retencionih vremena korišćenih u analizi. Za potvrdu identifikacije komponente utvrđena je i čistoća pika. Kvantifikacija komponenata je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard pripremljen je metanolni rastvor standarda koncentracije 1,0 mg/ml. Od ovog rastvora pripremljena je serija razblaženih rastvora standarda koncentracija u opsegu 0,002-0,030 mg/ml. Na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda

konstruisan je dijagram zavisnosti za svaki standard. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti koncentracije i površine pika izračunate su koncentracije pojedinih polifenonih jedinjenja u ispitivanim uzorcima.

Tabela 10. Standardi i retenciona vremena standrda korišćenih u HPLC analizi

R. br.	Jedinjenje	t_R
1	Galna kiselina	1,073
2	Protokatehinska kiselina	2,111
3	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	3,679
4	Katehin	4,066
5	Kafena kiselina	5,101
6	Vanilinska kiselina	5,393
7	Hlorogenska kiselina	5,597
8	Siringična kiselina	6,976
9	Epikatehin	7,653
10	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	8,643
11	Ferulna kiselina	10,646
12	Sinapična kiselina	12,928
13	Rutin	14,914
14	Miricetin	15,769
15	Rozmarinska kiselina	16,178
16	Cimetna kiselina	16,958
17	Kvercetin	17,945
18	Naringenin	18,057
19	Luteolin	18,615
20	Kempferol	19,639
21	Apigenin	19,933

3.2.2.6. HPLC analiza saharida

Sadržaj saharida u ekstraktima ploda duda određen je na aparatu Perkin-Elmer HPLC sistem serije 200 sa integratorom, izokratskom pumpom, refraktivnim indeks detektorom (RI) i softverom TotalChrom Navigator. Za analizu je korišćena kolona MetaCharb Ca Plus (300 x 7,8 mm) koja je termostatirana na 90°C. Suvi ekstrakti ploda duda (0,1 g) rastvoreni su u dejonizovanoj vodi (10 ml) i pre injektovanja profiltrirani kroz filtere veličine pora 0,45 µm. 20 µl rastvora uzorka je injektovano i eluirano mobilnom fazom (dejonizovana voda) pri protoku od 0,5 ml/min. Kao interni standard korišćen je rastvor galaktoze koji je dodat u uzorak. Standardna smeša jedinjenja sadržala je saharozu, glukozu, galaktozu i fruktozu koncentracije 1 mg/ml. Pojedinačni i ukupni šećeri prisutni u ispitivanim uzorcima su identifikovani poređenjem retencionih vremena, a kvantifikovani pomoću površine pikova metodom internog standarda. Sva merenja ponovljena su tri puta.

3.2.2.7. Sadržaj mikro-, makro- i toksičnih elemenata primenom ICP-OES metode

Određivanje metala u hrani i biljnom materijalu se uglavnom sprovodi primenom atomske apsorpcione spektrometrije (AAC). Međutim, poslednjih godina sve veću primenu u ovoj oblasti zbog svoje visoke pouzdanosti i tačnosti nalaze nove metode zasnovane na X-zracima (*X-ray fluorescence methods*), kao i neutron aktivaciona analiza i indukovana kuplovana plazma (ICP) (Bhat, 2010). Za određivanje sastava elemenata u ekstraktima duda primenjena je metoda Indukovana kuplovana plazma optički emisije spektrometrije (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, ICP-OES), koja omogućava brzo i precizno analiziranje 75 elemenata prirodnog sistema.

Ekstrakti različitih delova belog i crnog duda su mikrotalasnom digestijom pripremljeni za određivanje mikro-, makro- i toksičnih elemenata. Za digestiju je korišćen sistem ETHOS 1 (Advanced Microwave Digestion System, Milestone, Italija) sa HPR-1000/10S visokopritisnim rotorom. Digestija je vršena u PTFE vijalama, zapremine 100 ml. Za ovu analizu, 1 g uzorka suvog ekstrakta je prenet u čistu vijalu uz dodatak 8 ml 65% HNO₃ i 1 ml 30% H₂O₂ tokom 40 minuta. Temperatura mikrotalasnog programa je prvih 20 minuta rasla do 200°C i nakon toga održavana na 200°C tokom 20 minuta. Nakon hlađenja i filtracije uzorak je kvantitativno prenet u normalni sud od 25 ml uz dodatak destilovane vode i injektovan u ICP-OES sistem.

Primenjeni sistem za analizu elemenata u ekstraktima duda je Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP sistem (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Velika Britanija) koji sadrži RACID86 Charge Injector Device (CID) detektor, koncentrični tip raspršivača, kvarcni injektor i cikličnu sprej komoru. Za analizu As i Hg korišćena je integrisana hibridna tehnika (HG-ICP-OES). Analiza ekstrakata izvršena je primenom operativnih uslova (tabela 11), talasnih dužina (tabela 12) i standardnog referentnog materijala lista paradajza NIST-SRM 1573a. Sva merenja su ponovljena tri puta.

Tabela 11. Operativni uslovi za ICP-OES

Parametar	Uslovi
Snaga radio frekvencije (RF)	1150 W
Plazma	Axial
Raspršivač	Standardni stakleni, koncentrični*
Sprej komora	Standardni stakleni ciklonski*
Keramički centar cevi	2 mm
Gas	Argon
Protok raspršivača (argon)	0,70 L/min**
Protok pomoćnog gasa (argon)	0,5 L/min
Protok rashladnog gasa (argon)	12 L/min
Vreme uzorkovanja	40 s
Pumpa	50 rpm
Vreme integracije	
(166 -230 nm)	15 s
(230-847 nm)	5 s
Softwer	iTEVA

* za HG-ICP-OES nisu korišćeni

** za HG-ICP-ES 0,40 L/min

Table 12. Emisione linije

Element	Atom/Jon	Talasna dužina (nm)
Al	I	394,401
As	I	193,759
B	I	208,893
Ca	II	315,887
Cd	II	214,438
Co	II	228,616
Cr	II	267,716
Cu	II	224,700
Fe	II	240,488
Hg	I	184,950
Li	I	670,784
Mg	I	285,213
Mn	II	257,610
Na	I	589,592
Ni	II	231,604
Pb	II	220,353
Se	I	196,090
Sr	II	421,552
Zn	I	213,856

3.2.2.8. Sadržaj masnih kiselina primenom GC/FID metode

Ekstrakt duda (200 mg) je rastvoren u 1 ml petroletra na ultrazvučnom kupatilu, tokom sat vremena. Nakon filtracije, postupak je ponovljen još dva puta i dobijeni filtrati su spojeni i preneti u balon od 250 ml. Rastvarač je uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču i tako dobijen uzorak je korišćen za analizu.

Esterifikacija masnih kiselina izvršena je tako što je 60 mg uzorka pomešano sa 4 ml izooktana i rastvaranje uzorka je izvršeno na povišenoj temperaturi uz primenu ultrazvučnog kupatila. U rastvor je dodato 200 μ l KOH (2,3 mol/l) i snažno je mućkano tokom 30 s. Nakon sušenja (NaHSO_4) i razdavavanja slojeva, 1 ml izooktanskog sloja je izdvojen za analizu.

Radi poređenja lipidnog profila ekstrakata lista i ploda duda isti postupak određivanja sadržaja masnih kiselina je primenjen i za analizu ekstrakta ploda. Ekstrakt ploda je dobijen tako što je 100 g homogenizovanog svežeg ploda pomešano sa 100 ml apsolutnog etanola (Elmaci i Altrug, 2003) i ekstrakcija je vršena mućkanjem u toku jednog sata. Ukupna masa je, zatim, prenetu u levak za odvajanje i dodat je dietiletar (150 ml). U toku 10 sati sadržaj levka je mućkan na svakih pola sata (uz otvaranje slavine), nakon čega je profilftiran, a dobijeni filtrat uparen do suva. Ovako pripremljeni suvi ekstrakt je korišćen za dalju analizu.

Sadržaj masnih kiselina u ekstraktima duda određen je metodom gasne hromatografije (*Gas Chromatography*, GC) sa plamenojonizacionim detektorom (*Flame Ionization Detector*, FID) na aparatu Agilent 6890 GC sistem. Korišćena je kolona HP-88 (100 m, 0,25 mm, 0,20 μ m I.D.). Temperaturni program hromatogramskog razdvajanja je podrazumevao početnu temperaturu od 120°C (1 minut), zatim povećanje na 175°C temperaturnim gradijentom 10°C/min (zadržavanje 10 minuta), a potom 5°C/min do temperature 210°C (zadržavanje 5 minuta) i na kraju finalno povećanje temperature do 230°C uz porast od 5°C/min sa zadržavanjem od 12 minuta. Temperatura injektora je 250°C, detektora 300°C, kao gas nosač korišćen je helijum na konstantnom pritisku 915.259,60 Pa. Ukupno vreme analize je 44,5 minuta. Na osnovu retencionog vremena dobijenih pikova u uzorku i standardnih supstanci metil estara masnih kiselina FAME standarda određeni su sadržaji pojedinačnih masnih kiselina (%) u ekstraktima duda.

3.2.2.9. Sadržaj ukupnih karotenoida

Sadržaj ukupnih karotenoida u superkričnim ekstraktima lista i ekstraktu ploda duda dobijenog dietiletrom određen je primenom spektrofotometrijske metode (Gao i sar., 2000). Ekstraktu duda je rastvorenom u *n*-heksanu (0,5 g ekstrakta/ml) dodat je 5% NaCl (0,5 ml), a zatim je rastvor mešan na vorteksu 30 sekundi i centrifugiran 10 minuta na 4.500 o/min. Nakon toga odvojenom supernatantu (0,1 ml) je dodat *n*-heksan (4,9 ml). Apsorbanca rastvora je merena na 460 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta.

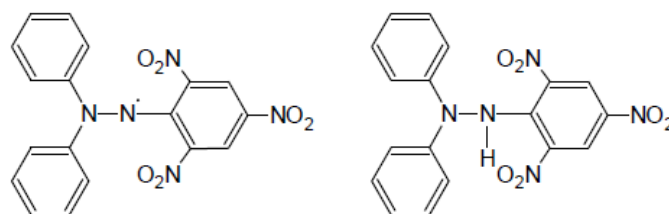
Ukupan sadržaj karotenoida u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta β -karotena po g suvog ekstrakta \pm standardna devijacija (mg β -karotena/g \pm SD).

3.2.3. ISPITIVANJE DELOVANJA EKSTRAKATA

3.2.3.1. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE

3.2.3.1.1. DPPH metod

Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH^{*} (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala urađeno je primenom spektrofotometrijske metode (Espin i sar., 2000) koja je zasnovana na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH^{*} radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH^{*} prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik (slika 27).



DPPH* radikal (ljubičast)

DPPH-H (žut)

Slika 27. Radikalska i redukovana forma DPPH

Za razliku od laboratorijski generisanih slobodnih radikala, kao što su superoksid i hidroksil radikal, upotreba ovog stabilnog radikala ima svoje prednosti jer na njega ne mogu uticati sporedne reakcije (heliranje od strane metala ili enzimska inhibicija). Antioksidativna aktivnost određena primenom ove metode izražava se preko RSC vrednosti (kapacitet "hvatanja" radikala, ili *Radical Scavenging Capacity*), koja se izračunava primenom jednačine:

$$RSC (\%) = 100 - \frac{A_{uz}}{A_{sp}} 100$$

gde su:

A_{uz} - apsorbancija uzorka,

A_{sp} - apsorbancija slepe probe.

Suvi ekstrakt duda, dobijen primenom etanola kao ekstragensa, rastvori se u vodi do koncentracije od 1 mg/ml i pomeša sa 95% metanolom i 90 μ M rastvorom DPPH^{*} radikala (u metanolu) do različitih finalnih koncentracija suvog ekstrakta (0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 i 0,2 mg/ml). Kao kontrola koristi se smeša u koju je umesto uzorka (suvog ekstrakta) dodata destilovana voda. Kao slepa proba koristi se 95% metanol. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi izmeri se apsorbancija reakcione smeše na talasnoj dužini od 515 nm. Na

osnovu izmerene apsorbance ispitivanog uzorka i apsorbance kontrole moguće je izračunati RSC (%) vrednost.

Za svaki uzorak i svaku koncentraciju postupak je ponovljen tri puta i dobijena je zavisnost između vrednosti RSC (%) i koncentracije rastvora ekstrakta. IC₅₀ vrednost (mg/ml), definisana kao koncentracija ekstrakta potrebna da reaguje sa 50% DPPH radikala (RCS=50%), pri prethodno definisanim eksperimentalnim uslovima, dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.2.3.1.2. Reducing power method

Reduktivna sposobnost ekstrakata duda i vitamina C, kao standardne antioksidativne komponente, određen je prema *Reducing power* metodi po Oyaizu (1986). Ova metoda se zasniva na praćenju redukcione sposobnosti ispitivanog uzorka za transformaciju Fe³⁺ → Fe²⁺. Kao mera reduktivne sposobnosti koristi se EC₅₀ vrednost koja predstavlja koncentraciju ispitivanog uzorka pri kojoj se postiže apsorbanca od 0,5 na talasnoj dužini od 700 nm. Redukciona sposobnost ispitivanog uzorka najčešće se poredi sa redukcijom sposobnošću poznate antioksidativne komponente.

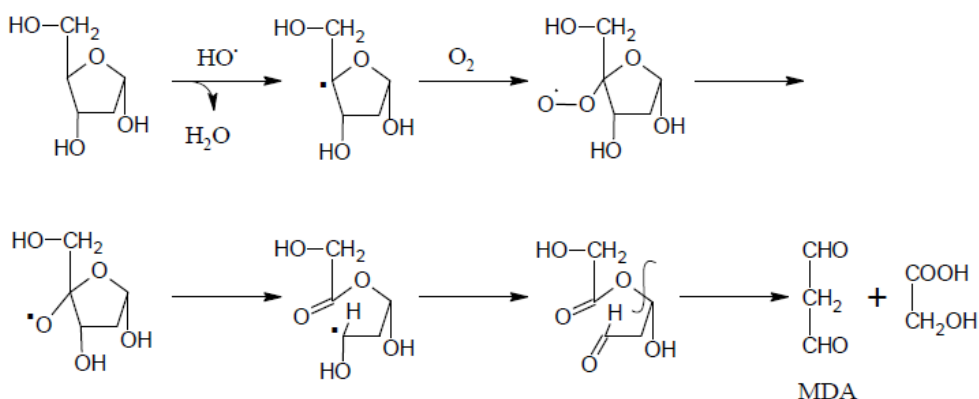
Rastvori ekstrakata duda različite koncentracije (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg/ml) i rastvor vitamina C u vodi različitih koncentracija (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 i 0,5 mg/ml) pomešani su sa fosfatnim puferom (2,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) i 2,5 ml 1% kalijumfericijanida [K₃Fe(CN)₆]. Dobijena smeša inkubirana je 20 minuta na temperaturi od 50°C. Nakon inkubacije, 2,5 ml 10% trihlorsirćetne kiseline dodato je smeši i ona je centrifugirana 10 minuta na 3.000 o/min. Dobijenom supernatantu (2,5 ml) dodata je bidestilovana voda (2,5 ml) i 0,1% FeCl₃ (0,5 ml). Apsorbanca uzorka izmerena je na talasnoj dužini od 700 nm. Za svaki uzorak i za svaku koncentraciju postupak je ponovljen tri puta. Reduktivna sposobnost ispitivanih ekstrakata izražena je preko EC₅₀ vrednosti.

3.2.3.1.3. Neutralizacija OH[•] radikala

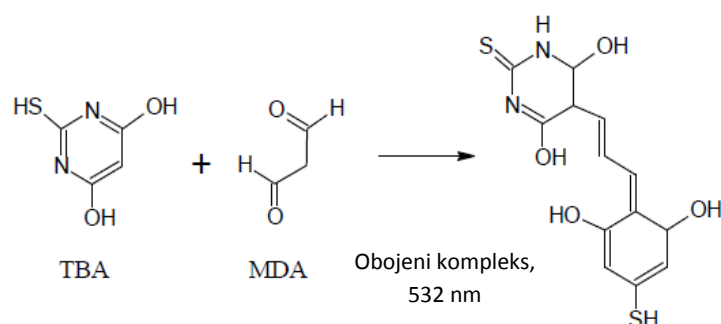
U cilju određivanja kapaciteta „hvatanja“ OH[•] radikala (sposobnosti neutralizacije), primenjena je modifikovana metoda Gutteridge-a (1987). Fentonovim reakcionim sistemom generisani su hidroksil radikali:



Nastali reaktivni OH^{*} u prisustvu 2-deoksiriboze i kiseonika grade malonildialdehid (slika 27), koji se zatim određuje TBA (tiobarbiturna kiselina) testom. TBA test zasnovan je na spektrofotometrijskom određivanju ružičasto obojenog kompleksa koji nastaje nakon reakcije malonildialdehida sa dva molekula TBA (slika 28).



Slika 27. Reakcija nastajanja malonilaldehida



Slika 28. Reakcija TBA i MDA

Od suvih ekstrakata je napravljena serija rastvora od šest razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 12,5-200 mg/ml. Standardni antioksidansi BHA i BHT korišćeni su u rasponu od sedam koncentracija (1,56-150,0 mg/ml). Sve probe i kontrole obavljene su u tri ponavljanja. U epruветama je pomešano 100 μl 0,05 mmol/l 2-deoksiriboze, 20-40 ml ekstrakti/standard, 100 μl 0,0147% H_2O_2 , 100 μl 10 mmol/l FeSO_4 i 2,7 ml fosfatnog pufera pH 7,4. Kontrola je umesto ekstrakata sadržala istu zapreminu 80% metanola, dok je rastvor korekcije činila smeša 3 ml fosfatnog pufera i 20-40 ml ekstrakta/standarda. Korekcija kontrole je sadržala smešu 3 ml fosfatnog pufera i 20-40 ml 80% metanola. Ovako pripremljeni rastvori su inkubirani 60 min na 37°C. Nakon dodatka 200 μl 3,72% EDTA i 2 ml TBA reagensa, smeša je zagrevana 10 min na 100°C, a zatim ohlađena do sobne temperature. Svaka proba merena je spektrofotometrijski na 532 nm.

Iz razlike apsorbance radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbance (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta, kao i za kontrolu:

$$A = A_{\text{rp}} - A_{\text{kor}}$$

Sposobnost neutralizacije HO^\bullet radikala (RSC) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je A_{kon} apsorbance kontrolne probe (razlika između apsorbance kontrole i korekcije kontrole):

$$\text{RSC (\%)} = \left(1 - \frac{A}{A_{\text{kon}}}\right) 100$$

Na osnovu RSC vrednosti, računski su određene IC₅₀ vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) iz jednačine linearne regresije (funkcija RSC(%) u zavisnosti od koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost (n=3) IC₅₀ ± standardna devijacija (mg/ml).

3.2.3.1.4. Lipidni model sistem

Antioksidativna aktivnost ekstrakata različitih delova duda u lipidnom model sistemu određena je na osnovu oksidativne degradacije β-karotena u emulziji β-karoten-linolna kiselina (Moure i sar., 2000). Etanolni ekstrakti (poglavlje 3.2.1.1.) razblaženi su smešom etanol:voda (70:30, v/v) kako bi se dobile serije razblaženja ekstrakata, koncentracija 0,2-20,0 mg/ml. Za kontrolu korišćen je etanolni rastvor BHT, koji je pripremljen u seriji rastvora koncentracije 0,005-0,510 mg/ml. 2 mg β-karotena rastvoreno je u 10 ml hloroforma i 1 ml tog rastvora pomešan je sa 20 mg linolne kiseline i 200 mg Tween 40 u odmernom sudu od 50 ml. Hloroform je odstranjen u struji azota. Ostatak je dopunjen destilovanom vodom do crte. Slepa proba je sadržala 20 mg linolne kiseline i 200 mg Tween 40, u odmernom sudu od 50 ml koji je dopunjen destilovanom vodom. U 5 ml emulzije β-karotena i linolne kiseline dodato je 0,2 ml ispitivanog rastvora ekstrakta. Kontrola je sadržala 0,2 ml destilovane vode i 5 ml emulzije β-karotena i linolne kiseline. Apsorbanca je očitana odmah po dodatku ekstrakta u emulziju na 470 nm i to očitavanje je označeno kao t=0. Nakon toga, epruvete su smeštene u vodeno kupatilo na 50°C i apsorbanca je očitana ponovo nakon 120 min. Slepa proba je sadržala 0,2 ml destilovane vode i 5 ml emulzije linolne kiseline i β-karotena. Brzina degradacije β-karotena izračunata je na osnovu kinetike jednačine prvog reda po sledećoj formuli (Al-Saikhan i sar., 1995):

$$V = \ln \frac{a}{b} \frac{1}{t}$$

gde su:

V - brzina degradacije uzorka,

a - apsorbanca na 470 nm u t = 0 min,

b - apsorbanca na 470 nm u t = 120 min i

t - vreme (min).

Antioksidativna aktivnost u lipidnom model sistemu (AOA) je izračunata primenom jednačine:

$$AOA (\%) = 100 \frac{V_k - V_u}{V_k}$$

gde su:

V_k - brzina degradacije kontrole i

V_u - brzina degradacije uzorka.

Za svaki ispitani uzorak dobijena je zavisnost između dobijenih vrednosti AOA (%) i koncentracije rastvora ekstrakta. IC₅₀ vrednost (mg/ml) definisana je kao koncentracija

ekstrakta potrebna da ostvari inhibiciju degradacije β -karotena za 50% u odnosu na kontrolu, dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

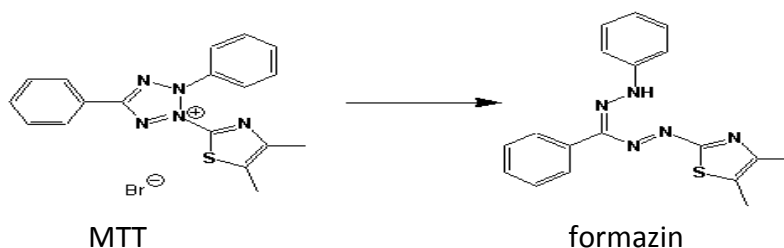
3.2.3.2. CITITOKSIČNO DELOVANJE

3.2.3.2.1. MTT test

Pri određivanju citotoksične aktivnosti ekstrakata duda korišćene su tumorske ćelije, gajene na podlogama:

1. Hep2 (podloga: MEM Eagle/5% FCS), humana ćelijska linija - *human larynx carcinoma*,
2. RD (podloga: MEM Eagle/10% FCS), humana ćelijska linija *rhabdomyosarcoma* i
3. L2OB (podloga: MEM Eagle/10% FCS), mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transefektovani neki humani geni.

MTT test citotoksičnosti u *in vitro* uslovima: Suspenzije ćelija gustine 10^4 zaseju se na mikrotitar ploče sa 96 otvora i ostave da se inkubiraju na 37°C i 5% CO_2 , u inkubatoru. Nakon 24 časa inkubacije medijum se zameni sa 100 μl medijuma koji sadrži različite koncentracije ispitivanih ekstrakata (25, 50, 100, 250, 500, 750 i 1.000 $\mu\text{g/ml}$). Kontrolnim ćelijama dodat je svež medijum bez ekstrakata. 48 sati nakon tretmana varijabilnost ćelija je određena MTT (3-[4,5-dimetilhumtiazol-2-ul]-2,5-dihemultetrazolijum-bromid, $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{SBr}$) testom citotoksičnosti (Mosmann, 1983). Test se zasniva na bojenoj reakciji mitohondrijskog enzima dehidrogenaze iz živih ćelija sa MTT (slika 29). Po završetku inkubacije ćelija sa etanolnim ekstraktima, dodat je MTT (u finalnoj koncentraciji od 5 mg/mL) i ploča je inkubirana 2-4 časa na 37°C . Obojeni kristali stvorenog formazina su rastvoreni sa 150 μl DMSO. Apsorbanca je merena na 570 nm na Mikroplate Reader-u. Procenat varijabilnosti određivan je kao odnos apsorbanci tretiranih ćelija i kontrolnih ćelija pomnožen sa 100. Citotoksična aktivnost je izražena kao IC_{50} vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta). Kao kontrola korišćene su (same) nestimulisane ćelije, ćelije u kulturi čiji je rast 100%. Prikazani rezultati su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta (tri ponavljanja).

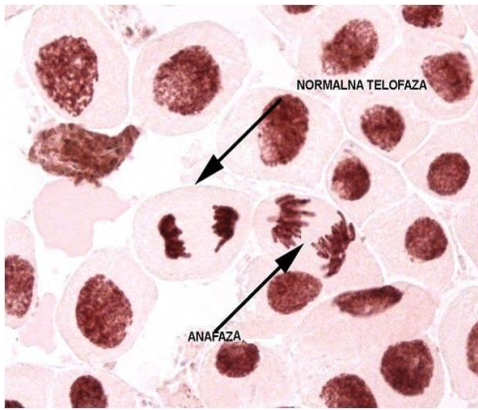


Slika 29. Redukcija MTT mitohondrijalnom reduktazom do formazina

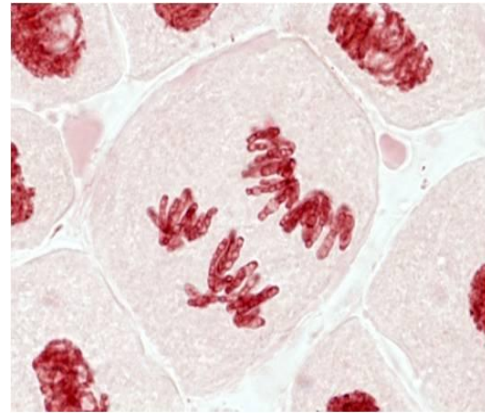
3.2.3.3. TOKSIČNO I GENOTOKSIČNO DELOVANJE

3.2.3.3.1. *Allium* anafazno-telofazni test

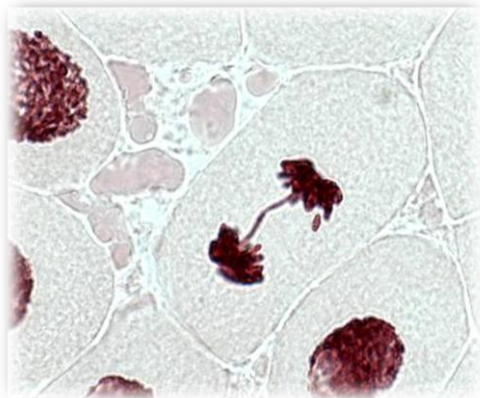
Analiza ekstrakata dudu izvršena je primenom Fiskesjo postupka modifikovanog od strane Ranka i Nielsena (1993), poznatog pod nazivom *Allium* anafazno-telofazni test opšte toksičnosti i genotoksičnosti. Kao mikroskopski parametar genotoksičnosti ekstrakata praćene su anafazne i telofazne promene hromozoma. Za pravljenje mikroskopskih preparata korišćeni su vršni meristemski delovi korena, koji su podvrgnuti hidrolizi sa 1M HCl na temperaturi od 60°C u trajanju od 12 minuta u vodenom kupatilu. Na ovaj način se vrši omekšavanje meristemske tkiva korena da bi se lakše odvojio od ostatka korena. Zatim se vrši bojenje 2% orceinom. Nakon toga se na predmetno staklo stavlja po 5 korenčića, skalpelom se odseca vršni deo korena i nanosi kap boje. Na kraju se preparat prekriva pokrovnim staklom i fiksira na plamenu, pa se zatim vrši skvošovanje. Cilj skvošovanja je da se spreči zaostajanje vazduha i da se materijal rasporedi u jednom sloju. Sa svakog mikroskopskog preparata pregledano je približno 100 ćelija u anafazi/telofazi, odnosno oko 500 ćelija po seriji (uzorku), i detektovane su i prebrojane promene u genetičkom materijalu. Kao test organizam korišćen je luk (*Allium cepa*), mase između 2-4 g koji je prethodno bio uskladišten u odgovarajućim uslovima. Prethodno odabrani luk pripremljen je za test tako što mu je uklonjen suvi spoljašnji omotač. Postavljene su serije od po 12 flakona u koje je sipano po 25 ml uzorka ekstrakata različitih koncentracija. Napravljena je serija dvostrukih razblaženja uzoraka. Za svaki uzorak i dve kontrole upotrebljeno je po dvanaest lukovica *Allium cepa*. Lukovice su stavljanje 24 časa u vodu standardnog kvaliteta da isključuju, a zatim u test uzorke u uslovima mraka na temperaturi od 25°C. Tretman je trajao 48 časova uz zamenu uzoraka svaka 24 časa. Kao pozitivna kontrola korišćen je metil metan sulfonat – MMS u koncentraciji od 10 µg/l. Negativna kontrola je bila voda standardnog kvaliteta. Kao kontrola rastvarača upotrebljen je 25% etanol. Tokom rada svi uzorci vode čuvani su u frižideru na 4°C. Radi utvrđivanja generalne toksičnosti u svakoj grupi merena je dužina korenčića kod 10 lukovica. Primenom One-Way ANOVA testa poređene su srednje vrednosti dužine rasta korena u analiziranim grupama. Analizirane su sledeće aberacije: mostovi, fragmenti, zaostali hromozomi, multipolarnost i c-mitoze (slika 30).



Normalne deobe



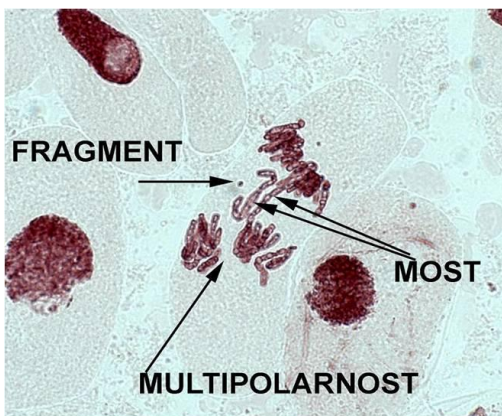
Multirolarno deobno vreteno



Anafazni most



Zaostali hromozom



Višestruke promene



Višestruki mostovi

Slika 30. Analizirane aberacije luka

4. REZULTATI I DISKUSIJA



Ispitivanja različitih delova dve vrste duda obuhvatala su određivanje osobina polaznog biljnog materijala, pripremu uzoraka za ekstrakciju, optimizaciju procesa ekstrakcije etanolom, ekstrakciju sa dva različita ekstragensa, ispitivanje hemijskog sastava dobijenih ekstrakata, kao i ispitivanje delovanja ekstrakata duda. Ispitivanje hemijskog sastava etanolnih ekstrakata ploda, lista i korena obuhvatao je određivanje ukupnog sadržaja fenola, flavonoida i antocijana, kvalitativni i kvantitativni sastav pojedinačnih polifenolnih komponenata, i prisustvo mikro-, makro- i toksičnih elemenata. U etanolnim ekstraktima ploda određen je i sadržaj šećera. Analiza hemijskog sastava superkričnih CO₂ ekstrakata lista obuhvatala je određivanje sadržaja masnih kiselina i karotenoida. Ispitivanje delovanja ekstrakata obuhvatalo je evaluaciju antioksidativne aktivnosti praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, redukcionog potencijala i inhibicije lipidne peroksidacije, kao i citotoksični potencijal određen praćenjem aktivnosti ekstrakata u *in vitro* uslovima. Takođe, ispitano je i toksično i genotoksično delovanje ekstrakata *Morus* vrsta.

4.1. ISPITIVANJE OSOBINA POLAZNOG MATERIJALA

Osnovne karakteristike ploda dve ispitivane vrste duda prikazane su u tabeli 13. Prosečna masa ploda za *M. alba* je 2,45 g, a za *M. nigra* 2,23 g, dok je sadržaj vlage određen u plodu *M. alba* 75,18%, a *M. nigra* nešto veći, 82,02%. Vrednosti sadržaja suve materije su 17,85% (*M. alba*) i 14,50% (*M. nigra*). Izmerena pH vrednost za ispitane vrste *M. alba* i *M. nigra* je 5,99, odnosno 5,52. Kiselost je 0,16% (*M. alba*) i 0,26% (*M. nigra*), što govori o zadovoljavajućoj zrelosti korišćenih plodova u ispitivanju. Redukujući šećeri za crni dud imaju vrednost 11,52%, a za beli dud 13,92%, što ukazuje na odgovarajuće karakteristike materijala koji je korišćen za dalja ispitivanja.

Tabela 13. Karakteristike ploda *Morus* vrste

Vrsta	Masa ploda (g)	Sadržaj vlage (% m/m)	pH vrednost	Suvi ostatak (% m/m)	Suva materija (% m/m)	Kiselost (%)	Redukujući šećeri (%)
<i>M. alba</i>	2,45±0,26	75,18±1,00	5,99±0,02	24,82±1,00	17,85±0,07	0,16	13,92
<i>M. nigra</i>	2,23±0,26	82,02±2,73	5,52±0,06	17,98±2,73	14,50±0,07	0,26	11,52

Osnovni parametri ispitivanja kvaliteta droge (list i koren) vrsta *Morus* dati su u tabeli 13. Za vrstu *M. alba* sadržaj vlage za list je 7,01% i za koren 7,96%, dok je sadržaj pepela 8,35% za list i 8,92% za koren. Vrednosti sadržaja vlage za *M. nigra* vrstu su veći i iznose 7,54% za list i 8,22% za koren, kao i vrednosti sadržaja pepela (9,70% za list i 9,90% za koren). Dobijene vrednosti sadržaja u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO_2) za list su 2,42% za *M. alba* i 2,51% za *M. nigra*. Vrednosti sadržaja SiO_2 u korenu ispitanih vrsta su neznatno veće i iznose 3,58% za *M. alba* i 3,17% za *M. nigra*.

Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala određen je analizom sejanja (tabela 14). Vrednosti srednjeg prečnika čestica su relativno ujednačene, za list obe vrste duda se kreće oko 0,3 mm, dok za koren vrednosti srednjeg prečnika čestica iznose oko 0,5 mm. Na osnovu dobijenih rezultata može se videti da je ispitana droga odgovarajućeg kvaliteta, vrednosti ispitivanih parametara i stepen uspitnjenosti se nalaze u granicama propisanim Farmakopejom (*Ph. Jug. V*).

Tabela 14. Osnovni parametri ispitivanja kvaliteta i srednji prečnik čestica belog i crnog duda

Vrsta		Sadržaj vlage (%, m/m)	Pepeo (%, m/m)	SiO_2 (%)	Srednji prečnik čestica (mm)
<i>M. alba</i>	List	7,01±0,74	8,35±0,01	2,42±0,04	0,3092±0,0198
	Koren	7,96±0,05	8,92±0,03	3,58±0,07	0,5043±0,0472
<i>M. nigra</i>	List	7,54±0,09	9,70±0,01	2,51±0,01	0,3070±0,3266
	Koren	8,22±0,41	9,90±0,02	3,17±0,06	0,5209±0,2452

4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija farmakološki aktivnih jedinjenja najčešće se vrši korišćenjem tri ekstrakciona postupka: ekstrakcija pogodnim rastvaračima, ekstrakcija na čvrstoj fazi (*solid-phase extraction*) i superkritična ekstrakcija. Prinos jedinjenja u ekstraktu, odnosno prinos ekstrakcije, kao i sam sastav ekstrakta, u velikoj meri zavisi od načina ekstrakcije, kao i tipa i polarnosti rastvarača (Moller i sar. 1999). Za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja koriste se rastvarači kao što su aceton, etanol, metanol i njihove kombinacije, najčešće u različitim odnosima sa vodom. U literaturi najčešće korišćeni rastvarači su etanol i metanol (Nuutila i sar., 2003; Mulianacci i sar., 2004; Wu i sar., 2005; Huang i sar., 2007; Ros i sar., 2009; Garcia-Salas i sar., 2010). Etanol kao ekstragens, prema literaturnim podacima, korišćen je u ekstrakciji različitih vrsta biljnog materijala, pri čemu su dobijeni ekstrakti imali povoljne karakteristike u pogledu sastava i sadržaja farmakološki značajnih jedinjenja (Turkoglu i sar., 2007; Turkoglu i sar., 2007). Prednost etanola u odnosu na druge ekstragense je njegova netoksičnost i moguća dalja primena ovako dobijenih ekstrakata u farmaciji i prehrambenoj industriji. Prinos ekstrakcije nekih komponenata kao što su antioksidansi, koji su uglavnom polarnog karaktera, povećava sa povećanjem polarnosti upotrebljenog ekstragensa. Povećanjem udela vode u ekstragensu povećava se i njegova polarnost, pa se različite

koncentracije etanola kao ekstragensa mogu smatrati pogodnim za ekstrakciju jedinjenja ovog tipa.

Radi utvrđivanja najpogodnijih uslova ekstrakcije izvršena je optimizacija procesa ekstrakcije primenom Metode odzivne površine (poglavlje 3.2.1.1.) i dizajna prikazanog u tabeli 9. Odzivi obuhvaćeni optimizacijom su ukupan sadržaj fenola, ukupan sadržaj flavonoida i antioksidativna aktivnost, izražena preko IC_{50} vrednosti (DPPH metod). Kako je praktično nemoguće odrediti i kontrolisati sve uslove ekstrakcije, bilo je neophodno odabrati one koji imaju najveći uticaj na proces ekstrakcije. Parametri odnosno uslovi ekstrakcije koji su bili menjani pri ekstrakciji prikazani su u tabeli 8 i za list duda su: koncentracija etanola, temperatura i odnos rastvarač:droga, a za ekstrakciju ploda duda: koncentracija etanola, temperatura i vreme.

M. alba folium

Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije etanola, temperature i odnosa rastvarač:droga na ekstrakciju lista belog duda dati su u tabeli 15. Prinos ekstrakcije je od 10,234 do 20,072%, sadržaj fenola u listu *M. alba* je od 9,49 do 23,07 mg EHK/g droge, dok je sadržaj ukupnih flavonoida od 4,64 do 6,40 mg ER/g droge. Antioksidativna aktivnost ekstrakta lista *M. alba* izražena preko IC_{50} vrednosti je u intervalu od 0,0706 do 0,1570 mg/ml.

Tabela 15. Prave i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih (X_1 , X_2 i X_3) i eksperimentalni rezultati prinosa ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola (UF), sadržaj ukupnih flavonoida (UfI) i antioksidativne aktivnosti (IC_{50})

Redni broj	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Rastvarač:droga (ml/g)	Prinos ekstrakcije (% g/100 g)	UF (mg EHK/g droge)*	UfI (mg ER/g droge)**	IC_{50} (mg/ml)
1	40 (-1)	40 (-1)	20 (0)	14,996	12,84	4,64	0,1380
2	40 (-1)	60 (0)	10 (-1)	18,918	9,92	5,69	0,1350
3	40 (-1)	80 (1)	20 (0)	20,072	15,12	5,74	0,1100
4	40 (-1)	60 (0)	30 (1)	17,958	18,47	5,28	0,0823
5	60 (0)	40 (-1)	10 (-1)	10,234	9,49	4,64	0,1570
6	60 (0)	80 (1)	10 (-1)	17,302	13,69	6,03	0,0753
7	80 (1)	60 (0)	10 (-1)	11,448	13,65	5,12	0,0741
8	80 (1)	80 (1)	20 (0)	12,448	20,66	5,49	0,0710
9	80 (1)	60 (0)	30 (1)	11,628	22,58	4,46	0,0740
10	60 (0)	80 (1)	30 (1)	16,926	23,07	4,58	0,0706
11	60 (0)	60 (0)	20 (0)	15,688	19,36	6,06	0,0759
12	60 (0)	60 (0)	20 (0)	15,500	19,98	6,02	0,0758
13	60 (0)	60 (0)	20 (0)	17,264	19,04	6,40	0,0821
14	60 (0)	60 (0)	20 (0)	15,688	19,86	6,01	0,0762
15	60 (0)	60 (0)	20 (0)	17,264	19,08	6,00	0,0809

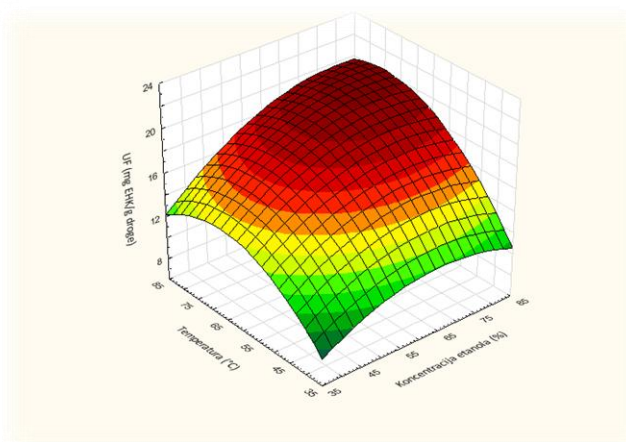
16	80 (1)	40 (-1)	20 (0)	16,029	14,90	5,34	0,1197
17	60 (0)	40 (-1)	30 (1)	15,879	14,87	5,29	0,0874

*mg EHK/g - mg ekvivalenta hlorogenske kiseline po g droge

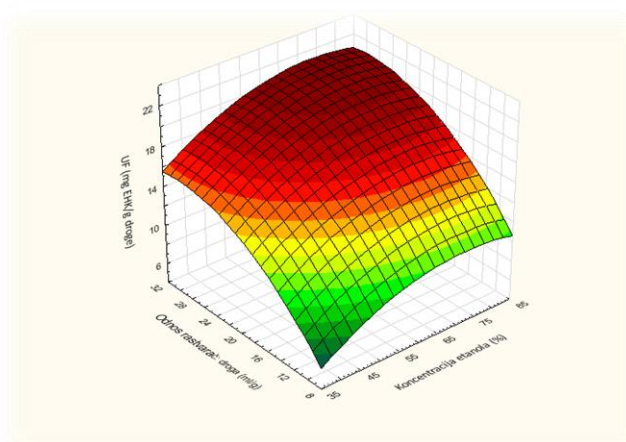
** mg ER/g - mg ekvivalenta rutina po g droge

Slika 31 grafički prikazuje uticaj uslova ekstrakcije na mereni odziv ukupnog sadržaja fenola. Na slici se jasno uočava porast ukupnog prinosa fenola sa povećanjem koncentracije etanola u ekstragensu. Osim toga, ukupan prinos fenola se povećava i sa povećanjem temperature ekstrakcije sve do 65°C, gde dalje povećanje ne utiče značajno na ukupan sadržaj fenola u ekstraktu. Na istoj slici se uočava i da se ukupan prinos fenola povećava u celom merenom opsegu odnosa rastvarač:droga od 10 do 30 ml/g, što je u skladu sa teorijskim principima.

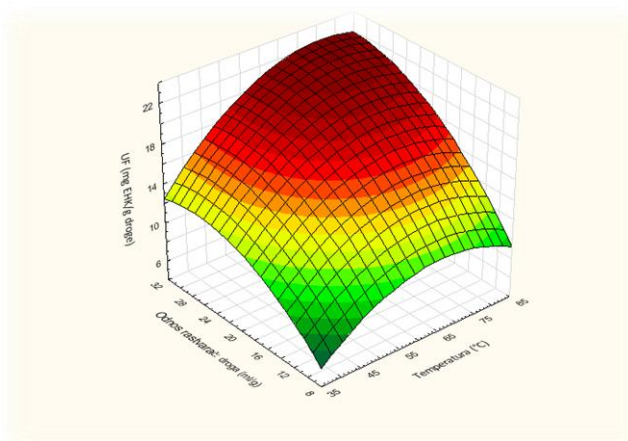
a)



b)



c)

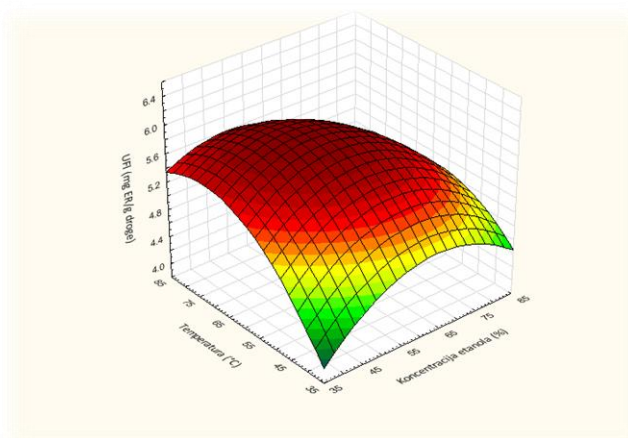


Slika 31. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih fenola

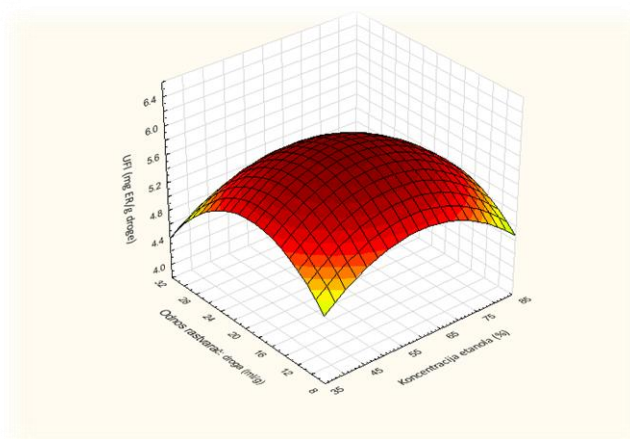
a) temperatura i koncentracija etanola (odnos rastvarač:droga 20 ml/g), b) odnos rastvarač:droga i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) odnos rastvarač:droga i temperatura (koncentracija etanola 60%)

Zavisnost ukupanog prinosa flavonoida u ekstraktima lista *M. alba* u odnosu na odabrane uslove ekstrakcije prikazana je na slici 32. Uočava se povećanje prinosa flavonoida u ekstraktima sa povećanjem koncentracije etanola od 55 do 65%. Takođe, prinos flavonoida se povećava i povećanjem temperature do 70°C i odnosa rastvarač:droga sve do odnosa 18 ml/g.

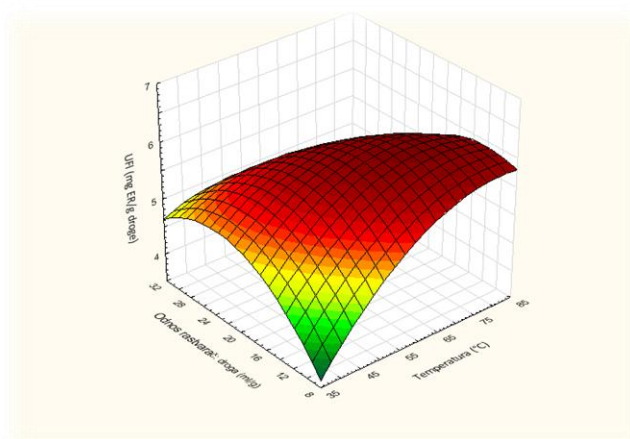
a)



b)



c)

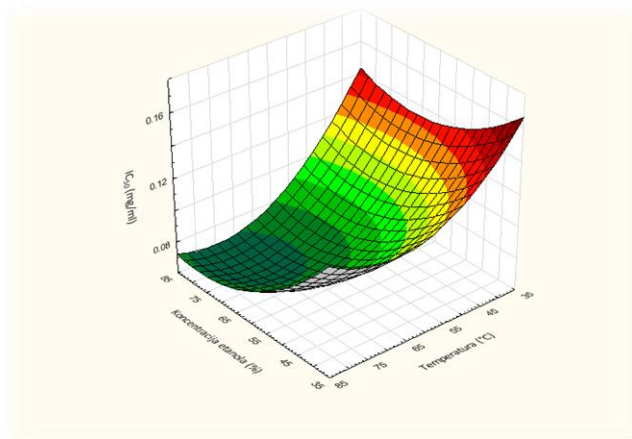


Slika 32. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih flavonoida

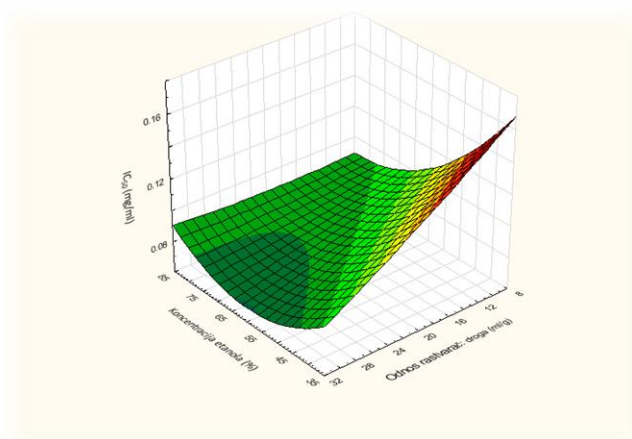
a) temperatura i koncentracija etanola (odnos rastvarač:droga 20 ml/g), b) odnos rastvarač:droga i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) odnos rastvarač:droga i temperatura (koncentracija etanola 60%)

Na slici 33 je prikazan uticaj uslova ekstrakcije na antioksidativnu aktivnost ekstrakata lista belog dudu. Minimum površine zavisnosti ukazuje na maksimum antioksidativne aktivnosti (manja IC_{50} vrednost ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost). Povećanjem koncentracije etanola i temperature u procesu ekstrakcije do određenog nivoa se utiče na povećanu antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Odnos rastvarač:droga utiče na antioksidativnu aktivnost tako što povećanjem odnosa dolazi do smanjenja IC_{50} vrednosti, tj. povećanja antioksidativne aktivnosti (slike 33 b i c).

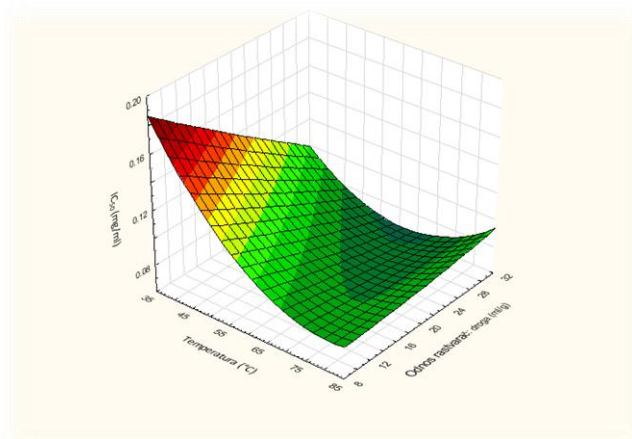
a)



b)



c)



Slika 33. Uticaj ispitivanih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata
 a) temperatura i koncentracija etanola (odnos rastvarač:droga 20 ml/g), b) odnos rastvarač:droga i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) odnosa rastvarač:droga i temperatura (koncentracija etanola 60%)

Da bi se ispitao uticaj nezavisnih promenljivih ekstrakcije i njihove interakcije (koncentracije etanola, temperature i odnosa rastvarač:droga) na zavisne varijable (sadržaj ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida i IC_{50} vrednost) i proverila prikladnost Box-Behnkenovog dizajna u modelovanju i optimizaciji procesa ekstrakcije, proverena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, polinomom drugog reda prema ranije datom izrazu (poglavlje 3.2.1.1.). Model i njegovi koeficijenti dobijeni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka i model daje funkcionalnu zavisnost između zavisnih i nezavisnih promenljivih. Sastoji se od lineranog i kvadratnog člana i člana koji predstavlja interakciju ispitivanih promenljivih, pa prema tome model može biti linaran, kvadratni ili srednja vrednost ukoliko nema uticaja ispitivanih faktora. Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrednosti koeficijenta korelacije (R), odnosno determinacije (R^2), koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Regresioni koeficijenti polinomne funkcije odziva i koeficijenti determinacije su dati u tabeli 16. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije (R^2) ukazuju na adekvatno fitovanje eksperimentalnih rezultata. Vrednost koeficijenta determinacije 0,9858, dobijen za fitovanje rezultata dobijenih pri određivanju IC_{50} vrednosti, ukazuje da 1,42% varijacija nije moglo biti objašnjeno ovim modelom. Individualni efekti, značajnost odabranih faktora i njihovih interakcija se mogu objasniti na osnovu p-vrednosti. Kada su p-vrednosti za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05, ti su članovi značajni. Na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima svi odzivi pokazuju određen stepen značajnosti. Uticaji linearnog i kvadratnog člana su podjednako i veoma značajni ($p < 0,01$), dok se u interakcijama po manjoj značajnosti izdvajaju interakcije koncentracije etanola i odnosa rastvarač:droga (X_1X_3 , $p=0,8171$), kao i koncentracije etanola i temperature (X_1X_2 , $p=0,0568$). Posmatrajući uticaj odziva na sadržaj ukupnih flavonoida se vidi da značajnost ne pokazuju linearni članovi i interakcije koncentracije etanola sa temperaturom i odnosom rastvarač:droga ($p > 0,05$). Na IC_{50} vrednost značajno utiču svi odzivi varirajućih faktora, izuzev faktora kvadrata odnosa rastvarač:droga i interakcije koncentracije etanola i temperature.

Tabela 16. Regresioni koeficijenti polinomne funkcije odziva

Odzivi ^a	Regresioni koeficijent	Standardna devijacija	F - vrednost	p - vrednost ^b
Sadržaj ukupnih fenola				
Odsečak	19,46	0,34		
X_1	1,93	0,27	51,07	0,0002
X_2	2,56	0,27	89,60	<0,0001
X_3	4,03	0,27	222,57	<0,0001
X_1^2	-1,35	0,37	13,20	0,0084
X_2^2	-2,23	0,37	35,81	0,0006
X_3^2	-1,96	0,37	27,65	0,0012
X_1X_2	0,87	0,38	5,19	0,0568

X_1X_3	0,092	0,38	0,058	0,8171
X_2X_3	1,00	0,38	6,85	0,0345
$R^2 = 0,9850$				

Sadržaj ukupnih flavonoida

Odsečak	6,10	0,13		
X_1	-0,12	0,10	1,30	0,2924
X_2	0,24	0,10	5,48	0,0517
X_3	-0,23	0,10	5,23	0,0560
X_1^2	-0,40	0,14	7,87	0,0263
X_2^2	-0,40	0,14	7,97	0,0257
X_3^2	-0,56	0,14	15,96	0,0052
X_1X_2	-0,24	0,14	2,65	0,1479
X_1X_3	-0,063	0,14	0,19	0,6758
X_2X_3	-0,52	0,14	13,07	0,0086
$R^2 = 0,9004$				

IC₅₀ vrednost

Odsečak	0,078	0,0022		
X_1	-0,016	0,0018	81,20	<0,0001
X_2	-0,022	0,0018	155,76	<0,0001
X_3	-0,016	0,0018	81,97	<0,0001
X_1^2	0,013	0,0024	27,29	0,0012
X_2^2	0,019	0,0024	60,80	0,0001
X_3^2	0,0005	0,0024	0,049	0,8313
X_1X_2	-0,0005	0,0025	4,35	0,0755
X_1X_3	0,013	0,0025	28,08	0,0011
X_2X_3	0,016	0,0025	42,75	0,0003
$R^2 = 0,9858$				

^a X_1 : rastvarač; X_2 : temperatura; X_3 : odnos rastvarač:droga.

^b $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

Često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje. Zbog toga se osim koeficijenta korelacije sprovede detaljnije statističke analize na osnovu koje se može preciznije utvrditi opravdanost odabranog modela. U sprovedenom eksperimentu i obradi rezultata primenjena je analiza varijanse (ANOVA) i u tabeli 17 dati su rezultati analize varijanse modelovanih odziva. p-vrednosti za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 odnosno verovatnoća dobijanja visoke F-vrednosti manja od 5%, ukazuje na značajnost primenjenog modela. Prema tome, utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrednosti za sva tri odziva kvadratnim modelom statistički značajna, što znači da je primenjen model opravdan za izvedeni eksperiment. Izrazito male p-vrednosti ($p < 0,01$) za sva tri praćena parametra ukazuju na adekvatnost primenjenog modela i statističku značajnost dobijenih rezultata. To potvrđuje F-vrednost (51,17 za sadržaj ukupnih fenola, 7,03 za sadržaj ukupnih flavonoida i 54,18 za IC₅₀ vrednost) uz verodostojnost manju od

0,01% da je to usled greške. Pored toga, statistički parametar „odstupanje od modela“ nije statistički značajan ($p \geq 0,05$), što takođe potvrđuje iznetu tvrdnju.

Tabela 17. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za ekstrakciju lista *M. alba*

	Suma kvadrata	Stepen slobode	Srednja vrednost kvadrata	F-vrednost	p-vrednost ^a
Sadržaj ukupnih fenola					
Model	268,77	9	29,86	51,17	< 0,0001
Ostatak	4,09	7	0,58		
Odstupanje od modela	3,32	3	1,11	5,80	0,0612
Greška	0,76	4	0,19		
Ukupno	272,85	16			
Sadržaj ukupnih flavonoida					
Model	5,31	9	0,59	7,03	0,0088
Ostatak	0,59	7	0,084		
Odstupanje od modela	0,47	3	0,16	5,35	0,0695
Greška	0,12	4	0,029		
Ukupno	5,90	16			
IC₅₀ vrednost					
Model	0,012	9	0,0013	54,18	<0,0001
Ostatak	0,0002	7	0,00002		
Odstupanje od modela	0,0001	3	0,00004	4,79	0,0822
Greška	0,00004	4	0,000009		
Ukupno	0,012	16			

^a $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert 7.1.6. izračunati su uslovi ekstrakcije za list *M. alba*: koncentracija etanola 69,84%, temperatura od 61,69°C i odnos rastvarač:droga 21,08 ml/g. Pri navedenim uslovima izračunato je da bi se mogao ostvariti maksimalni prinos ukupnih fenola 20,76 mg EHK/g, maksimalni prinos ukupnih flavonoida 6,06 mg ER/g i minimalna IC₅₀ vrednost, tj. maksimalna antioksidativna aktivnost, pri koncentraciji suvog ekstrakta 0,070 mg/ml.

Po istom principu i istoj metodologiji određeni su optimalni uslovi ekstrakcije za list i plod *M. nigra* i plod *M. alba*. Dobijeni rezultati optimizacije za list *M. nigra* prikazani su u prilogu 1 (tabela 1-3, slika 1-3), za plod *M. alba* u prilogu 2 (tabela 4-6, slika 4-6) i plod *M. nigra* u prilogu 3 (tabela 7-9, slika 7-9). Optimalni uslovi ekstrakcije dobijeni za list i plod vrsta *M. alba* i *M. nigra* prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18. Optimalni uslovi ekstrakcije vrsta *Morus* dobijeni primenom RSM

Ekstrakt LIST	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Rastvarač:droga (ml/g)	UF (mg EHK/g)*	UFI (mg ER/g)**	IC ₅₀ (mg/ml)
<i>M. alba</i>	69,84	61,6	21,08	20,76	6,06	0,070
<i>M. nigra</i>	69,46	59,92	20,73	48,47	20,43	0,022
Ekstrakt PLOD	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Vreme (min)	UF (mg EHK/g)*	UFI (mg ER/g)**	IC ₅₀ (mg/ml)
<i>M. alba</i>	62,24	63,21	46,53	1,99	1,77	0,0684
<i>M. nigra</i>	68,62	61,27	48,03	3,53	2,27	0,0246

*mg EHK/g - mg ekvivalenta hlorogenske kiseline po g droge
** mg ER/g - mg ekvivalenta rutina po g droge

Prikazani rezultati optimizacije ekstrakcije lista i ploda duda, kao i kretanje vrednosti sadržaja ukupnih fenola i flavonida u ispitivanom biljnom materijalu su u skladu sa sličnim dosadašnjim istraživanjima (Cacae i Mariza, 2002; Cacace i Mazza, 2003; Rostango i sar. 2004.; Sila i sar., 2007; Jokić i sar., 2010; Chun i sar., 2011). Rostango (2004) je utvrdio da je neophodno dodati određenu količinu vode u etanol i na taj način uticati na polarnost rastvarača, odnosno povećanje prinosa ekstrahovanih polifenolnih komponenti. Veći prinos polifenolnih komponenti nesumljivo utiče i na povećanu antioksidativnu aktivnost. Opseg koncentracije etanola koji se preporučuje za ekstrakciju se kreće u intervalu od 50 do 78%. Veliki broj autora (Azizah i sar., 1999; Wattasinghe i Shahidi, 1999; Cacace i Mazza, 2002; Cacace i Mazza, 2003; Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005; Spingo i De Faveri, 2007; Pompeu i sar., 2009) se u svojim ispitivanjima različitog biljnog materijala potvrdio da temperatura utiče na koeficijente difuzije i rastvorljivost ekstraktivnih jedinjenja u rastvaraču. Povećanjem temperature do 60°C, se povećavaju koeficijenti difuzije i ukupan prinos ekstraktivnih materija, što je rezultat i našeg ispitivanja. Sa druge strane, kontrola povećanja temperature u procesu i zadržavanje povišene temperature određeno vreme ekstrakcije posebno je bitno u radu sa bobičastim plodovima (Naczki i Shahidi, 2006; Pompeu i sar., 2009). Bobičasti plodovi (eng. berry), u koje spada i dud, se odlikuju visokim sadržajem antocijana (Butt i sar., 2008; Isabelle i sar., 2008; Du i sar., 2008; Pawlowska i sar., 2008; Ozgen i sar., 2009; Hojjatpanah i sar., 2011; Wu i sar., 2011). Na povišenoj temperaturi, naročito tokom dužeg vremenskog perioda dolazi do hemijske transformacije antocijana tj. flavonoida, a samim tim se utiče i na antioksidativnu aktivnost dobijenih ekstrakata (Pompeu i sar., 2009; Ozgen i sar., 2009). Shi i saradnici (2003) su pokazali u svom radu da se sa povećanjem temperature i smanjenjem koncentracije etanola utiče na raskidanje veza fenol-polisaharid i fenol-protein, pri čemu dolazi do ekstrahovanja veće količine fenola, kao što je i u ovom radu potvrđeno (prilog 2 i 3). Uticaj odnosa rastvarač:droga je takođe ispitan u određenim ekstrakcionim sistemima (Shi i sar., 2003; Cacace i Mazza, 2003; Pinelo i sar., 2005; Jokić i sar. 2010; Chun i sar., 2011). U ispitivanjima drugih autora postoji neujednačenost u publikovanim rezultatima i oni zavise od stepena usitnjenosti droge i primenjenog rastvarača. Rezultati dobijeni pri ispitivanju ekstrakata lista *Morus*, koji su bili predmet ovog rada, u najvećem broju slučajeva poklapaju se sa objavljenim rezultatima.

Na osnovu dobijenih rezultata optimizacije ekstrakcije lista i ploda različitih vrsta duda i sumiranjem svih dobijenih podataka, ekstrakti koji su korišćeni u nastavku ispitivanja su dobijeni po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1.1. Uslovi ekstrakcije za list i plod obe ispitivane vrste su bili identični i pripadaju intervalima u kojima su dobijeni maksimalni odzivi: 70% koncentracija etanola, temperatura 60°C, odnos rastvarač:droga 20 ml/g.

4.3. EKSTRAKCIJA ETANOLOM

Ekstrakcija ploda, lista i korena dve vrste duda (*M. alba* i *M. nigra*) je izvršena na prethodno određenim optimalnim uslovima ekstrakcije (koncentracija etanola 70%, temperatura 60°C, odnos rastvarač:droga 20 ml/g) i rezultati prinosa suvog ekstrakta različitih delova duda dati su u tabeli 19.

Tabela 19. Prinosi ekstrakcije različitih delova duda primenom 70% etanola kao ekstragensa

Uzorak		Prinos ekstrakcije (% g/ 100g)
<i>M. alba</i>	Plod	25,03±0,02
<i>M. nigra</i>		19,22±0,11
<i>M. alba</i>	List	23,40±0,09
<i>M. nigra</i>		22,42±0,08
<i>M. alba</i>	Koren	16,32±0,13
<i>M. nigra</i>		22,48±0,06
<i>M. alba</i>	List*	22,58±0,07
<i>M. nigra</i>		21,97±0,10

*uzorak lista nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂

Razlika u prinosu ekstrakcije uočena je kod ploda belog i crnog duda, gde je prinos ekstrakcije ploda belog duda (25,03%) veći u odnosu na crni dud (19,22%). Ovakav prinos je rezultat kvaliteta polaznog materijala i sadržaja vlage u plodu, plod crnog duda je imao veći sadržaj vlage (82,02%) u odnosu na plod belog duda (75,18%), što je prikazano u tabeli 13. Približno slični prinosi ekstrakcije dobijeni su ekstrakcijom lista obe vrste duda. Ekstrakcija superkritičnim CO₂ nije bitno uticala na dobijeni prinos u poređenju sa prinosom dobijenim ekstrakcijom lista pre superkriticne ekstrakcije. Znatna razlika u prinosu uočena je poređenjem prinosa korena dve vrste duda, gde je ostvaren prinos kod korena belog duda (16,32%) znatno manji u odnosu na prinos ostvaren ekstrakcijom korena crnog duda (22,48%).

4.3.1 ISPITIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA ETANOLNIH EKSTRAKATA

4.3.1.1. Određivanje polifenolnih jedinjenja u ekstraktima duda

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana u etanolnim ekstraktima (poglavlje 3.2.2), dati su u tabeli 20.

Tabela 20. Sadržaj ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFI), odnos UFI/UF, sadržaji antocijana (UA) i monomera antocijana (UMA) u suvim ekstraktima duda

Uzorak	UF (mg EHK/g)	UFI (mg ER/g)	(UFI/UF)100 (%)	UA (mg C3G/g)	UMA (mg C3G/g)
<i>M. alba</i> Plod	14,13±0,12	3,52±0,09	24,91	0,5±0,02	0,24±0,01
<i>M. nigra</i> Plod	16,37±0,19	4,73±0,02	28,89	2,97±1,91	1,32±0,49
<i>M. alba</i> List	66,77±0,75	33,30±0,13	49,88	-	-
<i>M. nigra</i> List	145,23±0,51	67,37±0,39	46,38	-	-
<i>M. alba</i> Koren	170,20±1,41	54,29±0,15	31,89	-	-
<i>M. nigra</i> Koren	186,30±0,42	57,11±0,11	30,65	-	-
<i>M. alba</i> List*	46,98±0,99	22,47±0,72	47,82	-	-
<i>M. nigra</i> List*	122,13±0,60	43,74±0,14	35,81	-	-

*uzorak lista nakon ekstrakcije superkričnim CO₂

Rezultati ispitivanja ukazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida kod ekstrakata vrste *M. nigra* (186 mg EHK/g u ekstraktu korena i 67 mg ER/g u ekstraktu lista). Najmanji sadržaji ovih jedinjenja dobijeni su u ekstraktima ploda belog duda (14,13 mg EHK/g i 3,52 mg ER/g). U odnosu na beli dud ekstrakt ploda crnog duda je bogatiji antocijanima i monomerima antocijana, što je i očekivano jer je u pitanju bobičasti plod crveno-ljubičaste boje, koja potiče od ovih jedinjenja. Nešto niži sadržaji fenola i flavonoida u odnosu na ekstrakte korena detektovani su u ekstraktima lista duda. Znatno veći sadržaj polifenolnih jedinjenja (oko 2 puta) je detektovan u ekstraktima lista *M. nigra* u odnosu na ekstrakte lista *M. alba*. Može se zaključiti da *M. nigra* ima, nezavisno od dela biljke veći sadržaj ispitivanih jedinjenja.

Dobijene vrednosti sadržaja polifenolnih komponenata su u saglasnosti sa literaturnim podacima. Za ekstrakt ploda različitih vrsta duda sadržaj polifenolnih komponenata se kreće u intervalu od 1,81 do 34,88 mg ekvivalenta (korišćene su različite referentne supstance) po g svežeg ploda, a za ekstrakt lista od 10,2 do 93 mg ekvivalenta po gramu polazne droge. U literaturi nema puno podataka o sadržaju polifenolnih komponenata u ekstraktima korena roda *Morus*. Samo se u rezultatima istraživanja Chang i sar. (2011) pojavljuje podatak da je sadržaj ovih komponenata u ekstraktu korena *M. alba* 60,65 mg/g, što je manji sadržaj u odnosu na vrste koje su bile predmet ispitivanja ovoga rada. Podaci o ukupnom sadržaju flavonoida u ekstraktima vrste *Morus* su manje zastupljeni u odnosu na rezultate sadržaja fenolnih jedinjenja.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiču genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti biljke (Orhan i sar., 2007). Dokazano je da na sadržaj flavonoida utiču UV zračenje i koncentracija ugljendioksida (Daniel i sar., 1999; Caldwell i sar., 2005). Takođe, i ostali spoljašnji faktori (svetlost, temperatura, prisustvo hranljivih materija u zemljištu) mogu uticati na fenilpropanoidni metabolizam (Dixon i Paiva, 1995), odnosno na sadržaj polifenola.

Fenolna jedinjenja deluju kao redukujući agensi, donori vodonika, imaju osobine heliranja metala i utiču na antioksidativno delovanje ekstrakata u kojima se nalaze. Antioksidativno delovanje ovih komponenata potiče iz više elemenata njihove hemijske strukture. Flavonoidi, zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi, spadaju u fenolna jedinjenja sa najizraženijim antioksidativnim delovanjem. Udeo ukupnih flavonoida u ukupnim fenolima mogao bi da ima značajan uticaj na jačinu antioksidativnog delovanja dudu ili odgovarajućeg ekstrakta. Veliki udeo flavonoida u odnosu na ukupne fenole dobijen je u ekstraktima lista dudu, a s druge strane, najmanji za ekstrakte plodova dudu (udeo manji od 30%). Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da određeni ekstrakti mogu pokazati značajno antioksidativno delovanje u zavisnosti od ukupnog sadržaja fenola, odnosno flavonoida, čiji je relativno veliki sadržaj značajan za delovanje.

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja dobijen metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletnu kvalitativnu i kvantitativnu sliku polifenolnih jedinjenja sadržanih u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe(II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla), koji utiču na nerealno povećanje rezultata merenja (Singelton i sar., 1999). Metoda za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida pokazuje nejednaku selektivnost prema jedinjenjima, jer pozitivnu reakciju daju samo jedinjenja koja imaju *o*-dihidroksifenolne, 3-hidroksihromonske, 5-hidroksihromonske i *o*-hidroksikarbonilne funkcionalne grupe (Merken i Beecher, 2000; Sakakibara i sar., 2003). Iz ovih razloga je kompletna kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja u ekstraktima dudu izvršena primenom HPLC metode.

4.3.1.2. HPLC analiza polifenolnih komponenata

U cilju utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima dudu primenjavana je HPLC metoda (poglavlje 3.2.2.5.). Sadržaji identifikovanih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ispitivanih vrsta *Morus* prikazani su u tabeli 21.

Tabela 21. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima roda *Morus* (mg/g ekstrakta)

Polifenolno jedinjenje	<i>M. alba</i>				<i>M. nigra</i>			
	Plod	List	Koren	List*	Plod	List	Koren	List*
Galna kiselina	0,0001	0,4011	0,1741	0,4723	0,1113	0,2054	0,1030	0,1532
Protokatehinska kiselina	0,0807	0,4365	0,2294	0,5209	0,5528	0,6711	0,0834	0,7369
Katehin	0,0763	0,6844	1,3401	0,3533	0,1123	0,8418	9,3871	0,5418
Kafena kiselina	0,0431	16,0656	5,4294	14,548	0,3641	85,2824	9,2886	79,7763
Vanilinska kiselina	0,0307	0,9123	-	-	-	-	-	-
Hlorogenska kiselina	0,0715	0,1316	45,8364	0,2720	0,0134	0,5808	79,7066	0,4697
Derivat kafene kiseline	0,0115	4,7207	4,8788	4,1701	0,3358	15,8793	8,4752	14,8130
Epikatehin	-	0,6123	-	0,5017	-	0,3386	-	0,3103
Derivat kvercetina	-	4,0190	-	3,7027	0,2203	22,9412	-	7,2491
Rutin	-	2,1212	-	2,0994	0,2670	10,5695	-	9,8730
Ukupno	0,3139	30,1048	57,9583	26,8472	1,9769	137,3100	107,0439	113,9232

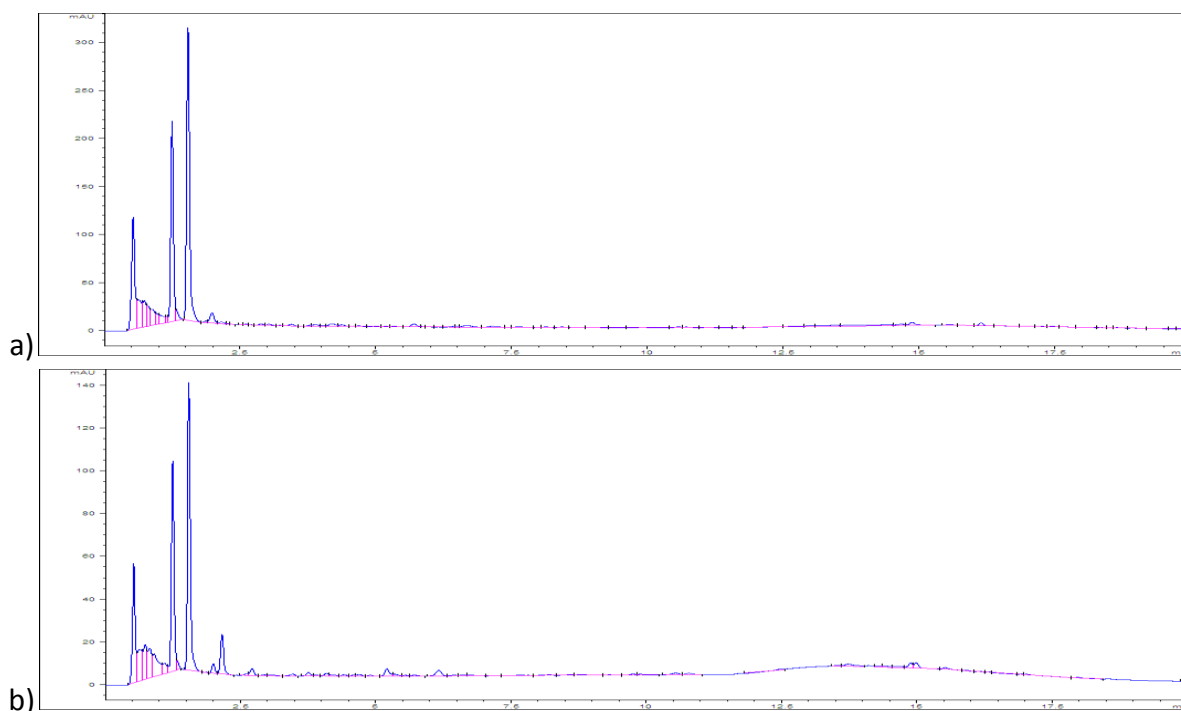
*uzorak lista nakon ekstrakcije superkričnim CO₂

Ispitivanje ekstrakata duda obuhvatalo je utvrđivanje prisustva 21 polifenolnog jedinjenja: 12 fenolnih kiselina i 9 flavonoida (tabela 10). U ekstraktima ploda, lista i korena ispitivanih vrsta duda utvrđeno je prisustvo deset polifenolnih jedinjenja: galna, protokatehinska, kafena, vanilinska i hlorogenska kiselina, katehin, epikatehin, rutin, derivat kafene kiseline i derivat kvercetina. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima lista i korena je mnogo veći od detektovanog sadržaja u ekstraktu ploda, nezavisno od vrste.

HPLC analizom ekstrakata ploda duda (slika 34) utvrđeno je prisustvo manjeg broja fenolnih jedinjenja. U ekstraktu ploda *M. alba* je dokazano prisustvo galne, protokatehinske, kafene, vanilinske i hlorogenske kiseline, katehina i derivata kafene kiseline. Od svih ispitivanih fenola u ekstraktu *M. alba* vrste, protokatehinska kiselina, hlorogenska kiselina i katehin se nalaze u sadržaju većem od 50 µg/g ekstrakta, dok je sadržaj galne kiseline skoro zanemarljiv (manji od 0,1 µg/g ekstrakta). U poređenju sa ekstraktom ploda *M. nigra* ekstrakt ploda *M. alba* sadrži vanilinsku kiselinu, a ne sadrži derivat kvercetina i rutin. U ekstraktu ploda *M. nigra* dokazano je prisustvo galne, protokatehinske, kafene i hlorogenske kiseline, katehina, rutina, derivat kafene kiseline i derivat kvercetina.

U poređenju sa ekstraktom ploda *M. alba* (0,314 mg/g ekstrakta) ukupan sadržaj identifikovanih fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda *M. nigra* je oko šest puta veći (1,977

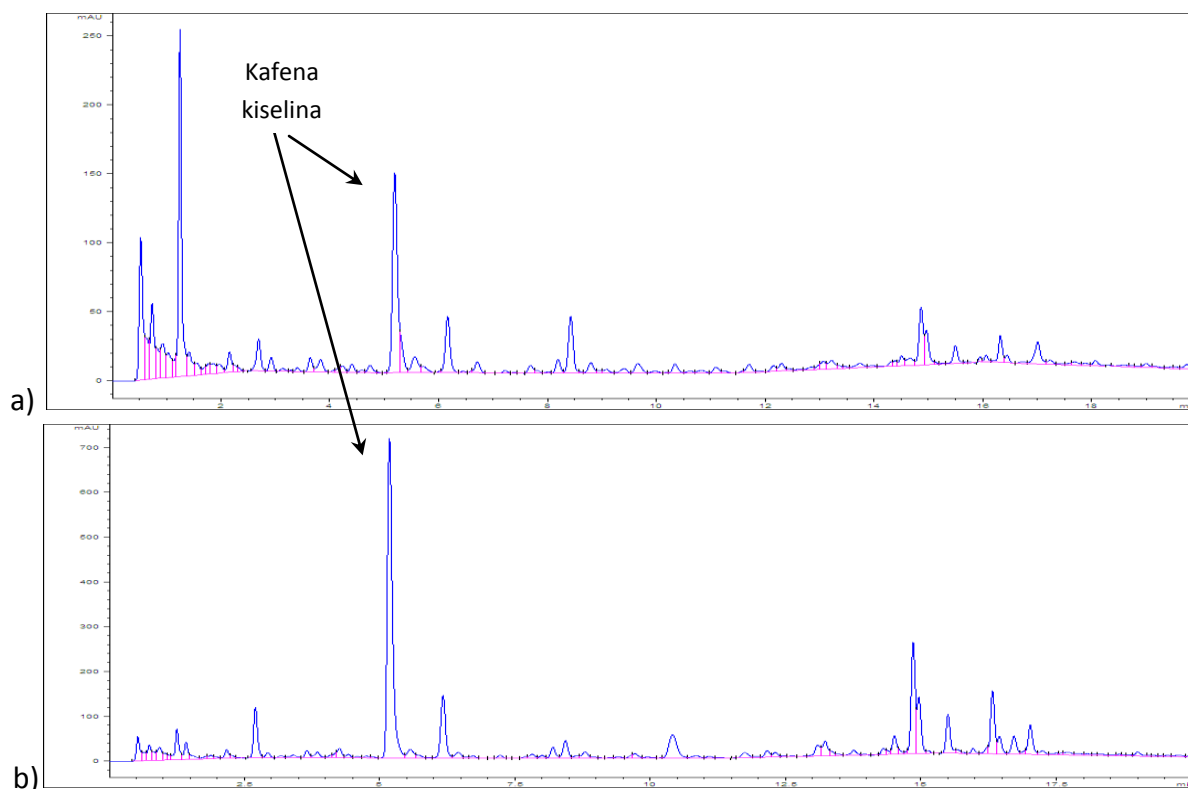
mg/g ekstrakta). U ekstraktu ploda crnog duda je drugačija raspodela dominantnih jedinjenja, u većem sadržaju se nalaze protokatehinska (0,553 mg/g), kafena kiselina (0,3641 mg/g), derivat kafene kiseline (0,336 mg/g) i rutin (0,267 mg/g). Od svih prisutnih jedinjenja najmanji udeo ima hlorogenska kiselina (0,68%). Pregled dostupne literature ukazuje na neujednačen sastav ekstrakata i različitu zastupljenost polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ploda *Morus* vrste. Zadernowski i sar. (2005) su saopštili da u ekstraktu ploda crnog duda se nalaze: galna (2,73 µg/g), protokatehinska (12,1 µg/g), vanilinska (0,65 µg/g), kafena (11,7 µg/g), *o*-kumarinska (2,12 µg/g), *p*-kumarinska (7,61 µg/g) i ferulna kiselina (0,34 µg/g). Protokatehinska kiselina je u ispitivanim ekstraktima *M. nigra* dominantna, kao i u ispitivanim ekstraktima u ovom radu. Gundogdu i sar. (2011) su ispitivali ekstrakte ploda *M. alba*, *M. nigra* i *M. rubra* i utvrdili polifenolni profil ekstrakata. U sve tri ispitane vrste dominantni flavonoid je rutin (0,851-1,423 mg/g svežeg ploda), dok su se galna, hlorogenska i kafena kiselina izdvojile po svom sadržaju (0,119 do 3,106 mg/g svežeg ploda) u odnosu na ostale prisutne fenolne kiseline. Ispitivanje ploda različitih vrsta *Morus* (Ercisli i Orhan, 2007; Memon i sar., 2010; Yang i sar., 2010) ukazuje na različit sastav ekstrakata u zavisnosti od osobina upotrebljenog materijala za ekstrakciju. Veliki broj istraživanja je dokazao da klimatski uslovi, tip zemljišta, broj sunčanih sati u godini, prosečna temperatura i slični uslovi bitno utiču na polifenolni sastav bobičastog voća (Dixon i Paiva, 1995; Geraspopoulos i Stavroulakis, 1997; Zadernowski i sar., 20005). Ekstrakti ploda ispitivanih vrsta *Morus* odlikuju se manjim sadržajem polifenolnih jedinjenja u poređenju kako sa ekstraktima lista, tako i sa ekstraktima korena.



Slika 34. HPLC hromatogrami ekstrakata ploda duda: a) *M. alba*, b) *M. nigra*

Ekstrakti lista odlikuju se relativno velikim sadržajem polifenolnih jedinjenja, ekstrakt lista *M. nigra* 137,31 mg/g, a ekstrakt lista *M. alba* 30,10 mg/g. U oba ekstrakta značajno se

po svom sadržaju u odnosu na ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja ističe kafena kiselina (53,34% za *M. alba* i 62,11% za *M. nigra*), što se može jasno videti i na hromatogramima dobijenim pri HPLC analizi (slika 35). Derivat kafene kiseline (4,72 mg/g za *M. alba* i 15,88 mg/g za *M. nigra*), derivat kvercetina (4,02 mg/g za *M. alba* i 22,94 mg/g za *M. nigra*) i rutin (2,12 mg/g za *M. alba* i 10,57 mg/g za *M. nigra*) su mnogo manje zastupljeni u ekstraktima, dok je sadržaj ostalih detektovanih jedinjenja manji od 1 mg/g ekstrakta. Slični rezultati u pogledu sastava ekstrakata su dobijeni i u istraživanju Bidel i sar. (2007), u kome je kafena kiselina dominantno fenolno jedinjenje. Međutim, razlika postoji u tome što je u pomenutom istraživanju detektovana i do deset puta manja količina kafene kiseline u poređenju sa rezultatima ovog rada. O flavonoidnom sastavu ekstrakata *Morus* postoje tri publikacije (Zhishen i sar., 1999; Sohn i sr., 2004; Katsube i sar., 2006), koje ističu prisutnost rutina, kvercetin 3-(6-malonilglikozida), astragalina i izokvercetina u ekstraktima lista duda i baziraju se na pojedinačnim aktivnostima pomenutih jedinjenja što ne daje mogućnost upoređivanja dobijenih rezultata.

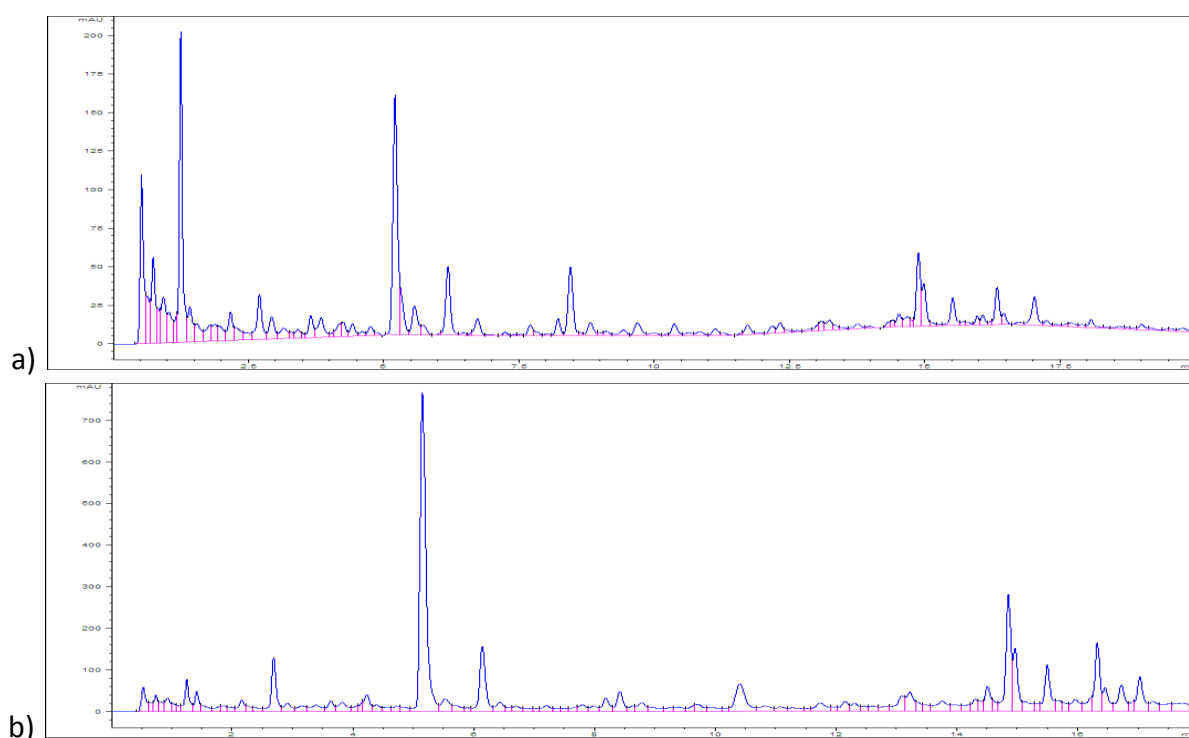


Slika 35. HPLC hromatogrami ekstrakata lista duda: a) *M. alba*, b) *M. nigra*

Rezultati Memon i sar. (2010), koji su vezani za sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima *M. nigra*, *M. alba* i *M. leavigata*, nisu u saglasnosti sa rezultatima datim u ovom radu. Naime, pomenuti autori su detektovali hlorogensku kiselinu kao dominantnu kiselinu, čiji se sadržaj kretao od 0,64 do 1,11 mg/g ekstrakta. Sadržaj hlorogenske kiseline u ekstraktima koji su predmet ovog rada je nešto niži (0,13, odnosno 0,58 mg/g), i kao što je navedeno dominantna je kafena kiselina. Međutim, pomenuta grupa autora za analizu nije

ni koristila standard kafeine kiseline pri analizi ekstrakata *Morus*, tako da se sa sigurnošću ne može tvrditi da nije bila prisutna u ispitivanim ekstraktima.

Uočene razlike u sadržaju detektovanih fenolnih jedinjenja su najverovatnije posledica različitog analiziranog materijala, različite tehnike izolacije i/ili primenjene metode za analizu fenolnih jedinjenja. Ova neslaganja mogu ukazati i na to da sastav fenolnih komponenata nije tipičan za određenu vrstu *Morus* i nije u potpunosti kontrolisan na nivou gena, nego na njega mogu imati uticaj i različiti ekološki faktori. Katsube i sar. (2009) su dokazali uticaj temperature sušenja na polifenolni sadržaj, prateći nivo pet dominantnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima lista *M. alba*. Zhishen i saradnici (1999) su ispitivali sadržaj rutina i kvercetina u ekstraktu lista, i pokazali da sadržaj pomenutih flavonoida zavisi od godišnjeg doba u kome se bere list. Isto tako, uzimajući u obzir hemijsku strukturu kafeine kiseline i hlorogenske kiseline (estar kafeine i kvininske kiseline) moguće je da je stajanjem droge došlo i do hemijske transformacije jedinjenja ili enzimskih reakcija u ispitivanom materijalu, listu duda, koje su uticale na ovakav profil fenolnih kiselina. Na osnovu literaturnih podataka može se zaključiti da rezultati ovih istraživanja ukazuju na uticaj uslova uzgajanja biljke, pripreme materijala za ekstrakciju, ali i načina izolovanja aktivnih komponenata na polifenolni profil dobijenih ekstrakata.

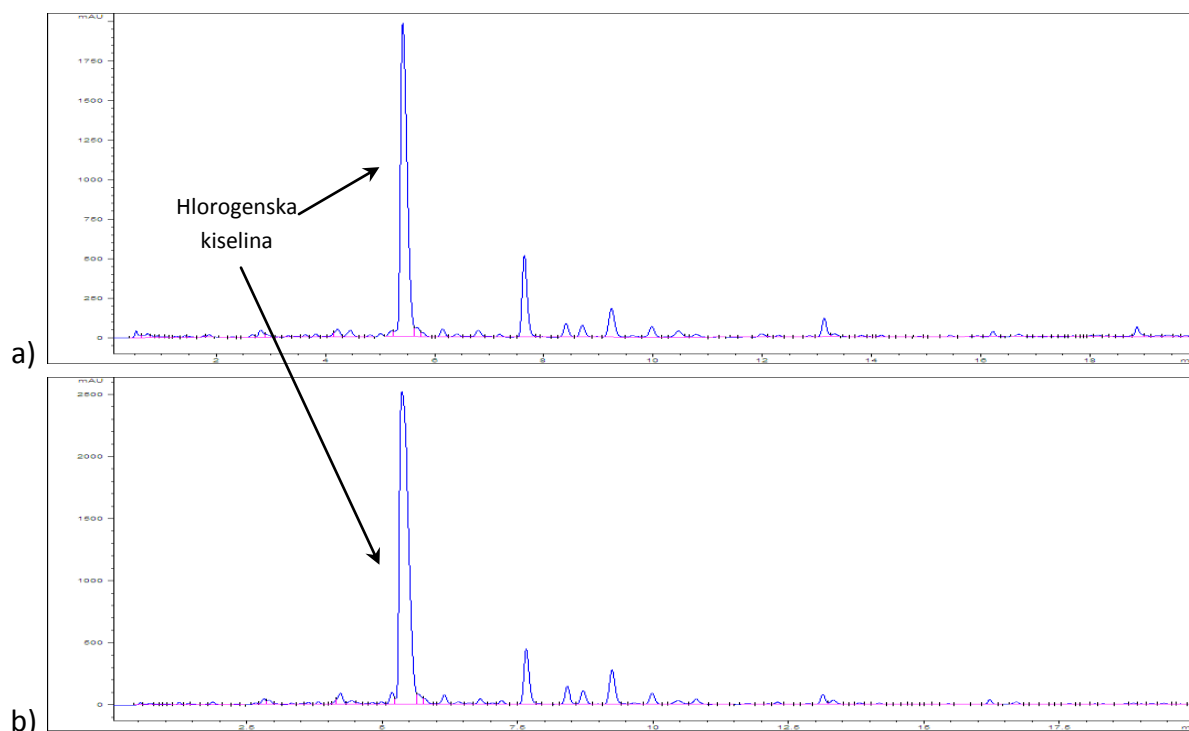


Slika 36. HPLC hromatogrami ekstrakata lista duda nakon CO₂ ekstrakcije: a) *M. alba*, b) *M. nigra*

Poređenjem rezultata dobijenih HPLC analizom ekstrakata lista belog i crnog duda nakon superkriticne ekstrakcije (tabela 21, slike 35 i 36) može se uočiti da postoji izvesna razlika u kvantitativnom sastavu, nakon izolovanja (separacije) lipofilnih jedinjenja procesom SFE, što je rezultat, najverovatnije, radnih uslova ekstrakcije kojima je bila izložena droga, tj.

list duda. Vanilinska kiselina prisutna u ekstraktu lista belog duda nije detektovana u ekstraktu droge nakon CO₂ ekstrakcije. Takođe, u ekstraktu lista crnog duda je uočena velika razlika u sadržaju derivata kvercetina u ekstraktu native droge (22,9412 mg/g) i ekstraktu nakon separacije lipofilnih komponenata (7,2491 mg/g). Pri superkritičnoj ekstrakciji često dolazi do enzimskih reakcija i/ili hemijskih transformacija polifenolnih jedinjenja, naročito na slobodnim OH grupama (Siquera i sar., 2011) što se pretpostavlja da je razlog ovako dobijenih rezultata. Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja je manji za *M. alba* 10,82%, a za *M. nigra* 17,03%, u odnosu na sadržaj u ekstraktima native droge.

U ekstraktima korena ispitivanih vrsta detektovano je šest polifenolnih komponenata: galna, protokatehinska, kafena i hlorogenska kiselina, katehin i derivat kafeine kiseline. U oba ekstrakta dominira hlorogenska kiselina (udeo veći od 74%), što se vidi i na hromatogramima koji su prikazani na slici 37. Derivat katehina (1,34 mg/g za *M. alba* i 9,38 mg/g za *M. nigra*), kafena kiselina (5,43 mg/g za *M. alba* i 9,29 mg/g za *M. nigra*) i derivat kafeine kiseline (4,88 mg/g za *M. alba* i 8,48 mg/g za *M. nigra*) su mnogo manje zastupljeni u ekstraktima, dok je udeo galne i protokatehinske kiseline manji od 1 mg/g ekstrakta. Ekstrakt korena sadrži najviše (57,96 mg/g) polifenolnih jedinjenja u okviru vrste *M. alba*, što se slaže sa rezultatima spektrofotometrijskih merenja prikazanim u tabeli 20. Ekstrakti vrste *M. nigra* pokazuju drugačiji odnos, poređenjem ukupanog sadržaja polifenolnih jedinjenja detektovanih HPLC analizom (tabela 21) i spektrofotometrijskim merenjem (tabela 20), što je najverovatnije posledica neselektivnosti spektrofotometrijskih metoda.



Slika 37. HPLC hromatogrami ekstrakata korena duda: a) *M. alba*, b) *M. nigra*

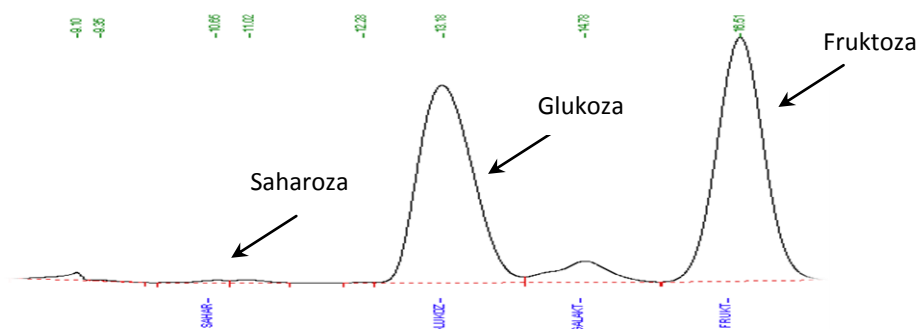
Svi dostupni literaturni podaci o ekstraktima korena duda govore uglavnom o biološkoj i farmakološkoj aktivnosti ili o prisustvu specifičnih flavonoidnih jedinjenja (morin,

malberozid, kuanon S, ciklomorusin, itd.) koja nisu detektovana u ekstraktima ispitivanim u ovom radu. O profilu fenolnih kiselina korena duda ne postoji ni jedan dostupan navod u literaturi i samim tim ovi rezultati po prvi put svedoče o prisustvu ovih sekundarnih metabolita.

Imajući u vidu da kafena kiselina, hlorogenska kiselina, rutin i katehin imaju veliki biološki potencijal i ispoljavaju mnogobrojne pozitivne efekte, kao što su snažna antiinflamatorna, antiviralna i antikancerogena aktivnost, sadržaj ovih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima ukazuje na njihovo potencijalno delovanje i potrebu za daljim ispitivanjima njihovih bioloških i farmakoloških efekata. Uopšteno, dobijeni rezultati polifenolnog sadržaja mogu biti od velike koristi u proceni lekovitosti vrsta *Morus*, imajući u vidu njihovu manju zastupljenost u tradicionalnoj medicini i ishrani na našim prostorima. Takođe, većina ispitanih ekstrakata može se smatrati potencijalnim izvorom određenih fenolnih jedinjenja, jer ih sadrže u značajnim količinama i mogu biti iskorišćene kao sirovine za njihovo dobijanje.

4.3.1.3. HPLC analiza saharida

U cilju utvrđivanja sastava i sadržaja saharida u etanolnim ekstraktima ploda duda, primenjena je HPLC metoda (poglavlje 3.2.2.6.). Šećeri su primarni metaboliti koji su osnovni izvori energije biljke, naročito bobičastih plodova (Gundogdu i sar., 2011). Sadržaj ugljenih hidrata varira od 3 do 30%, a dominantni monosaharidi su glukoza i fruktoza. Dobijeni HPLC hromatogram za plod crnog duda je prikazan na slici 38, a rezultati analize su dati u tabeli 22.



Slika 38. HPLC hromatogram saharida ekstrakta ploda *M. nigra*

Tabela 22. Sadržaj šećera u ekstraktima roda *Morus* određen HPLC analizom

Jedinjenje	<i>M. alba</i>		<i>M. nigra</i>	
	mg/g ekstrakta	mg/g ploda	mg/g ekstrakta	mg/g ploda
Saharoza	0,112	0,028	0,175	0,034
Glukoza	19,836	4,965	25,740	4,947
Fruktoza	20,142	5,042	26,959	5,182
Ukupno	40,09	10,035	52,874	10,162

Sadržaji glukoze (oko 49%) i fruktoze (oko 50%) u ispitivanim uzorcima u odnosu na ukupan sadržaj detektovanih saharida je toliko veći u odnosu na saharozu (oko 0,3%) da se može zaključiti da je saharoza prisutna u tragovima. Ozgen i sar. (2009) su ispitivali sadržaj šećera u različitim varijetetima vrsta *M. nigra* i *M. rubra* i utvrdili da su fruktoza (oko 52%) i glukoza (oko 48%) dominantni šećeri prisutni u ovim ekstraktima, sa čime se slažu predhodni rezultati. Ukoliko se poredi sadržaj šećera u odnosu na polazni materijal (plod) može se videti da su udeli slični i da nisu specifični za ispitivane vrste belog i crnog dudu. Slični rezultati su dobijeni i u ispitivanju Gondogdu i sar. (2011) koji su određivali sadržaj šećera u tri *Morus* vrste: *M. alba*, *M. nigra* i *M. rubra*.

Sadržaj šećera u polaznoj sirovini (plodu) i samim ekstraktima je značajan sa stanovišta mogućnosti upotrebe ekstrakata kao korigensa ukusa nekog gotovog proizvoda.

4.3.1.4. Sadržaj mikro-, makro- i toksičnih elemenata primenom ICP-OES metode

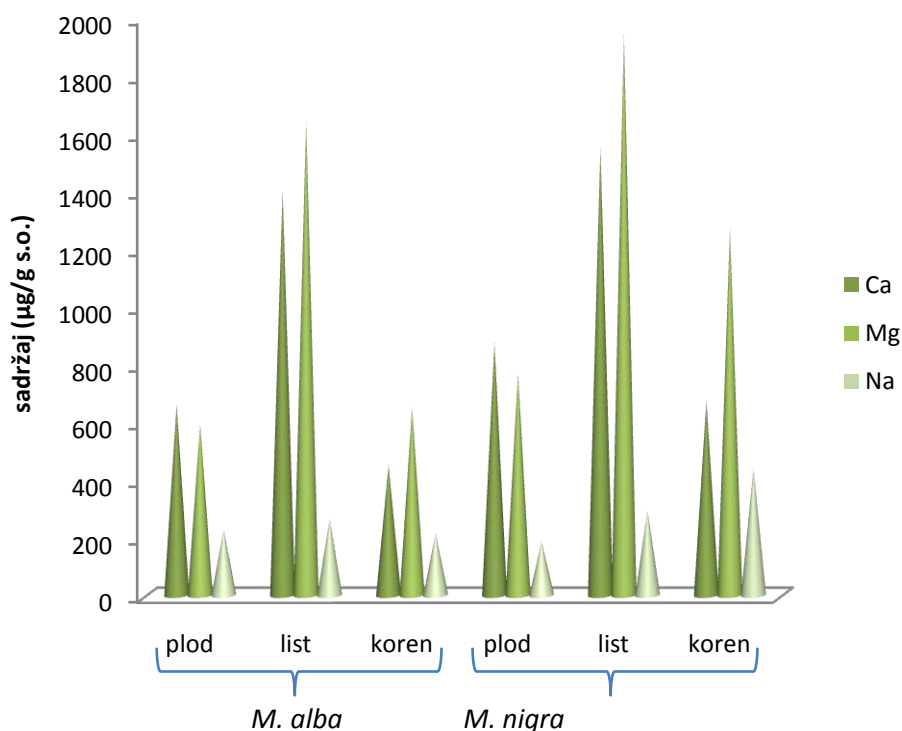
Nekoliko naučnih istraživanja bavilo se pitanjem sadržaja mikro-, makro- i toksičnih elemenata u različitim vrstama dudu (Ercisli i Orhan, 2007; Imran i sar., 2010). Istraživanja su uglavnom bazirana na ispitivanju mineralnog sastava ploda različitih vrsta dudu koja su pokazala da plod dudu sadrži čitav spektar mineralnih materija. U istraživanjima različitih vrsta dudu, koja su sprovedena u Turskoj, dobijene su vrednosti sadržaja Ca od 132 do 576 mg/100 g svežeg ploda (s.p.), Mg od 106 do 360 mg/100 g s.p. i Na od 59 do 280 mg/100 s.p. Mikroelementi u ispitanim ekstraktima dudu se kreću u intervalu od 0,4 do 77,6 mg/100 g s.p., gde su Fe i Zn u najviše zastupljeni a Cu najmanje zastupljen element u odnosu na sve detektovane elemente. U tabeli 23 su prikazani rezultati analize sadržaja mikro-, makro- i toksičnih elemenata u suvim ekstraktima dudu, primenom ICP-OES metode (poglavlje 3.2.2.7).

Tabela 23. Sadržaj mikro-, makro- i toksičnih elemenata u ekstraktima dudu ($\mu\text{g/g}$ s.e.*)

Element	<i>Morus alba</i> L.			<i>Morus nigra</i> L.		
	plod	list	koren	plod	list	koren
Makroelementi						
Ca	660**	1.399	450	873	1.548	674
Mg	591	1.641	652	769	1.942	1.269
Na	226	264	216	187	293	440
Mikroelementi						
B	7,25	40,4	24,1	8,9	23,3	17,2
Co	< 0,016	< 0,016	0,14	< 0,016	< 0,016	0,44
Cr	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Cu	10,5	17,4	10,0	11,9	19,5	22,9
Fe	6,35	2,63	8,97	5,45	143	18,3
Li	0,14	2,43	0,69	0,13	0,77	2,06
Mn	2,56	4,22	4,59	6,02	9,80	19,3
Ni	1,25	5,90	1,73	1,42	4,81	14,2
Se	< 0,003	0,10	0,04	< 0,003	< 0,003	0,09
Sr	2,18	2,77	1,15	2,34	3,01	1,68
Zn	17,7	32,5	3,36	10,7	31,9	13,7
Toksični elementi						
Al	3,52	1,93	7,30	3,95	2,23	7,81
As	0,04	0,08	0,08	0,04	0,13	0,13
Cd	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	0,01	< 0,0007
Hg	< 0,003	< 0,003	0,66	< 0,003	0,11	< 0,003
Pb	0,86	< 0,014	< 0,014	< 0,014	0,26	0,12

* $\mu\text{g/g}$ s.e. - μg po g suvog ekstrakta
** srednja vrednost, n=3

Relativno veliki sadržaj Ca i Mg je karakterističan za list obe vrste dudu, dok je Mg dominantni makroelement ekstrakta korena crnog dudu (slika 39). Ekstrakti lista imaju veći sadržaj magnezijuma i kalcijuma u odnosu na ekstrakte ploda i korena iste vrste. Natrijum je manje zastupljen makroelement u svim ispitanim ekstraktima. Ekstrakt lista crnog dudu se izdvaja po većem sadržaju Ca i Mg u odnosu na ostale ekstrakte, dok se ekstrakt korena crnog dudu izdvaja po većem sadržaju Na u odnosu na ostale ekstrakte (tabela 23).



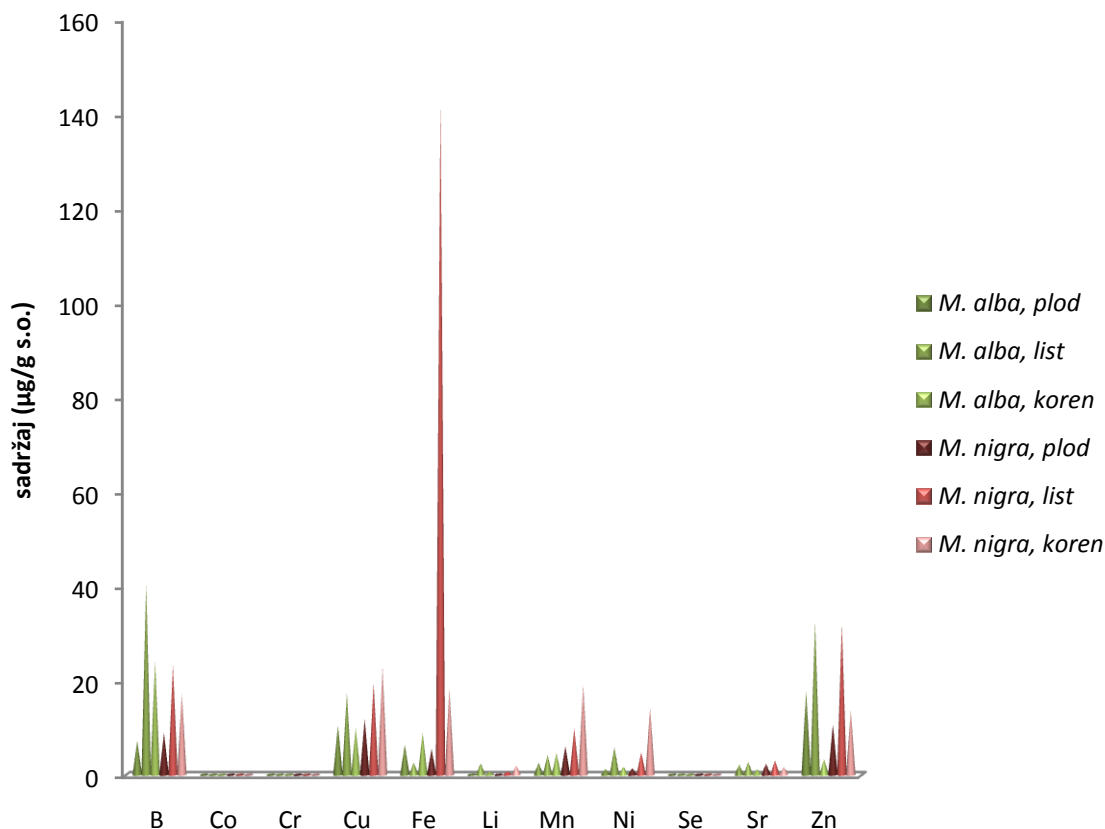
Slika 39. Sadržaj makroelemenata u ekstraktima duda

Sadržaj mikroelemenata u ispitanim ekstraktima duda je različit i kreće se do 143 µg/g s.e., koliki je sadržaj Fe u ekstraktu lista *M. nigra*. Najzastupljeniji mikroelementi u svim ispitanim uzorcima duda, po opadajućem nivou, su Fe, B, Zn, Cu i Mn (tabela 23 i slika 40).

U analiziranim ekstraktima ploda duda najzastupljeniji je Zn (17,7 µg/g s.e.) za *M. alba* i Cu (11,9 µg/g s.e.) za *M. nigra*. Co, Cr i Se su elementi koji se u ekstraktima ploda duda nalaze u vrlo maloj količini ili je njihov sadržaj ispod granice detekcije primenjene metode. Poređenjem sadržaja mikroelemenata u ekstraktima ploda duda poreklom iz Turske i Kine (Ercisli i Orhan, 2007; Imran i sar., 2010; Yang i sar., 2010) i Srbije može se zapaziti da su dobijeni slični rezultati, Fe, Zn i Cu su mikroelementi koji su dominantni u plodu duda.

U ekstraktima lista duda po svom sadržaju izdvajaju se B, Cu i Zn za obe ispitane vrste duda, sa izuzetkom da u ekstraktu lista crnog duda dominira Fe. Zanimljivo je da je sadržaj gvožđa višestruko veći u ekstraktu lista *M. nigra* (143 µg/g s.e.) nego u ekstraktu lista *M. alba* (2,63 µg/g s.e.).

Što se tiče mikroelemenata koji su ispitivani u ekstraktima korena veoma značajni podaci su dobijeni za ekstrakt korena crnog duda. Po sadržaju od 11 mikroelemenata, 4 elementa (Cu, Mn, Ni i Zn) su u većem sadržaju u ekstraktu korena crnog duda u odnosu na svih šest ispitanih ekstrakata, a 10 je u većem sadržaju u odnosu na ekstrakt korena belog duda. Poređenjem svih ispitanih ekstrakata po osnovu sadržaja mikroelemenata posebno se izdvajaju ekstrakti lista ispitanih vrsta *Morus* i ekstrakt korena *M. nigra*.



Slika 40. Sadržaj mikroelemenata u ekstraktima duda

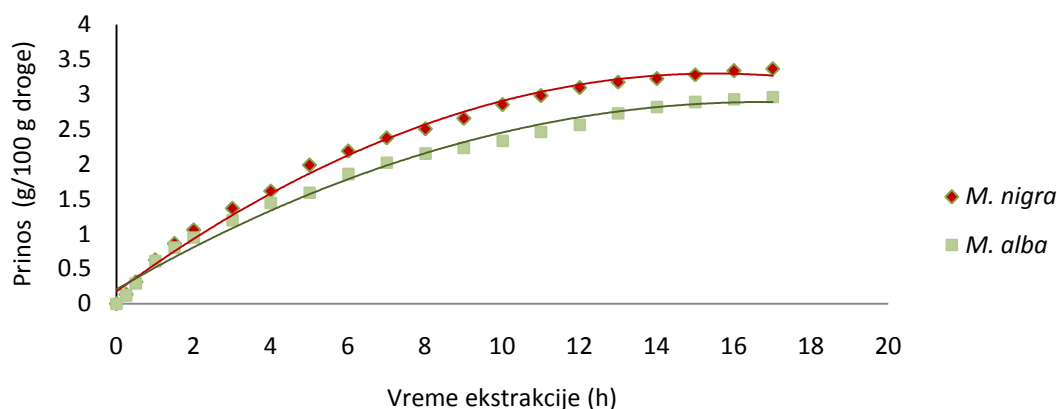
Nizak sadržaj toksičnih elementa (tabela 23) pokazuje da su ekstrakti zadovoljavajućeg kvaliteta za humanu upotrebu, tj. da ne sadrže toksične elemente preko dozvoljenih granica (Švarc-Gajić, 2010).

Obzirom na relativno veliki sadržaj makroelemenata (Mg i Ca), kao i mikroelemenata (Fe, B, Zn, Cu i Mn) i mali sadržaj toksičnih elemenata, ekstrakti duda se mogu preporučiti za humanu upotrebu u vidu jedne od komponenata dijetetskog suplementa sa određenim mineralnim sastavom.

4.4. SUPERKRITIČNA EKSTRAKCIJA

Za ekstrakciju lipofilnih komponenata postupak superkritične ekstrakcije predstavlja odličnu alternativu klasičnim postupcima ekstrakcije, što je već opisano u poglavlju 2.7.2. Preliminarna ispitivanja različitih delova duda (ploda, lista i korena) su pokazala da je list kao materijal jedini pogodan za ovu vrstu ekstrakcije. Da bi se izvršila ekstrakcija ploda duda, bilo je potrebno osušiti plod, što nije bilo predviđeno ovim radom, dok je za ekstrakciju korena bila potrebna veća količina materijala, koja je podrazumevala narušavanje vegetacije samog stabla biljke. Takođe, dosadašnja istraživanja se nisu bavila superkritičnom ekstrakcijom roda *Morus*, što je ukazalo na potrebu primene superkritičnog CO₂ kao ekstragensa. U cilju

dobijanja ekstrakata lista ispitivanih vrsta *Morus* primenjena je superkritična ekstrakcija ugljendioksidom po prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.2.1.2.), na pritisku od 300 bar i temperaturi 40°C, pri protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h i zapreminskoj masi 0,929 g/cm³. Kinetika ekstrakcije je prikazana na slici 41.



Slika 41. Kinetika superkritične ekstrakcije lista dudu

Prinos ekstrakata nakon 17 sati je dat u tabeli 24 i može se videti da je prinos lista crnog dudu (3,46%) nešto veći nego lista belog dudu (2,96%). Poređenjem prinosa ekstrakata (tabele 19 i 24) polarnim (etanolom) i nepolarnim rastvaračem (ugljendioksidom) može se zaključiti da je list dudu bogatiji polarnim komponentama. Polarna jedinjenja su prisutna u listu crnog dudu oko 6 puta više u odnosu na nepolarna, dok u listu belog dudu oko 8 puta više.

Tabela 24. Prinos superkritične ekstrakcije lista dudu

Vrsta dudu	Prinos ekstrakta (%, g/100 g droge)
<i>M. alba</i>	2,963±0,081
<i>M. nigra</i>	3,464±0,074

Dobijeni CO₂ ekstrakti lista dudu su analizirani sa ciljem utvrđivanja sadržaja masnih kiselina i sadržaja ukupnih karotenoida. Ispitivanje delovanja ovih ekstrakata je obuhvatalo i utvrđivanje antioksidativne i citotoksične aktivnosti.

Lipofilne komponente se najčešće ekstrahuju koršćenjem hloroforma, petroletra ili smeše hloroforma i metanola kao ekstragensa. Usled nemogućnosti primene superkritične ekstrakcije kod ploda dudu, a sa ciljem ispitivanja lipidnog sastava ekstrakata, plod dudu je ekstrahovan klasičnom metodom primenom dietiletra kao ekstragensa (poglavlje 3.2.2.8.).

4.4.1. ISPITIVANJE LIPOFILNOG SASTAVA EKSTRAKATA PLODA I LISTA DUDA

4.4.1.1. Sadržaj masnih kiselina primenom GC/FID metode

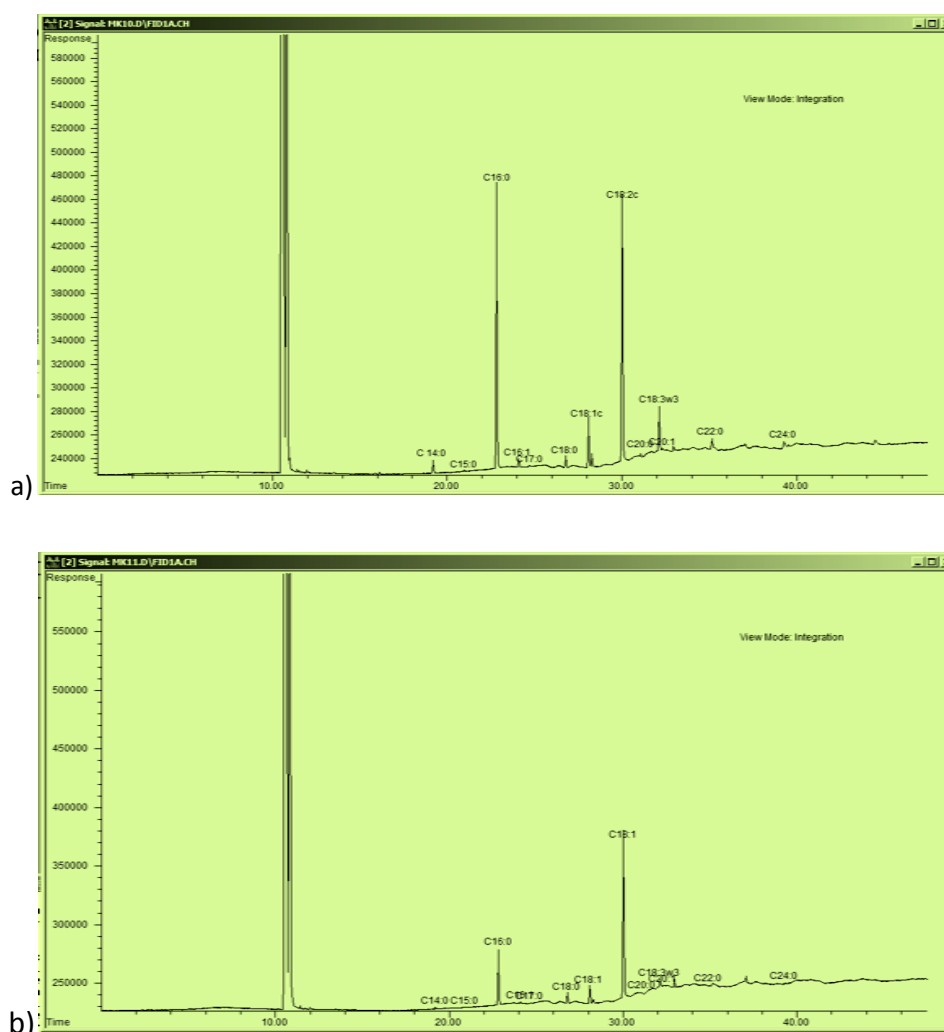
Uprkos postojanju brojnih studija o sekundarnim metabolitima, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, ugljeni hidrati, vitamini i alkaloidi, mali je broj radova koji se odnose na sadržaj masnih kiselina u vrstama *Morus*. Masne kiseline su izolovane iz plodova različitih vrsta duda i ulja semena duda (tabela 4). Ercisli i Orhan (2007) su odredili profil i sadržaj masnih kiselina u nekoliko vrsta duda (*M. alba*, *M. nigra* i *M. rubra*). Utvrđeno je da su najzastupljenije masne kiseline u analiziranim uzorcima bile (C18:2), zatim C16:0, C18:1, C18:0, C19:1 i C14:0. Elmaci i Altrug su 2002. godine objavili studiju o uticaju različitih genotipova crnog duda na lipidni profil ekstrakata ploda, gde je takođe dominantna masna kiselina bila linolna. Slični rezultati su dobijeni i analizom ulja dobijenim iz semena ploda duda (Gecgel i sar., 2011).

U cilju utvrđivanja sastava masnih kiselina u ekstraktima ploda i lista dve vrste roda *Morus*, primenjena je GC/FID metoda (poglavlje 3.2.2.8.). Rezultati kompletne analize ekstrakata su dati u prilogu 4 (tabela 10), a na slikama 42 i 43 su prikazani hromatogrami ispitivanih ekstrakata. U tabeli 25 su dati sadržaji dominantnih masnih kiselina koje su prisutne u ekstraktima duda.

Tabela 25. Sastav i sadržaj masnih kiselina u ekstraktima lista i ploda duda

Jedinjenje	<i>M. alba</i>	<i>M. nigra</i>	<i>M. alba</i>	<i>M. nigra</i>
	list	list	plod	plod
% (g/100 g s.e.)				
Miristinska kiselina (C14:0)	2,36	2,24	0,27	0,53
Pentadekanoinska kiselina (C15:0)	0,88	0,48	1,68	0,09
Palmitinska kiselina (C16:0)	26,38	25,99	37,56	16,77
Palmitoleinska kiselina (C16:1)	0,67	0,33	1,24	0,37
Heptadekanoinska kiselina (C17:0)	2,66	1,93	0,29	0,27
Stearinska kiselina (C18:0)	4,91	5,32	1,73	3,89
Oleinska kiselina (C18:1n9c)	2,86	2,30	7,61	6,91
Linolna kiselina (C18:2n6c)	15,76	16,05	40,52	67,38
Arahidonska kiselina (C20:0)	4,45	4,13	0,34	0,37
Cis-11-Eikozanoenska kiselina (C20:1)	1,08	1,15	0,20	0,15
Linolenska kiselina (C18:3n3)	34,97	37,57	6,32	2,61
Behenska kiselina (C22:0)	2,81	1,90	1,94	0,54
Lignocerinska kiselina (C24:0)	1,22	0,61	0,30	0,12
Zasićene masne kiseline (SFA)	45,67	42,60	44,11	22,78
Nezasićene masne kiseline (UFA; MFA+PFA)	54,33	57,40	55,89	77,42
UFA:SFA odnos	1,19	1,35	1,23	3,40

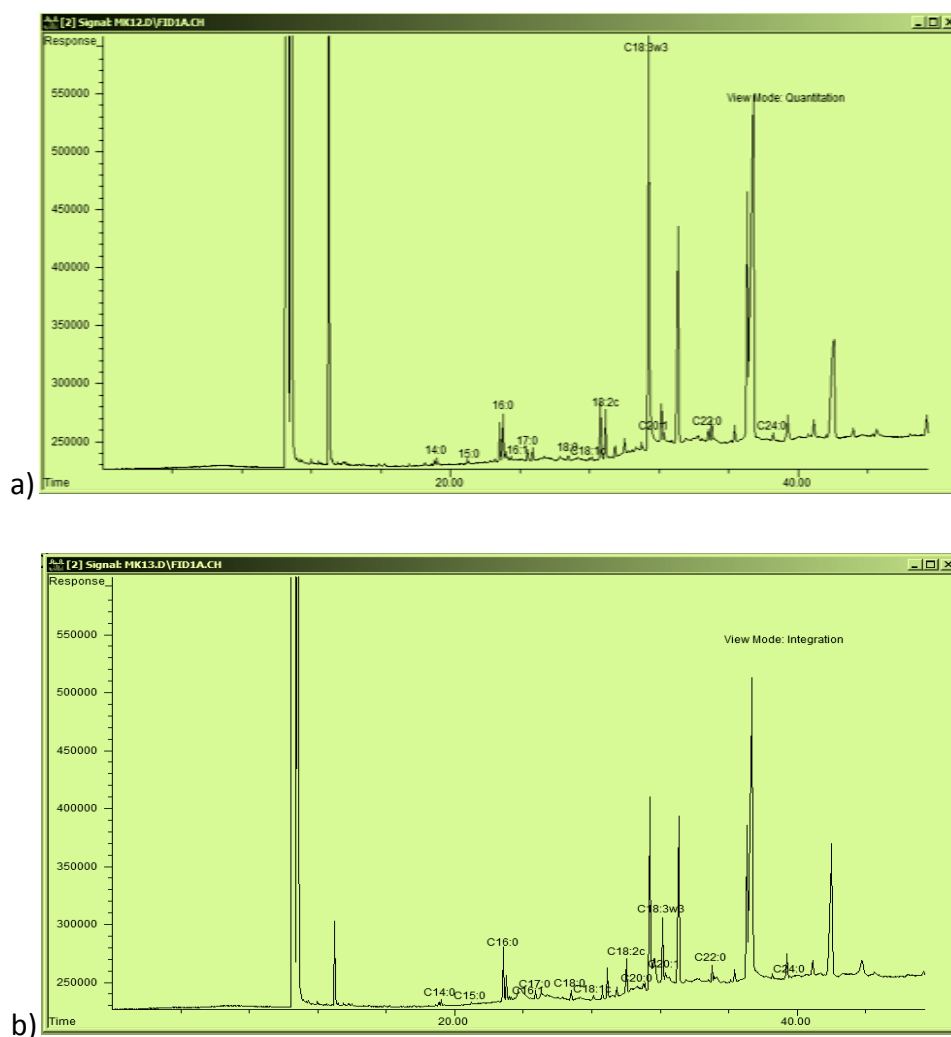
U ispitanim ekstraktima identificirano je 13 masnih kiselina u udelu većem od 0,02%. Dominantna kiselina u ekstraktima ploda ispitanih vrsta *Morus* je linolna kiselina, koja je u ekstraktima prisutna u udelu od 40,52 do 67,38% u odnosu na ukupan sadržaj identifikovanih jedinjenja. Udeo ove kiseline u plodu *M. nigra* (67,38%) je veći od sadržaja koji su u ovoj vrsti dudu detektovali Elmaci i Altug (2002) i Ercisli i Orhan (2008), koji je iznosio 44,43%, odnosno 64%. Po svom udelu druga kiselina koja se izdvaja u ekstraktima ploda je palmitinska kiselina koja je najviše zastupljena u ekstraktu ploda *M. alba* (37,56%). Udeo ove kiseline je mnogo veći od udela koji je određen u istraživanju Gecgel i sar. (2011), 10,46%. Od nezasićenih masnih kiselina (UFA), pored linolne kiseline, u ekstraktima ploda po svom većem sadržaju izdvajaju se stearinska (mononezasićena masna kiselina) i oleinska i linolenska kiselina (polinezasićene masne kiseline). U ekstraktima ploda dudu u udelu većem od 1% detektovane su u ekstraktima *M. alba* pentadekanoinjska, stearinska i behenska kiselina, dok u ekstraktima *M. nigra* samo stearinska kiselina.



Slika 42. GC hromatogrami ekstrakata ploda dudu; a) *M. alba*, b) *M. nigra*

U superkritičnim ekstraktima lista *Morus* (slika 43) dominantna kiselina je polinezasićena linolenska kiselina čiji je sadržaj 34,97% (*M. alba*) i 37,57% (*M. nigra*). Po

svom sadržaju se izdvajaju i linolna i palmitinska kiselina, čiji je sadržaj u oba ekstrakta veći od 15% (tabela 25). U poređenju sa ekstraktom ploda, u ekstraktima lista veća je zastupljenost miristinske, heptadekanoinske, stearinske, arahidonske, cis-11-eikozeinske i behenske kiseline u odnosu na ekstrakte ploda iste vrste. Veća zastupljenost nezasićenih masnih kiselina (veća od 50%) ukazuje na povoljne osobine CO₂ ekstrakata i moguću primenu u vidu fitopreparata.



Slika 43. GC hromatogrami superkričnih ekstrakata lista dudu; a) *M. alba*, b) *M. nigra*

U ispitanim ekstraktima nisu detektovane masne kiseline sa nizom manjim od C10. Odnos UFA i SFA je veći od 1 što ukazuje na pozitivne karakteristike svih ispitanih ekstrakata. Po većem odnosu posebno se izdvaja ekstrakt ploda *M. nigra* (3,40). Na osnovu podataka datih u tabeli može se zaključiti da su ekstrakti ploda i lista belog i crnog dudu bogati nezasićenim masnim kiselinama i to ekstrakt ploda linolnom kiselinom (40,52 i 67,38%), a superkrični ekstrakt lista linolenskom kiselinom (34,97 i 37,57%). Dominantna zasićena masna kiselina u svim ispitanim ekstraktima je palmitinska kiselina (od 16,77 do 37,56%). O sadržaju masnih kiselina u ekstraktima lista *Morus* vrsta nema objavljenih podataka u

literaturi, kao ni o karakteristikama superkritičnih ekstrakata. Dobijeni podaci i pozitivne karakteristike ekstrakata određene u ovom radu mogu biti dobra polazna osnova za formulaciju novih farmaceutskih proizvoda.

4.4.1.2. Sadržaj ukupnih karotenoida

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih karotenoida u superkritičnim ekstraktima lista i dietileterskim ekstraktima ploda dati su u tabeli 26.

Tabela 26. Sadržaj ukupnih karotenoida u ekstraktima lista i ploda duda

Uzorak	Ekstrakt	Ukupni sadržaj karotenoida (mg/g suvog ekstrakta)
<i>M. alba</i>	Dietiletar, plod	21,16±0,09
<i>M. nigra</i>		14,66±0,23
<i>M. alba</i>	Superkritični CO ₂ , list	65,08±0,14
<i>M. nigra</i>		52,84±0,11

Sadržaj karotenoida u ekstraktima se kreće u intervalu od 14,66 do 65,08 mg/g ekstrakta. Iako su primenjeni različiti ekstragensi rezultati ispitivanja ukazuju da je nešto veći sadržaj ukupnih karotenoidnih jedinjenja kod ekstrakata vrste *M. alba*, kako u plodu tako i u listu ove vrste duda. Takođe, veći sadržaj karotenoida je detektovan u ekstraktima listova obe vrste duda dobijenim superkritičnom ekstrakcijom u odnosu na ekstrakte ploda. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u istraživanjima različitih vrsta *Morus* (tabela 4). HPLC analizom je kvalitativno i kvantitativno određen sastav ekstrakata ploda *Morus atropurorea* (Issabelle i sar., 2008) u kojima su se kao dominantni izdvojili lutein i β -karoten, koji čine više od 94% ukupanog sadržaja karotenoida. U istom radu ispitana je povezanost prisutih karotenoida i antioksidativna aktivnost ekstrakata. Prisustvo devet karotenoidnih jedinjenja (Uzakova, 1987) je dokazano u ekstraktu lista duda, od kojih su dominantna pomenuta dva, lutein (22,4%) i β -karoten (41,4%).

4.5. ISPITIVANJE DELOVANJA EKSTRAKATA

4.5.1. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE

Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata određena je primenom testova koji su zasnovani na transferu elektrona (neutralizacija DPPH[•] radikala i određivanje redukcione sposobnosti), neutralizaciji slobodnoradikalske vrste (kapacitet „hvatanja” HO[•] radikala) i potencijalu inhibicije lipidne peroksidacije (poglavlje 2.4.). Takođe, uporedno su ispitane i odgovarajuće aktivnosti potentnih, sintetičkih antioksidanasa BHT (E320), BHA (E321) i askorbinske kiseline (E300), koji se vrlo često koriste kao aditivi, kako u hrani, tako i u

farmaceutskim, kozmetičkim i raznim drugim industrijskim proizvodima. U tabeli 27 su prikazani rezultati određivanja antioksidativnog delovanja ekstrakata roda *Morus*.

Tabela 27. Antioksidativni potencijal ekstrakata roda *Morus*

Uzorak	Ekstrakt	DPPH [•] IC ₅₀ (mg/ml)	Reducing power EC ₅₀ (mg/ml)	OH [•] IC ₅₀ (mg/ml)	AOA IC ₅₀ (mg/ml)
<i>M. alba</i>	Etanolni, plod	0,1469±0,0087	0,337±0,092	0,253±0,016	1,762±0,053
<i>M. nigra</i>		0,0650±0,0104	0,276±0,088	0,597±0,094	1,684±0,078
<i>M. alba</i>	Etanolni, list	0,0120±0,0055	0,076±0,001	0,164±0,011	0,976±0,121
<i>M. nigra</i>		0,0055±0,0012	0,014±0,067	0,159±0,089	0,324±0,105
<i>M. alba</i>	Etanolni, koren	0,0274±0,0038	0,137±0,038	0,322±0,023	1,281±0,061
<i>M. nigra</i>		0,0153±0,0009	0,249±0,014	0,658±0,014	1,007±0,100
<i>M. alba</i>	Superkritični CO ₂ , list	0,3087±0,0022	-	-	2,059±0,074
<i>M. nigra</i>		0,2461±0,0034	-	-	1,536±0,058
<i>M. alba</i>	Etanolni, list*	0,0118±0,0065	0,087±0,001	0,163±0,009	2,998±0,401
<i>M. nigra</i>		0,0059±0,0003	0,025±0,033	0,160±0,015	2,426±0,097
	BHT	0,0134±0,0006	-	0,149±0,008	0,057±0,021
	BHA	0,0087±0,0012	-	0,317±0,022	-
	Askorbinska kiselina	-	0,007±0,001	-	-

*uzorak lista nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂

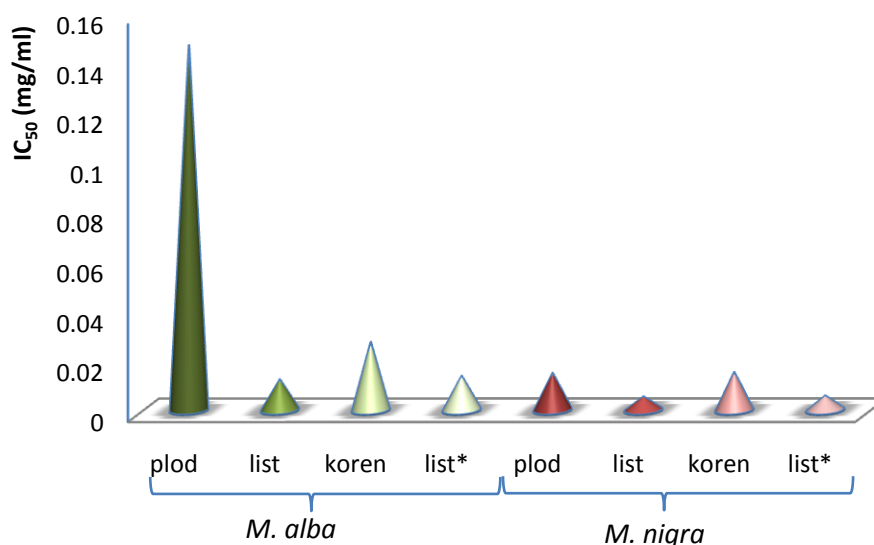
DPPH metod

Slobodni DPPH[•] radikali se najčešće upotrebljavaju u antioksidativnim testovima za određivanje sposobnosti prirodnih sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima da predaju vodonikov atom slobodnim radikalima. Ovaj mehanizam predstavlja najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite (DPPH[•] + Antioksidans → DPPH-H + Antiooksidans[•]). Zbog nesparenog elektrona DPPH[•] apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra, na talasnoj dužini 517 nm (ljubičasta boja). Kada se ovaj elektron spari u prisustvu antioksidansa, apsorbanca na ovoj talasnoj dužini opada (Goupy i sar., 2003). Određivanje kapaciteta neutralizacije DPPH[•] radikala je metoda koja je široko prihvaćena i primenjivana zbog komercijalne dostupnosti DPPH reagensa, tačnosti i brzine metode. Na slici 44 prikazane su IC₅₀ vrednosti delovanja ekstrakata dudu na neutralizaciju DPPH[•]. IC₅₀ vrednosti ispitanih ekstrakata (tabela 27) iznose od 0,0055 (*M. nigra*, list) do 0,3087 mg/ml (*M. alba*, list CO₂) i ukazuju na to da ispitivani ekstrakti imaju značajnu sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala. Na osnovu IC₅₀ vrednosti evidentno je da ekstrakt lista *M. nigra* pokazuje veću antiradikalnu aktivnost čak i od komercijalno korišćenih BHT i BHA.

Redosled antiradikalne aktivnosti etanolnih ekstrakata dudu na DPPH[•] je: *M. nigra*, list > *M. alba*, list > *M. nigra*, koren > *M. alba*, koren > *M. nigra*, plod > *M. alba*, plod, iz čega se zaključuje da najveću aktivnost pokazuje ekstrakt lista dudu, a najmanju ekstrakt ploda, bez obzira na ispitivanu vrstu dudu. Poređenjem ekstrakata u odnosu na vrstu, *M. nigra* ima veći kapacitet neutralizacije DPPH[•] radikala u odnosu na *M. alba*. Iz rezultata antioksidativne

aktivnosti ekstrakata lista dobijenog od droge koja je predhodno ekstrahovana superkritičnim CO₂ može se videti da sam proces superkritične ekstrakcije nije bitno uticao na antioksidativnu aktivnost (IC₅₀ vrednost je praktično ista: 0,0055 odnosno, 0,0059 mg/ml). Superkritični ekstrakti lista imaju znatno nižu aktivnost u odnosu na etanolne ekstrakte, što je i razumljivo shodno predhodno određenom hemijskom sastavu ekstrakata. Takođe, i u slučaju superkritičnih ekstrakata, ekstrakt lista *M. nigra* ima veću aktivnost u odnosu na ekstrakt lista *M. alba*, što je u skladu sa sadržajem karotenoida i detektovanih masnih kiselina.

Poređenje rezultata ispitivanja ekstrakata roda *Morus* sa drugih lokaliteta i rezultata dobijenih u ovom radu omogućeno je širokom primenom DPPH metode. U ispitivanju antioksidativnog delovanja etanolnog ekstrakta ploda *M. alba* sa područja Koreje (Bae i Suh, 2007), utvrđeno je da se RSC vrednost od oko 60% postiže pri koncentraciji od 200 µg/ml. Koncentracija metanolnog ekstrakta lista *M. indica* potrebna da se inhibira 50% DPPH radikala je 0,079 mg/ml (Arabshahi i Urooj, 2007), što je nešto veća vrednost u odnosu na naše ispitivane uzorke. Chang i saradnici (2011) koristeći DPPH test su ispitivali antioksidativno dejstvo etanolnih ekstrakata kore i korena *M. alba*. Utvrđeno je da ovi ekstrakti pri koncentraciji od 0,010 mg/ml dostižu RSC vrednosti od 86% (kora) i 37% (koren).

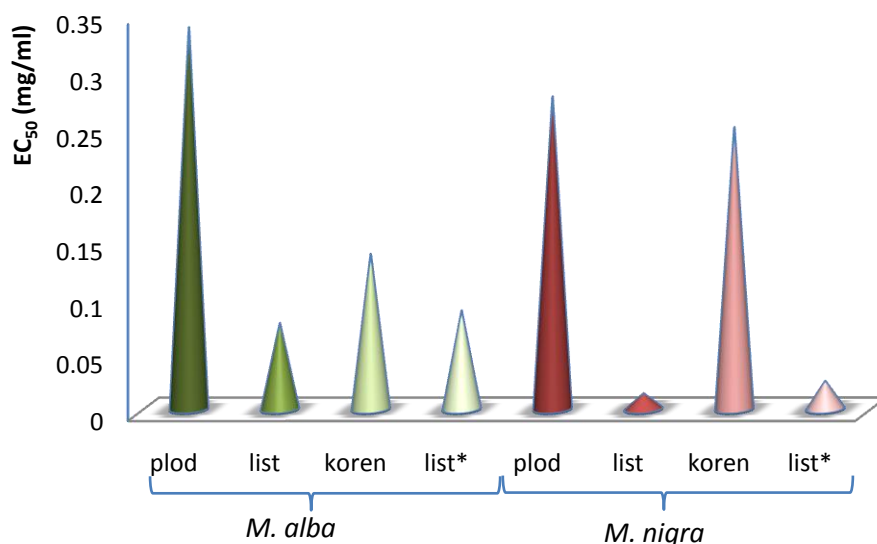


Slika 44. Potencijal neutralizacije DPPH[•] radikala etanolnih ekstrakata roda *Morus*

Ranija istraživanja su pokazala i da mehanizam reakcije antioksidanasa i DPPH[•] zavisi od strukture antioksidanasa (Bondet i sar., 1997). Na antiradikalnu aktivnost fenolnih jedinjenja uticaj ima broj i položaj hidroksilnih grupa (Cotelle, 2001; Heim i sar., 2002; Amić i sar., 2003). Kafena kiselina, prisutna fenolna kiselina u ekstraktima duda, ispoljava veću antiradikalnu aktivnost na DPPH[•] u poređenju sa, npr., ferulnom i *p*-kumarinskom kiselinom, obzirom na njihovu strukturu, koja omogućava bolju stabilizaciju fenoksil radikala (Tumbas i sar., 2012).

Reduktivna sposobnost

Reduktivna sposobnost (*Reducing power*) neke komponente može da posluži kao značajan indikator njegove potencijalne antioksidativne aktivnosti (Meir i sar., 1995). Merenje reduktivne sposobnosti se zasniva na praćenju i ispitivanju transformacije $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ u prisustvu ekstrakata primenom metode po Oyaizu (1986). Veća apsorbanca ukazuje na veću reduktivnu sposobnost. U ovoj metodi žuta boja test rastvora menja se u različite nijanse zelene ili plave, u zavisnosti od redukcione moći prisutnih komponenata u ispitivanom uzorku. U prisustvu reduktanata (antioksidativnih komponenata) dolazi do redukcije Fe^{3+} ferrijanidnog kompleksa u Fe^{2+} formu, a ova transformacija se prati na talasnoj dužini 700 nm merenjem formacije Perlovog prusijanskog plavog (Fereira i sar., 2007).



Slika 45. Redukcioni potencijal etanolnih ekstrakata roda *Morus*

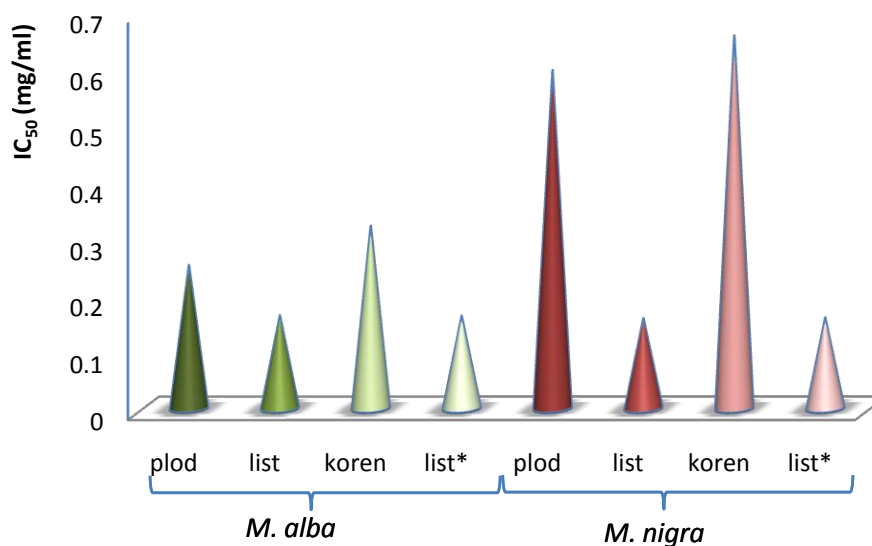
Reduktivna sposobnost ekstrakata dudu (slika 45), na osnovu dobijenih EC₅₀ vrednosti (tabela 27), opada u sledećem nizu: *M. nigra*, list > *M. alba*, list > *M. alba*, koren > *M. nigra*, koren > *M. nigra*, plod > *M. alba*, plod, što je skoro isti redosled određen primenom DPPH metode. Reduktivna sposobnost svih ispitivanih ekstrakata roda *Morus* je mnogo manja u odnosu na reduktivnu sposobnost askorbinske kiseline. Na osnovu rezultata ispitivanja, kao ekstrakt sa najvećom reduktivnom sposobnošću može se izdvojiti ekstrakt lista *M. nigra*, kao i kod DPPH metode. Najmanju reduktivnu sposobnost su pokazali ekstrakti ploda obe ispitane vrste.

Bae i Suh (2007) su ispitali reduktivnu sposobnost pet ekstrakata ploda različitih kultivara *Morus alba* i utvrdili da reduktivna sposobnost ovih ekstrakata pri koncentraciji od 0,4 mg/ml odgovara apsorbancom od 0,621 do 1,2. Chang i saradnici (2011) koji su ispitivali antioksidativnu sposobnost ekstrakata kore i korena dudu su upoređivali reduktivnu sposobnost ekstrakata i flavonoida prisutnih u ovim ekstraktima. Flavonoidi koji su se izdvojili po svojoj reduktivnoj sposobnosti su maklurin i morin, dok su ekstrakti kore i

korena ove vrste dudu (*M. indica*) pokazali 3 do 6 puta manju reduktivnu sposobnost u odnosu na standard, askorbinsku kiselinu.

Neutralizacija OH[•] radikala

Kapacitet „hvatanja“ hidrosil radikala ispitivanih ekstrakata prikazan je na slici 46. Najveći potencijal pokazao je ekstrakt lista *M. nigra* (tabela 27), dostižući IC₅₀ vrednost pri koncentraciji od 0,159 mg/ml, dok je najmanju izmerenu aktivnost ispoljio ekstrakt korena *M. nigra* (0,658 mg/ml). U poređenju sa BHT (IC₅₀= 0,149 mg/ml), ni jedan ekstrakt nije pokazao bolju aktivnost, dok su bolji potencijal od BHA (IC₅₀= 0,317 mg/ml) ispoljili ekstrakti lista i crnog i belog dudu i ploda belog dudu. Može se uočiti da ekstrakti ploda obe ispitane vrste imaju bolju aktivnost u poređenju sa ekstraktima korena, što je razlika u poređenju sa rezultatima dobijenim primenom ostalih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti. Ovakvi rezultati mogu biti posledica aktivnosti drugih klasa jedinjenja prisutnih u ovim vrstama, kao i osetljivosti same metode (uticaj svetlosti, temperature). Takođe, TBA metoda korišćena za detekciju MDA, nije specifična ni dovoljno osetljiva za ova jedinjenja, jer i druga, strukturno slična jedinjenja, uglavnom dialdehidi i ugljeni hidrati, čije prisustvo je često u biljnim vrstama, takođe mogu da reaguju sa TBA (Gazzani i sar., 1998; Arabashahi-Delouee i Urooj, 2007; Lesjak, 2011).

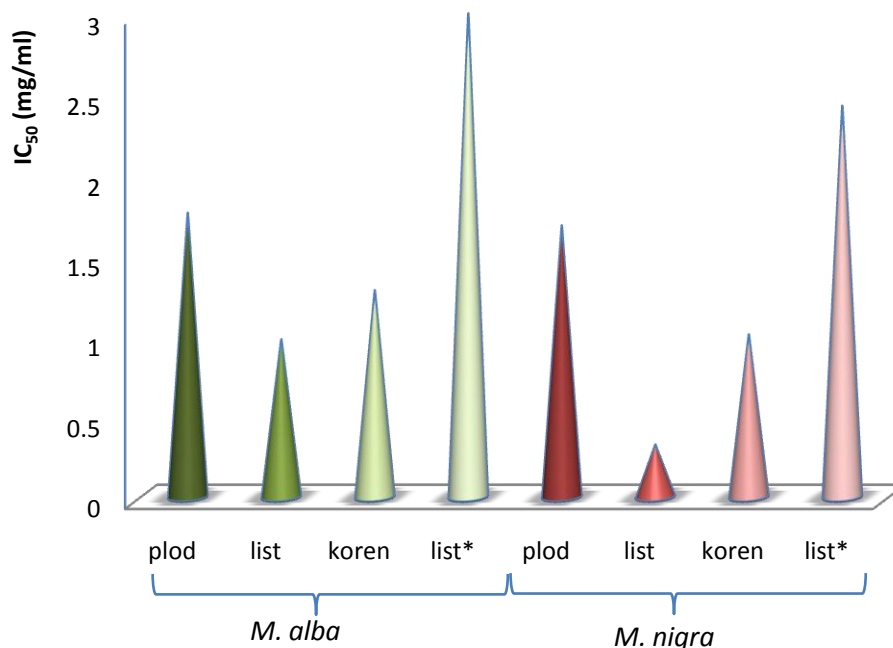


Slika 46. Potencijal neutralizacije OH[•] radikala etanolnih ekstrakata roda *Morus*

Lipidni model sistem

Antioksidativna aktivnost u lipidnom model sistemu (AOA) ekstrakata dudu određena je na osnovu oksidativne degradacije β-karotena u emulziji β-karoten-linolna kiselina. Do oksidacije β-karotena dolazi tokom slobodnoradikalne reakcije sa radikalima

karakterističnim za oksidaciju lipida, prilikom čega β -karoten gubi dvostruke veze. Dodatkom antioksidansa u sistem sprečava se apstrakcija vodonika iz dialilnih metilenskih grupa linolne kiseline, čime se indirektno sprečava oksidacija β -karotena (Kennedy i Lieber, 1991; Tsuchihashi i sar., 1995; Tadaka i sar., 2006). Na slici 47 grafički su prikazane IC_{50} vrednosti etanolnih ekstrakata duda, dobijene iz jednačine linearne regresije, na osnovu rezultata spektrofotometrijskog određivanja (poglavlje 3.2.3.1.4.)



Slika 47. Potencijal inhibicije lipidne peroksidacije etanolnih ekstrakata roda *Morus*

Poređenjem dobijenih IC_{50} vrednosti za AOA ekstrakata duda uočava se neznatna razlika među uzorcima, što može upućivati na činjenicu da su jedinjenja, koja su odgovorna za inhibiranje oksidacije lipida, slične strukture. U poređenju sa standardnim sintetičkim antioksidansom (BHT) svi ekstrakti su ispoljili znatno manju antioksidativnu aktivnost. Najveću aktivnost u lipidnom model sistemu ispoljio je ekstrakt lista *M. nigra* ($IC_{50} = 0,324$ mg/ml), dok je najmanju ispoljio ekstrakt ploda *M. alba* ($IC_{50} = 1,762$ mg/ml). Ekstrakti lista duda dobijeni superkričnom ekstrakcijom su pokazali određenu antioksidativnu aktivnost i u lipidnom sistemu. Za nivo inhibicije oksidacije lipida, kao i kod DPPH metode, najverovatnije su zaslužni sadržaj karotena i masnih kiselina sadržanih u ekstraktima duda (poglavlje 2.2.). Poređenjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata lista dobijenog od droge nakon superkrične ekstrakcije ugljendioksidom u odnosu na nativnu drogu može se videti uticaj samog procesa superkrične ekstrakcije. Specifični mehanizmi reakcije i uslovi pomenutih metoda najverovatnije utiču na dobijene rezultate.

Prisustvo fenolnih kiselina u ekstraktima lista i korena, uključujući kafenu i hlorogensku kiselinu, ima uticaja na ostvarene AOA vrednosti u lipidnom model sistemu (Butt i sar., 2008; Bidel i sar. 2007; Memon i sar., 2010), dok prisustvo antocijana i drugih flavonoida u ekstraktima ploda najverovatnije utiče na antoksidativnu aktivnost ekstrakata

(Hassimotto i sar. (2006). Masne kiseline, identifikovane u superkričnim ekstraktima (tabela 25) mogu, takođe, biti odgovorne za dobijene AOA vrednosti u ovom radu.

Uzimajući u obzir sve dobijene rezultate, može se zaključiti da ispitani ekstrakti *M. alba* i *M. nigra* poseduju značajnu antioksidativnu aktivnost u svim izvedenim testovima. Ekstrakti lista *M. nigra* pokazali su veći antioksidativni potencijal u odnosu na sve ostale ekstrakte. Najmanji antioksidativni potencijal su pokazali ekstrakti ploda obe ispitane vrste. Ekstrakti vrste *M. nigra* imaju veću aktivnost u odnosu na ekstrakte vrste *M. alba*, što je u saglasnosti sa prisutnim i identifikovanim polifenolnim jedinjenjima (tabela 21).

4.5.2. CITITOKSIČNO DELOVANJE

MTT test

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata različitih delova biljaka *M. alba* i *M. nigra* ispitana je u *in vitro* uslovima na Hep2c, RD i L2OB ćelije, u opsegu koncentracija od 5 do 1.000 µg/ml. Različiti ekstrakti ploda, lista i korena obe vrste dudu uticale su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od humane linije ćelija i primenjene koncentracije.

Citotoksični efekat je izražen kao IC₅₀ vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta), a kao kontrola u metodi su korišćene nestimulisane ćelije, odnosno ćelije u kulturi čiji je rast 100%. Sumarni rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti različitih ekstrakata dudu dati su u tabeli 28.

Tabela 28. IC₅₀ vrednosti citotoksične aktivnosti ispitivanih ekstrakata na ćelijske linije

Uzorak	Ekstragens, ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)		
		Hep2c ćelije	RD ćelije	L2OB ćelije
<i>M. alba</i>	Etanol, plod	90,95±1,25	30,67±0,76	50,45±0,55
<i>M. nigra</i>		300,34±10,59	850,47±0,25	350,84±0,90
<i>M. alba</i>	Etanol, list	29,00±0,37	42,00±0,44	25,00±0,31
<i>M. nigra</i>		9,34±0,59	15,57±0,75	12,54±0,20
<i>M. alba</i>	Etanol, koren	225,20±2,88	650,35±1,35	150,45±0,76
<i>M. nigra</i>		850,57±0,40	250,54±1,20	250,54±0,20
<i>M. alba</i>	Superkrični CO ₂ , list	56,00±2,27	350±3,25	50,00±1,20
<i>M. nigra</i>		25,80±2,88	26,90±0,25	30,45±0,70
<i>M. alba</i>	Etanol, list*	30,00±1,59	45,00±0,25	28,00±0,25
<i>M. nigra</i>		10,90±1,25	15,80 1,25	13,20±0,25

*uzorak lista nakon ekstrakcije superkričnim CO₂

Ispitivani ekstrakti su pokazali izuzetnu aktivnost na primenjene ćelijske linije, sedam ekstrakata od ispitanih deset je pokazalo citotoksičnu aktivnost u koncentracijama manjim od 100 mg/ml. Ovakvi rezultati upućuju na značaj dobijenih rezultata i moguću široku aplikaciju ispitivanih ekstrakata u vidu farmaceutskih proizvoda. Ekstrakti lista *M. nigra* se na

sve tri ćelijske linije pokazao kao najpotentniji inhibitor rasta ćelija. U sva tri slučaja ovaj ekstrakt u koncentracijama od 16 µg/ml i nižim za 50% smanjuje preživljavanje tumorskih ćelija, pri čemu su Hep2c bile najosetljivije. Mikroskopska analiza je pokazala da etanolni ekstrakt lista *M. nigra* ima izrazito citolitičko dejstvo na sve tri ćelijske linije. Prema *American National Cancer Institute (NCI)*, kriterijum za citotoksičnu aktivnost ekstrakata je $IC_{50} < 30$ µg/ml (Itharat i sar., 2004), što zadovoljavaju etanolni ekstrakti obe vrste *Morus* za sve tri ćelijske linije.

Kod ispitivanih ćelijskih linija RD i L2OB inhibitorni efekat etanolnog ekstrakta ploda *M. nigra* je bio najniži, dok je kod Hep2c ćelijske linije najniži efekat pokazao etanolni ekstrakt korena *M. nigra*. Slabo stimulatívni efekat je uočen kod RD ćelijske linije delovanjem etanolnog ekstrakta korena *M. alba* pri koncentraciji većoj od 650 µg/ml i delovanjem superkritičnog ekstrakta lista *M. alba* pri koncentraciji većoj od 350 µg/ml. Na etanolne ekstrakte ploda i korena *M. nigra* i korena *M. alba* značajniji inhibitorni efekat na rast/preživljavanje testiranih ćelija uočen je samo pri upotrebi većih koncentracija (od 150 µg/ml do 850 µg/ml).

Etanolni ekstrakti ploda obe vrste roda *Morus* pokazuju međusobno najveću razliku u citotoksičnoj aktivnosti. Najizraženija razlika je u osetljivosti RD ćelija na ispitivane ekstrakte ploda duda, ekstrakt ploda *M. alba* je i do 28 puta efikasniji od ekstrakta ploda *M. nigra* u pogledu citotoksičnosti. Kod iste ćelijske linije razlika među ekstraktima dobijenim od dve različite vrste uočava se i kod superkritičnih ekstrakata lista duda. U ovom slučaju ekstrakt dobijen superkritičnom ekstrakcijom lista *M. nigra* je do 10 puta efikasniji od ekstrakta lista *M. alba*. Na ekstrakt korena ispitivanih vrsta najviše su bile osetljive L2OB ćelijske linije kod kojih ekstrakt u koncentraciji od 150 µg/ml (*M. alba*), odnosno 250 µg/ml (*M. nigra*), dovodi do inhibicije rasta od 50%.

Rezultati dati u tabeli 28 pokazuju da i superkritični ekstrakti lista ispitivanih vrsta zadovoljavaju ovaj kriterijum, izuzev pomenute ćelijske linije RD i CO₂ ekstrakta *M. alba*. Poređenjem superkritičnih i etanolnih ekstrakata istih vrsta može se uočiti mala razlika u inhibitornom efektu na rast/preživljavanje testiranih ćelija. Ova činjenica je bitna jer dokazuje da su i polarne i nepolarne komponente prisutne u ispitivanom materijalu odgovorne za izrazitu citotoksičnu aktivnost ekstrakata. Po sadržaju detektovanih sekundarnih metabolita izdvaja se list crnog duda (*M. nigra*), koji ujedno ima i najniže IC_{50} vrednosti, zbog čega se može pretpostaviti da su identifikovana jedinjenja zaslužna za citotoksičnu aktivnost. Nakon HPLC i GC analiza, kao i antioksidativnih testova, moguće je pretpostaviti da ekstrakti koji sadrže izrazite antioksidanse (polifenole, karotene, masne kiseline) mogu uticati na redoks stanje ćelija i na taj način dovesti do smanjenja ćelijske proliferacije. Polifenolna jedinjenja su snažni antioksidansi sa potencijalom da sprečavaju oksidativna oštećenja izazvana reaktivnim kiseoničnim vrstama i na taj način štite organizam od kancera i kardiovaskularnih oboljenja (Vinson i sar., 1995; Gamez i sar., 1998; Pietta, 2000; Ioku i sar., 2001). Ipak, teško je odrediti i utvrditi doprinos pojedinačnih komponenti na ukupan antikancerogeni efekat. Aktivnost ekstrakta često može biti rezultat sinergističkog dejstva različitih jedinjenja. Martens-Talcott i saradnici (2003) zabeležili su

povećanje apoptoze i inhibiciju ćelijske proliferacije kod humanih leukemičkih ćelija nakon njihovog tretiranja smešom kvercetina i elaginske kiseline, u poređenju sa uticajem pojedinačnih jedinjenja.

Upoređivanjem IC_{50} vrednosti ekstrakata lista duda dobijenih ekstrakcijom etanolom odmah i nakon superkritične ekstrakcije može se zaključiti da ne postoji velika razlika u citotoksičnoj aktivnosti ekstrakata. Na osnovu iznetih rezultata moguće je maksimalno iskorišćenje sirovine i upotreba ekstrakata dobijenih i polarnim i nepolarnim rastvaračem u zavisnosti od sistema u kome će se ekstrakti primenjivati. Rezultati koji su prikazani u tabeli 28 jasno ukazuju na inhibitorno dejstvo komponenata prisutnih u ekstraktima duda na proliferaciju ćelijskih linija Hep2c, RD i L2OB u *in vitro* uslovima i široke mogućnosti upotrebe ispitivanih ekstrakata u lečenju humanog organizma.

4.5.3. TOKSIČNO I GENOTOKSIČNO DELOVANJE

Allium anafazno-telofazni test

U cilju maksimalnog smanjenja rizika od primene prirodnih preparata (npr. prirodnih antioksidanasa) kao novih oblika konzervanasa, neophodno je poznavati njihovu potencijalnu toksičnost i genotoksičnost.

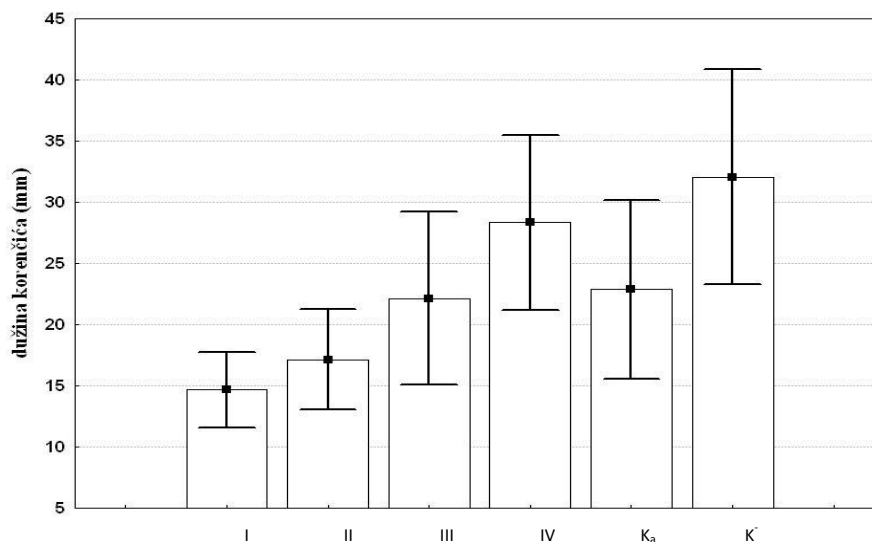
Uzorcima ekstrakata lista i ploda ispitivanih vrsta *Morus* (dobijenih po predhodno opisanoj proceduri poglavlje 3.2.1.1.) je utvrđena potencijalna toksičnost i genotoksičnost *Allium* anafazno-telofaznim testom. Na slici 48 prikazani su korenčići luka nakon 72 časa rasta u uzorku.



Slika 48. Korenčići luka nakon 72 časa rasta u uzorku

Ceo postupak testa sastoji se iz dva dela. U prvom delu utvrđena je opšta toksičnost. *Allium* anafazno-telofazni test je osetljiv za merenje ukupne toksičnosti hemijskih tretmana, a toksičnost je izražena kroz inhibiciju rasta korenčića. U drugom delu je analizirana genotoksičnost različitih koncentracija ekstrakata (125, 62,5, 31,5 i 15,75 mg/ml).

Stepen toksičnosti ispitivanih uzoraka je ocenjen na osnovu srednje dužine rasta korena koji je izražen kao procenat dužine korena u odnosu na negativnu kontrolu. Kod svih ispitivanih uzoraka inhibicija rasta korenčića u odnosu na negativnu kontrolu primećena je u uzorcima najveće koncentracije (I) a najmanja je pri najnižoj koncentraciji (IV), što je prikazano na slici 48.



Slika 48. Prosečna dužina korenčića u ispitivanim uzorcima ekstrakta lista *M. nigra*

Ova inhibicija je prouzrokovana prisustvom alkohola u rastvoru. Zato se koncentracija od 62,5 mg/ml (ili niža) može smatrati bezbednom koncentracijom u pogledu produkovanja toksičnih efekata. Takođe, rastvaranje u alkoholu može pojačati toksična svojstva u određenoj koncentraciji, pa je neophodno da koncentracija alkohola u rastvoru bude što je moguće manja.

Rezultati ispitivanja genotoksičnih efekata ispitivanih ekstrakata prikazani su u tabeli 28. Relativni ukupni broj aberacija je bio najveći kod uzoraka ploda *M. alba*, kod prve tri koncentracije (>11%), a najmanji kod uzoraka lista *M. alba* (4,54%, za III koncentraciju). Sve u svemu, najčešće promene su ćelije sa multipolarnim vretenom, sa zaostalim hromozomima, dok su ređi mostovi. Fragmenti i c-mitoze su pronađeni u manje od 4% ćelija. U analizi su detektovana dva tipa aberacija. Prvi tip je rezultat poremećaja deobnog vretena i obuhvata zaostale hromozome, multipolarne konfiguracije i c-mitozu, dok je drugi tip nastao delovanjem na hromozome i uključuje mostove i fragmente. Oba tipa se u nekim ćelijama javljaju istovremeno. U aberatnim ćelijama je mnogo učestalija prva grupa aberacija, što ukazuje da testirani uzorci pretežno deluju na taj način što narušavaju deobna vretena.

Tabela 28. Broj različitih tipova aberacija u ćelijama vrha korena luka izloženih delovanju ekstrakta *Morus* u različitim koncentracijama

Ekstrakt	Uzorak	BR	FR	MP	Vcx	Cm	MA	Ukupan broj analiziranih ćelija	Nenormalne ćelije (%)
<i>M. alba</i> Plod	I-125 mg/ml	15	3	-	21	-	3	554	11,3
	II-62,5 mg/ml	21	-	11	18	-	10	607	11,4
	III-31,5 mg/ml	17	-	17	18	-	7	584	11,5
	IV-15,75 mg/ml	9	-	21	11	-	10	572	8,9
	K ⁻	16	-	9	4	-	-	554	7,3
	K _a	5	-	15	13	1	2	565	4,6
	K ⁺	25	3	18	22	3	40	522	21,3
<i>M. nigra</i> Plod	I-125 mg/ml	5	3	25	10	4	9	644	9,8
	II-62,5 mg/ml	3	2	23	26	-	7	578	10,4
	III-31,5 mg/ml	10	1	22	25	-	3	589	7,7
	IV-15,75 mg/ml	5	3	15	9	-	2	523	4,8
	K ⁻	3	-	7	9	-	3	623	3,1
	K _a	6	-	21	12	1	2	563	6,1
	K ⁺	28	-	13	13	9	34	534	25,8
<i>M. alba</i> List	I-125 mg/ml	6	-	13	7	-	1	543	5,66
	II-62,5 mg/ml	7	-	11	4	2	2	523	5,45
	III-31,5 mg/ml	9	-	11	11	-	3	534	4,54
	IV-15,75 mg/ml	11	2	11	7	-	5	523	7,23
	K ⁻	14	-	6	6	-	3	565	4,89
	K _a	6	-	23	10	-	2	559	7,3
	K ⁺	23	4	12	23	5	51	523	22,25
<i>M. nigra</i> List	I-125 mg/ml	5	1	13	10	1	2	575	6,3
	II-62,5 mg/ml	4	1	12	9	-	-	566	5,23
	III-31,5 mg/ml	6	-	11	11	-	4	557	5,98
	IV-15,75 mg/ml	11	-	11	9	-	7	598	6,98
	K ⁻	14	-	9	7	-	3	545	6,29
	K _a	8	-	23	10	-	-	578	7,8
	K ⁺	24	4	13	23	4	49	529	22,9

K⁻ - negativna kontrola, K_a - kontrola rastvarača, K⁺ - pozitivna kontrola, BR - mostovi, FR - fragmenti, MP - multipolarnost, Vcx - lutajući hromozomi, Cm - c mitozni, MA - ćelija sa više aberacija

Generalno posmatrajući, ispitani ekstrakti lista i ploda vrste *Morus* ne pokazuju povećane genotoksične efekte, što daje novu mogućnost korišćenja ovih ekstrakata. U koncentracijama većim od 31,5 mg/ml treba biti obazriv da bi se izbegli eventualni neželjeni efekti. Na osnovu svih iznetih rezultata i ispitivanja potencijalne toksičnosti i genotoksičnosti može se zaključiti da ispitani ploda i lista *M. alba* i *M. nigra* u svim ispitanim koncentracijama ne proizvode genotoksične efekte. Zapaženi toksični efekti jednim delom su rezultat prisustva alkohola kao rastvarača, ali i toksičnih efekata kod najveće koncentracije (125 mg/ml). Radi potpune bezbednosti preporučuju se koncentracije ekstrakata do 31,5 mg/ml za dalju primenu.

Ukupni biopotencijal ispitivanih ekstrakata vrsta *Morus*, određen na osnovu hemijskog sastava, antioksidativne, citotoksične, toksične i genotoksične aktivnosti, opada u nizu list, plod, koren. Vrsta *M. nigra* je pokazala bolje potencijale u odnosu na *M. alba* vrstu. Koren koji je jedini neregenerativni deo biljke nije pokazao opravdanost za korišćenje i buduća biološka i farmakološka ispitivanja, dok su list i plod pokazali visok potencijal i dobru osnovu za dalja ispitivanja. List *M. nigra* sa prostora Vojvodine se pokazao kao izuzetan resurs za razvijanje novih fitopreparata, dijetetskih suplemenata, odnosno dodataka u ishrani i kao izvor biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja.

5. ZAKLJUČCI



U okviru ove doktorske teze izvršena su ispitivanja ekstrakcije, hemijskog sastava, delovanja i moguće primene ekstrakata ploda, lista i korena dve vrste dudu, belog dudu (*Morus alba* L.) i crnog dudu (*Morus nigra* L.) sa lokaliteta Vojvodine (Srbija). Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Optimalni uslovi ekstrakcije etanolom kao ekstragenskom za list *M. alba* su koncentracija etanola 69,84%, temperatura 61,6°C i odnos rastvarač:droga 21,08 ml/g, za list *M. nigra*, koncentracija etanola 69,46%, temperatura 59,92°C i odnos rastvarač:droga 20,73 ml/g, za plod *M. alba* koncentracija etanola 62,24%, temperatura 63,21°C i vreme 46,53 minuta i za plod *M. nigra* koncentracija etanola 68,62%, temperatura 61,27°C i vreme 48,03 minuta.

2. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je kod ekstrakta korena *M. nigra* (186 mg EHK/g), flavonoida kod ekstrakta lista *M. nigra* (67 mg ER/g), a antocijana i monomera antocijama kod ekstrakta ploda *M. nigra* (2,97 i 1,32 mg C3G/g). Veći sadržaj svih određivanih jedinjenja nezavisno od dela biljke su pokazali ekstrakti vrste *M. nigra*.

3. HPLC analizom je utvrđen kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima belog i crnog dudu. Po većem sadržaju detektovanih polifenolnih komponenti izdvajaju se ekstrakti lista (30 i 137 mg/g ekstrakta), zatim ekstrakti korena (58 i 107 mg/g ekstrakta) i na kraju ekstrakti ploda ispitivanih vrsta *Morus* (0,31 i 1,98 mg/g ekstrakta), koji su i najsiromašniji pomenutim jedinjenjima.

4. U ekstraktima lista po svom sadržaju u odnosu na ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja, ističe se kafena kiselina 53,34% za *M. alba* i 62,11% za *M. nigra*, dok se u ekstraktima korena izdvaja hlorogenska kiselina (udeo veći od 74%). U ekstraktima ploda obe vrste dudu utvrđeno je prisustvo manjeg broja ispitivanih komponenata.

5. Poređenjem rezultata dobijenih HPLC analizom ekstrakata lista belog i crnog dudu nakon superkritične ekstrakcije uočena je izvesna razlika u njihovom kvantitativnom sastavu. Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja je manji za *M. alba* 10,82%, a za *M. nigra* 17,03% u odnosu na sadržaj u ekstraktima nativne droge.

6. Sadržaj glukoze (oko 49%) i fruktoze (oko 50%), određen HPLC analizom, u ispitivanim uzorcima ekstrakata ploda je mnogo veći u odnosu na sadržaj saharoze (oko 0,3%).

7. U pogledu mineralnog sastava ekstrakata relativno veliki sadržaj Ca i Mg je karakterističan za list obe vrste dudu (>1.400 µg/g suvog ekstrakta), dok je Na manje zastupljen makroelement u svim ispitanim ekstraktima. Ekstrakt lista crnog dudu se izdvaja po većem sadržaju Mg (1.942 µg/g) i Ca (1.548 µg/g), dok se ekstrakt korena crnog dudu

izdvaja po većem sadržaju Na (440 µg/g) u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte. Najzastupljeniji mikroelementi u svim ispitanim uzorcima duda, po opadajućem nivou, su Fe, B, Zn, Cu i Mn. Značajan podatak je dobijen za sadržaj Fe u ekstraktu lista *M. nigra* (143 µg/g) koji je višestruko veći nego u svim ostalim ekstraktima (<19 µg/g). Poređenjem svih ispitanih ekstrakata po osnovu sadržaja mikroelemenata posebno se izdvajaju ekstrakti lista ispitanih vrsta *Morus* i ekstrakt korena *M. nigra*.

Nizak sadržaj toksičnih elementa koji je određen u ekstraktima belog i crnog duda pokazuje da su ekstrakti zadovoljavajućeg kvaliteta za humanu upotrebu, tj. da ne sadrže toksične elemente preko dozvoljenih granica.

8. Analiza lipofilnih ekstrakata duda, primenom GC/FID metode, pokazalo se veće prisustvo nezasićenih masnih kiselina, linolne u ekstraktima ploda (40,52% za *M. alba* i 67,38% za *M. nigra*) i linolenske u superkritičnim ekstraktima lista duda (34,97% za *M. alba* i 37,57% za *M. nigra*). Dominantna zasićena masna kiselina u svim ispitanim ekstraktima je palmitinska kiselina (od 16,77 do 37,56%). Sadržaj karotenoida u ekstraktima ploda i lista duda se kreće u intervalu od 14,66 do 65,08 mg/g ekstrakta, pri čemu je sadržaj ukupnih karotenoidnih jedinjenja veći kod ekstrakata vrste *M. alba* u odnosu na ekstrakte vrste *M. nigra*. O hemijskom sastavu superkritičnih ekstrakata *Morus* vrsta nema objavljenih podataka u literaturi zbog čega su dobijeni rezultati od velikog značaja.

9. Procena antioksidativne aktivnosti izvršena je primenom testova koji su zasnovani na transferu elektrona, neutralizaciji slobodnoradikalne vrste i potencijalu inhibicije lipidne peroksidacije. Dobijeni rezultati primenjenih testova pokazali su da su obe ispitivane vrste potentni antioksidativni agensi. Ekstrakti vrste *M. nigra* imaju veću aktivnost u odnosu na ekstrakte vrste *M. alba*, pri čemu su ekstrakti lista *M. nigra* pokazali veći antioksidativni potencijal u odnosu na sve ostale ekstrakte. Najmanji antioksidativni potencijal su pokazali ekstrakti ploda obe ispitane vrste.

10. Procena citotoksične aktivnosti određena je u *in vitro* uslovima na tri ćelijske linije (Hep2c, RD i L2OB), i pokazalo se da je su Hep2c i L2OB ćelije najosetljivije na etanolne ekstrakte lista obe vrste duda i superkritične ekstrakte lista crnog duda ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$). U slučaju RD ćelija najbolje inhibitorno dejstvo su pokazala oba ekstrakta lista crnog duda, etanolni ekstrakt lista i ploda belog duda. Ekstrakti lista *M. nigra* se na sve tri ćelijske linije pokazao ubedljivo kao najpotentniji inhibitor rasta ćelija, za sve ćelijske linije oba ekstrakta imaju IC_{50} vrednost manju od 30 µg/ml. Rezultati koji su dobijeni u ovom radu jasno ukazuju na inhibitorno dejstvo komponenata prisutnih u ekstraktima duda na proliferaciju ćelijskih linija Hep2c, RD i L2OB u *in vitro* uslovima i široke mogućnosti upotrebe ispitivanih ekstrakata.

11. Procena toksične i genotoksične aktivnosti određena je primenom Allium anafazno-telofaznog testa i utvrđeno je da ispitani ekstrakti lista i ploda vrste *Morus* ne pokazuju povećane genotoksične efekte, što daje novu mogućnost korišćenja ovih ekstrakata. U koncentracijama većim od 31,5 mg/ml treba svakako biti obazriv da bi se izbegli eventualni neželjeni efekti.

12. Ukupni biopotencijal ispitivanih ekstrakata vrsta *Morus*, određen na osnovu hemijskog sastava, antioksidativne, citotoksične, toksične i genotoksične aktivnosti, opada u nizu list, plod, koren. Vrsta *M. nigra* je pokazala bolje potencijale u odnosu na *M. alba* vrstu. Koren, koji je jedini neregenerativni deo biljke, nije pokazao opravdanost za dalja biološka i farmakološka ispitivanja, dok su list i plod obe vrste pokazali visok potencijal i dobru osnovu za dalja ispitivanja u cilju primene proizvoda na bazi dudu.

13. Kao izuzetan resurs i najbolji deo vrste *Morus* pokazao se list *M. nigra* sa prostora Vojvodine, koji se ujedno preporučuje za razvijanje novih fitopreparata, dijetetskih suplemenata, dodataka u ishrani ili izvora novih biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja.

6. LITERATURA



- Alissa, E.M., Bahijri, S.M., Ferns, G.A. (2003). The controversy surrounding selenium and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Medicinal Science Monitor*, 9, RA9-18.
- Allen, T.T. (2006). *Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems*. Springer, London.
- Al-Sabti, K., Kurelec, B. (1985). Chromosomal aberration in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorination by-products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 80-88.
- Al-Saikhan, M.S., Howard, L.R., Miller, J.C.Jr. (1995). Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Science*, 60, 341-347.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61.
- AOAC (1984). *Official Methods of Analysis*, 14th edition. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233-1240.
- Ascherio, A., Rimm, E.B., Hernana, M.A., Giovannucci, E.L., Kawachi, I., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (1998). Intake of Potassium, Magnesium, Calcium, and Fiber and Risk of Stroke Among US Men. *Circulation*, 98, 1198-1204
- Bae, S.H., Suh, H.J. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT- Food Science and Technology*, 40, 955-962.
- Ball, A.R., Casadei, G., Samosorn, S., Bremner, J.B., Ausubel, F.M., Moy, T.I., Lewis, K. (2006). Conjugating berberine to a multidrug efflux pump inhibitor creates an effective antimicrobial. *ACS chemical biology*, 1, 594-600.
- Bas, D., Boyaci, I.H. (2007). Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-45.
- Beelman, R.B., Roys, D.J. (2006). Selenium enriched of *Pleurotus cornucopiae* (Pulet) Rolland and *Grifola frondosa* (Dicks:Fr) S. F. Gray mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8, 77-84.
- Bertelli, A., Bertelli, A.A.E., Gozzini, A., Giovannini, L. (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs under experimental and clinical research*, 24, 133-138.

- Bhat, R., Kiran, K., Arun, A.B., Karim, A.A. (2010). Determination of mineral composition and heavy metal content of some nutraceutically valued plant products. *Food Analytical Methods*, 3, 181-187.
- Bidel, L.P.R., Meyer, S., Goulas, Y., Cadot, Y., Cerovic, Z.G. (2007). Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: In vivo qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88, 163-179.
- Blagojević, J., Stamenković, G., Vujošević, M. (2009). Potential genotoxic effects of melted snow from an urban area revealed by the *Allium cepa* test, *Chemosphere*, 74, 1344-1347.
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., Ninfali, P. (2010) Fruit and vegetables antioxidants in health, U: Bioactive foods in promoting health (fruits and vegetables), Watson, R.R., Preedy, V.R. (Ed.), Elsevier Inc., New York, pp. 37-58.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr. Cancer* 18, 1-29.
- Bogdanović, G. (200). Citoprotektivni efekti flavonskih jedinjenja na ćelijske linije, Magistarska teza. Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Bondet, W., Williams, B., Berset, C. (1997). Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT – Food Science and Technology*, 30, 609-615.
- Bor, M., Cevik, C., Uslu, I., Guneral, F., Duzgun, E. (1999). Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiologia*, 54, 271-276.
- Bouillon, M.E., Meyer, H.H. (2007). Diastereoselective total synthesis of (+)-morusimic acid B, an amino acid from *Morus alba*. *Tetrahedron*, 63, 2712-2723.
- Brereton, R.G. (2003). Applied chemometrics for scientists. John Wiley & Sons Ltd., London.
- Briemann, H.L., Setzer, W.N., Kaufman, P.B., Kirakosyan, A., Cseke, L.J. (2006). *Natural Products from Plants*, 2nd Ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Britton, G. (1983). *The Biochemistry of Natural Pigments*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Brown, J.P.A. (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research*, 75, 243-277.
- Butt, M.S., Nazir, A., Tauseef Sultan, M., Schroen, K. (2008). *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 505-512.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (1996). *Tietz Fundamentals of Clinical chemistry*, 4th edition W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Cacace, J.E., Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5939-5946.
- Cacace, J.E., Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-383.

- Cadenas, E., Davies, K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 222-230.
- Chadwick, D.J., Marsh, J. (1990). Bioactive compounds from plants (CIBA foundation symposium 154), John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Chang, L.W., Juang, L.J., Wang, B.S., Wang, M.Y., Tai, H.M., Hung, W.J., Chen, Y.J., Huang, M.H. (2011). Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) wings and root bark. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 785-790.
- Chen, J.J., Li, X.G. (2007). Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 290-294.
- Chevallier A. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. London: Dorling Kindersley Limited; 1996.
- Caldwell, C.R., Britz, S.J., Mirecki R.M. (2005). Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean (*Glycine max* L.) Merrill) grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1125-1129.
- Combs, G.F., Clark, L.C., Turnbull, B.W. (2001). An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors*, 14, 153-159.
- Combs, G.F. (1998). Vitamin A, U: The Vitamins: Fundamental aspects in Nutrition and Health, Suja., R. (Ed.), Academic Press, San Diego, pp 107-153.
- 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, United Kingdom.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 569-590.
- Cox, D.R., Reid, N. (2000). *The theory of design of experiments*. Chapman & Hall, Great Britain.
- Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J., Frischknecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107, 109-114.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115, 61-9.
- Dekić, M. (2011). Fitohemijsko ispitivanje odabranih biljnih vrsta porodica Geraniaceae i Brassicaceae, Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Niš.
- Dimić, E. (2005). Hladno ceđena ulja. Škorić, D., Pićurić-Jovanović, K., Jakovljević, J. (Eds.), Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

- Doll, R., Peto, R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Nat. Cancer Inst.*, 66, 1191-308.
- Du, J., He, Z-D., Jiang, R-W., Ye, W-C., Xu, H-X., But, P.P-H. (2003). Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry*, 62, 1235-1238.
- Du, Q., Zheng, J., Xu, Y. (2008). Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 390-395.
- Duke, L.A. (1990). Promising phytomedicinals. U: *Advances in new crops*, Simon, J.E. (Ed.), Timber Press, Portland, OR, USA, pp. 491-498.
- Duh, P.D., Tu, Y.Y., Yen, G.C. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT – Food Science and Technology*, 32, 269-277.
- Đorđević, S. (2008). Farmakognosijsko proučavanje *Carlina acaulis* subsp. *caulences* i *Carlina acanthifolia* subsp. *utzka* (Asteraceae). Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Đukić, M. (2008). Oksidativni stres- slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi, Mono i Manjana, Beograd, Srbija.
- El-Aty, A.M., Choi, J.H., Ko, M.W., Khay, S., Goudah, A., Shin, H.C., Kim, J.S., Chang, B.J., Lee, C.H., Shim, J.H. (2009). Approaches for application of sub and supercritical fluid extraction for quantification of orbifloxacin from plasma and milk: Application to disposition kinetics. *Analytica Chimica Acta*, 631, 108-115.
- Elmaci, Y., Altrug, T. (2002). Flavour evaluation of tree black mulberry (*Morus nigra*) cultivation using GC/MS, chemical and sensory data. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 632-635.
- Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., van Rompay, M.V., Kessler, R.C. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA– Journal of the American Medical Association*, 280, 1569-1575.
- Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M. (2005). Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Nutrition*, 135, 729-724.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000). Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 648-656.
- Ercisli, S., Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103, 1380-1384
- Ercisli, S., Orhan, E. (2008). Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 116, 41-46.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Feer radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

- Ferreira, I., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 4, 1511-1516.
- Fisher, P., Ward, M. (1994). Complementary medicine in Europe. *British Medicine Journal*, 309, 107-111.
- Gad, S.C. (2005). *Drug discovery handbook*. Jonh Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Gamez, E.J.C., Luyengi, L., Lee, S.K., Zhu, L.-F., Zhou, B.-N., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.S. (1998). Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*. *Journal of Natural Products*, 61, 706-708.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L., Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1485–1490.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813-8826.
- Gazzani, G., Papetti, A., Massolini, G., Daglia, M. (1998). Antioxidative and pro-oxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *Food Chemistry*, 6, 4118–4122.
- Gecgel, U., Velioglu, S.D., Velioglu, H.M. (2011). Investigating some physicochemical properties and fatty acid composition of native black mulberry (*Morus nigra* L.) seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1179-1187.
- Gerasopoulos, D., Stavroulakis, G. (1997). Quality Characteristics of Four Mulberry (*Morus* sp) Cultivars in the Area of Chania, Greece. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73, 261–264.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. (2003). Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 615-622.
- Goldbeck-Wood, S., Dorozynski, A., Lie, L.G. (1996). Complementary medicine is booming worldwide. *British Medicine Journal*, 313, 131-133.
- Grant, W.F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals, *Mutation Research*, 426, 107-112.
- Gundogdu, M., Muradoglu, F., Gazioglu Sensoy, R.I., Yilmaz H. (2011). Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132, 37-41.
- Gutteridge, J.M.C. (1987). Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochemical Journal*, 243, 709-714.

- Hojjatpanah, G., Fazaeli, M., Djomeh, Z.E. (2011). Effect of heating method and conditions on the quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 956-962.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 531-542.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280, 1-8
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*, 4th Edition. Oxford University Press Inc, New York, USA.
- Harborne, J.B. (1994). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge, United Kingdom.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.
- Hassimoto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2007). Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*, 13, 17-25.
- Hathcock, J.N. (2004). *Vitamin and Mineral Safety*, 2nd Edition, Council for Responsible Nutrition (CRN Press), Washington.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*, 13, 572-584.
- Heinemann, T., Axtmann, A., von Bergmann, K. (1993). Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different sterols in man. *European Journal of Clinical Investigation*, 23, 827-831.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Elsevier Science Ltd., Spain.
- Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Review in Food Science Nutrition*, 28, 315-347.
- Hertog, M.G.I., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases. The Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Ho, E., Ames, B.N. (2002). Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in rat glioma cell line. *PNAS*, 99, 16770-16775.
- Hsu, C.K., Chiang, B.H., Chen, Y.S., Yang, J.H., Liu, C.L. (2008). Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry*, 108, 633-641.

- Huang, Z., Wang, B., Eaves, D.H., Shikany, J.M., Pace, R.D. (2007). Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by african americans in the southeast US. *Food Chemistry*, 103, 1395-1402.
- Imran, M., Khan, H., Shah, M., Khan, R., Khan, F. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species, *Journal Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 11, 973-980.
- Innis, S.M. (1996). Essential dietary lipids. U: Present knowledge in nutrition. Ziegler, E.E., Filer, L.J. jr. (Eds.), ILSI Press, Washington DC, USA, pp. 58-66.
- Ioku, K., Tsushida, T., Takei, Y., Nakatani, N., Terao, J. (1995). Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1234, 99-104.
- IOM, Institute of Medicine (1999). Food Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D. National Academy Press, Washington DC.
- IOM, Institute of Medicine (1998). Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: proposed definition and plan for review of dietary antioxidants and related compounds. National Academy Press, Washington DC.
- Isabelle, M., Lee, B.L., Ong, C.N., Liu, X., Huang, D. (2008). Peroxyl radical scavenging capacity, polyphenolics, and lipophilic antioxidant profiles of mulberry fruits cultivated in southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9410-9416.
- Isanga, J., Zhang, G.N. (2007). Biologically active components and nutraceuticals in peanuts and related products: review. *Food Reviews International*, 23, 123-140.
- Itharat, A., Houghton, P., Eno-Amoogaye, E., Burke, P., Sampson, J., Raman, A. (2004). In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plant used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 33-38.
- Jakšić, M. (2009). Toksične tvari u hrani, Tehnološki fakultet, Tuzla, Bosna i Hercegovina.
- Jokić, A. (2010). Modelovanje "cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 206-212.
- Jovanović, M. (2003). Praktikum iz farmaceutske tehnologije sa biofarmacijom I deo. Prvo izdanje. Zemun.
- Jovičić, A., Jovanović, M., Đorđević, D., Dinčić, E. (1997). Changes of oxidative and antioxidative activity in multiple sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 50, 150-157.
- Jovičić, A., Marković Jovanović, M., Đorđević, D., Magdić, B., Dinčić, E. (1997). Oxidative and antioxidative activity in the patients with disseminated demyelinating disease central nervous system. *Vojnosanitetski pregled*, 54, 193-202.

- Kalcheva, V., Dragoeva, A., Kalchev, K., Enchev, D. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cell., *Genetics and Molecular Biology*, 32, 389-393.
- Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y., Shiwaku, K., Yamane, Y. (2006). Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97, 25-31.
- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furundo, T., Yamasaki, Y. (2009). Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chemistry*, 113, 964-969.
- Kalac, P., Svoboda, L. (2000). A review of trace elements concentration in edible mushrooms. *Food chemistry*, 69, 273-281.
- Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J., Kromhout, D. (1996). Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, *Archives of Internal Medicine*, 156, 637- 642.
- Kennedy, T.A., Liebler, D.C. (1991). Peroxy radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides. *Chemical Research in Toxicology*, 4, 290-295.
- Kim, S.H., Kim, N.J., Choi, J.S., Park, J.C. (1993). Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* bureau, *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition* 22, 68-72.
- Kim, J.S., Ha, T.Y., Ahn, J.Y., Kim, H.K., Kim, S. (2008). Composition and quantitative analysis of stilbenoids in mulberry (*Morus alba* L.) leaves and fruits with DAD/UV HPLC. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 37,124–128.
- Kim, H.G., Ju, M.S., Shim, J.S., Kim, M.C., Lee, S.H., Huh, Y., Kim, S.Y., Oh, M.S. (2010). Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *British Journal of Nutrition*, 104, 8-16.
- Kim., J.Y., Lee, W.S., Kim, Y.S., Curtis-Long, M.J., Lee, B.W., Ryu, Y.B., Park, K.H. (2011). Isolation of chlorinesterase-inhibition flavonoids from *Morus lhol*. *Journal od Agricultural and Food Cehmistry* 59, 4589-4596.
- King, J.W. (2002). Supercritical Fluid Extraction: Present Status and Prospects, *Grasas y Aceites*, 53, 8-21.
- Knekt, P., Marniemi, J., Teppo, L., Heliovaara, M., Aromaa, A. (1998). Is low selenium status a risk factor for lung cancer. *American Journal of Epidemiology*, 148, 975-982.
- Kobrin, S.M., Goldfarb, S. (1990). Magnesium Deficiency. *Semin Nephrol*, 10, 525-535.
- Kovačević, N. (2002). *Osnovi Farmakognozije*. Univerzitet u Beogradu. Farmaceutki fakultet, Beograd.
- Krinsky, N. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17, 815-817.
- Kuete, V., Fozing, D.C., Kapche, W.F.G.D., Mbaveng, A.T., Kuate, J.R., Ngadjui, B.T., Abegaz, B.M. (2009). Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygiy* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 551-555.
- Kujundžić, S. (2002). *Biohemijska ispitivanja biljnih vrsta familije Apiaceae*, Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

- Lalli, J.Y.Y. (2005). In vitro Pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous pelargonium (Geraniaceae) species, PhD Thesis, University of the Witwatersrand, Johannesburg.
- Lang, Q., Wai, C.M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review, *Talanta*, 53, 771–782.
- Lazić, Z.R. (2004). Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide, Wiley–VCH, Weinheim.
- Lawrence, G.D. (2010). The Fats of Life, Essential Fatty Acids in Health and Disease. Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey and London.
- Lea, P.J., Leegod, R.C. (1999). Plant Biochemistry and Molecular Biology, 2nd edition, John Wiley & Sons, Chichester.
- Lee, C.Y., Sim, S.M., Cheng, H.M. (2008). Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract. *Nutrition Research*, 28, 555-563
- Leonardth, W., Kurktschiev, T., Meissner, D., Lattke, P., Abletshauer, C., Weidinger, G., Jaross, W., Hanefeld, M. (1997). Effects of fluvastatin therapy on lipids, antioxidants, oxidation of low density lipoproteins and trace metals. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 53, 65-9.
- Lesjak, M. (2011). Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (*Cupressaceae*). Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Lepojević, Ž. (2000). Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda. Novi Sad: Tehnološki fakultet.
- Lieberman, M.M., Patterson, G.M.L., Moore, R.E. (2001). In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity, *Cancer Lett.*, 173, 21-29.
- Lin, H-Y., Lai, L-S. (2009). Isolation and viscometric characterisation of hydrocolloids from mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Hydrocolloids*, 23, 840-848.
- Lin, H-Y., Tsai, J-C., Lai, L-S. (2009). Effect of salts on the rheology of hydrocolloids from mulberry (*Morus alba* L.) leaves in concentrated domain. *Food Hydrocolloids*, 23, 2331–2338.
- Luque de Castro, M.D., Jimenéz-Carmona, M.M. (2000). Where is supercritical fluid extraction going?, *Trends in analytical chemistry*, 19, 223-228.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Mainardi, T., Kapoor, S., Bielory, L.J. (2009). Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 283-296.
- Majer, J., Grummt, T., Uhl, M., Knasmuller S. (2005). Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment, *Acta Hydrochim Hydrobiolgy*, 33, 45-55.
- Majkić-Singh, N.T. (2000). Medicinska biohemija, pp 359-444.

- Maksimović, Z. (2007). Antioksidativni potencijal lekovitog bilja, U: Oksidativni stress, slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi, Đukić, M.M. (Ed) Mono i Manjana, Beograd.
- Marentis, R. (2001). Processing pharmaceuticals with supercritical fluids. 4th Brazilian Meeting on Supercritical Fluids EBFS 2001. pp 17-19.
- Markham, K.R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. U: Harborne, J.B., Dey, P.M. (Eds.), Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, London, pp. 193-237.
- Meir, J., Kanner, B., Akiri, B., Hadas, S.P. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 1813-1815.
- Memon, A.A., Memon, N., Luthria, D., Bhangar, M.I., Pitafi, A.A. (2010). Phenolic acids profiling and antioxidant of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 60, 25-32.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent aglycones. Journal of Chromatography A, 897, 177-184.
- Mertens-Talcott, S.U., Talcott, S.T., Percival, S.S. (2003). Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis 19 in MOLT-4 human leukemia cells, Journal of Nutrition, 133, 2669-2674.
- Moller, J.K.S., Madsen, H.L., Aaltonen, T., Skibsted, L.H. (1999). Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. Food Chemistry, 64, 215-219.
- Middleton, E., Kandaswami, C. (1992). Effects of flavonoids and inflammatory functions. Biochemical Pharmacology, 43, 1167-1179.
- Miettinen, T.A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H. (1995). Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. The New England Journal of Medicine, 333, 1308-1312.
- Monarca, S., Feretti, D., Collivignarelli, C., Guzzella, L., Zerbini, I., Bertanza, G., Pedrazzani, R. (2000). The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. Water research, 34, 4261-4269.
- Montgomery, D.C., Runger, G.C (2003). Applied statistics and probability for engineers. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Morales K.H., Ryan L., Kuo T.L., Wu M.M., Chen C.J., (2000). Risk of internal cancers from arsenic in drinking water. Environmental Health Perspective, 108, 655-661.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65, 55-63.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Herminia Dominguez, H., Nunez, M.J., Lema, J.M. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3890-3897.

- 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, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525.
- Mišan, A.Č., Mimica-Dukić, N.M., Mandić, A.I., Sakač, M.B., Milovanović, I.Lj., Sedej, I.J. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Biology*, 9, 133-142.
- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F.F. (2004). Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoid compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 349-357.
- Myers, R.H., Montgomery, C.M. (1995). *Response surfaces methodology: process and product optimization using designed experiments*, Wiley, New York, 1995.
- Naczka, M., Shadidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Neve, J. (1996). Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Risk*, 3, 42-47.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- Nielsen, I.L.F., Haren, G.R., Magnussen, E.L., Dragsted, L.O., Rasmussen, S.E. (2003). Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography: investigation of their pH stability and antioxidative potency, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5861-5865.
- Norhuda, I., Jusoff, K. (2009). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) as a clean technology for palm kernel oil extraction. *Journal of Biochemical Technology*, 1, 75-78.
- Nuengchamnong, N., Ingkaninan, K., Kaewruang, W., Wongareonwanakij, S., Hongthongdaeng, B. (2007). Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 853-858.
- Nuutila, A.M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M., Oksman-Caldentey, K.M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81, 485-493.
- Orhan, D.D., Hartevioğlu, A., Küpeli, E., Yesilada, E. (2007). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 394-400.
- Oteiza, P., Mackenzie, G. (2005). Zinc, oxidant-triggered cell signaling and human health. *Molecular Aspect of Medicine*, 26, 245-255.

- Ozcan, M. (2004). Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey. *Food Chemistry*, 84, 437-440.
- Ozgen, M., Serce, S., Kaya, C. (2009). Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*, 119, 275-279.
- Ozdemir, M., Ozen Banu, F., Dock Lisa, L., Floros John, D. (2008). Optimization of osmotic dehydration of diced green peppers by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 1-7.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Park, K.M., You, J.S., Lee, H.Y., Baek, N.I., Hwang, J.K. (2003). Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 181-185.
- Pasquali, I., Bettini, R., Giordano, F. (2008). Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Advance Drug Delivery Reviews*, 60, 399-410.
- Pawlowska, A.M., Oleszek, W., Braca, A. (2008). Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (*Moraceae*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3377-3380.
- Pharmacopoea Jugoslavica editio quarta, (*Ph. Jug.* IV). Savezni zavod za zaštitu zdravlja. Beograd. 1984.
- Pekić, B., Miljković, D. (1980). Hemija i tehnologija kardiotoničnih glikozida. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Piao, S-J., Chen, L-X., Kang, N., Qiu, F. (2011). Simultaneous determination of five characteristic stilbene glycosides in root bark of *Morus albus* L. (*Cortex Mori*) using high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 22, 230-235.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.J., Toivo, J., Lampi, A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Pothinuch, P., Tongchitpakdee, S. (2011). Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: Effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. *Food Chemistry*, 128, 415-419.
- Promega Corporation. (2006). *Protocols and Applications Guide. Cell Viability*.
- Promega Corporation. (2007). *Protocols and Applications Guide. Apoptosis*.
- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S. (2012). Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using Response Surface Methodology (RSM). *Roumanian Biotechnological Letters*, 17, 7297-7310.
- Radojković, M.M., Zeković, Z.P., Vidović, S.S., Kočar, D.D., Mašković, P.Z. (2012). Free radical scavenging activity, total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., *Moraceae*) extracts. *Hemijska industrija*, DOI: [10.2298/HEMIND111111002R](https://doi.org/10.2298/HEMIND111111002R)

- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S., Lepojević, Ž., Milošević, S. (2012). The optimization of solid–liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 167-176.
- Rank, J. (2003). The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija (Vilnius)*, 38-42.
- Rank, J., Lopez, L.C., Nielsen, M.H., Moretton, J.A. (2002). A laboratory study of the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome assay comparing genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP. *Hereditas*, 136, 13-18.
- Rank, J., Nielsen, M.H. (1993). A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, 118, 49-53
- Rank, J., Nielsen, M.H. (1997). *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 390, 121-127.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnology*, 20, 522-531.
- Reddy, G. S. N., Prakash, J. S. S., Srinivas, R., Matsumoto, G. I. & Shivaji, S. (2003) *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 977-984.
- Rice Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1995). Structure-antioxidant activity, relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 933-956.
- Riss, T.L., R.A. Moravec. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2, 51-62.
- Rostango, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*, 522, 169-177.
- Ross, K.A., Beta, T., Arntfield, S.D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113, 336-344
- Romagnoli, M., Gualtieri, M.L. (2009). Advantages in Using Design of experiments and Artificial Neural Networks in the Study and Optimization of Ceramic Systems, Tile and Brick, *International Manual*.
- Russo, M.W., Murray, S.C., Wurzelmann, J.L., Woosley, J.T., Sandler, R.S. (1997). Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Cancer*, 28, 125-129.
- Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review, *Journal of Food Engineering*, 95, 240–253.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581.

- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- Saris, N.E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J.A., Lewenstam, A. (2000). Magnesium: an update on physiological, clinical, and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta*, 294, 1-26.
- Sedej, I. (2011). Funkcionalna i antioksidativna svojstva novih proizvoda od heljde. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Silberhorn, E.M., Glauert, H.P., Robertson, L.W. (1990). Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. *Critical Reviews in Toxicology*, 20, 440-496.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 56, 365-379.
- Singab, A.N.B., El-Beshbishy, H.A., Yonekawa, M., Nomura, T., Fukai, T. (2005). Hypoglycemic effect of Egiptian *Morus alba* root bark extract: Effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethno-Pharmacology*, 100, 333-338.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Siqueira, S., Falcão-Silva, V.S., Agra, M.F., Dariva, C., Siqueira-Júnior, J.P., Fonseca, M.J.V. (2011). Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 58, 391-397.
- Shamberger, R. J. (1985). The genotoxicity of selenium. *Mutation Research*, 154, 29-48.
- Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shannon, J., Ray, R., Wu, C., Nelson, Z., Gao, D. L., Li, W., Hu, W., Lampe, J., Horner, N., Satia, J., Patterson, R., Fitzgibbons, D., Porter, P., Thomas, D. (2005). Food and botanical groupings and risk of breast cancer: A case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14, 81-90.
- Shils, M.E. (1999). Magnesium. U: *Moderan nutrition in health and disease*, 9th Edition, Shils, M.E., Olson J.A., Shike, M., Ross, C.A. (Eds), Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 169-192.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S. (2002). Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hemijska industrija*, 56, 179-190.
- Sohn, H.Y., Son, K.H., Kwon, C.S., Kwon, G.S., Kang, S.S. (2004). Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L.,

- Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine*, 11, 666-672.
- Song, W., Wang, H.J., Bucheli, P., Zhang, P.Z., Wei, D.Z., Lu., Y.H. (2009). Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9133-9140.
- Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78, 793-801.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. (1996). A review: Vegetables, fruit, and cancer prevention. *Journal of American Diet Association*, 96, 1027-39.
- Stermitz, F.R., Lorenz, P., Tawara, J.N., Zenewicz, L.A., Lewis, K. (2000). Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 97, 1433-1437.
- Su, Q., Rowley, K.G., Itsipoulos, C., O'Dea, K. (2002). Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 1149-1154.
- Sun, F., Shen, L., Ma, Z. (2011). Screening for lignans of human aromatase from mulberry (*Mori alba* L.) leaf by using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 126, 1337-1343.
- Suqin, S., Hernandez, M., Kramer, J., Rinker, D., Tsao, R. (2010). Ergosterol Profiles, Fatty Acid Composition, and Antioxidant Activities of Button Mushrooms as Affected by Tissue Part and Development Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11616-11625.
- Sykorova, M., Janošova, V., Štroffekova, O., Košťalova, D., Havranek, E., Račkova, L. (2009). Determination of selected elements by XRF and total phenolics in leaves and crude methanol extract of leaves of *arctostaphylos uva-ursi*. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana*, 136-145.
- Švarc-Gajić, J. (2009). *General Toxicology*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Takada, H., Kokubo, K., Matsubayashi, K., Oshima, T. (2006). Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by β -carotene bleaching assay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 3088-3093.
- Tanchou, S. (1843). *Recherches sur la fréquence du cancer*, *Gazette des hôpitaux*, 6.
- Tasić, N., Radak, Dj., Cvetković, Z., Petrović, B., Ilijevski, N., Djordjević-Debić, G. (2004). Uloga i značaj oligoelemenata u patogenezi arteroskleroze. *Vojnosanitetski pregled*, 61, 667-673.
- Tchounwou, P.B., Abdelghani, A.A., Pramar, Y.V., Heyer, L.R., Ssteward, C.M. (1996). Assessment of potential health risks associated with ingesting heavy metals in fish collected from a hazardous-waste contaminated wetland in Louisiana, USA.

- Thomas, K.J., Nicholl, J.P., Coleman, P. (2001). Use and expenditure on complementary medicine in England: a population based survey. *Complementary therapies in medicine*, 9, 2-11.
- Thompson, A.B., Bohling, T., Heires, A., Linder, J., Rennard, S.I. (1991). Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117, 493-499.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.
- Thomson, H.J. (2010). Vegetable and Fruit Intake and the Development of Cancer: A Brief Review and Analysis, u *Bioactive foods in Promoting Health (fruits and vegetables)*, Watson, R.R., Preedy, V.R. (Ed.), Elsevier Inc., New York, pp. 37-58.
- Thompson, H. J., Heimendinger, J., Sedlacek, S., Haegele, A., Diker, A., O'Neill, C., Meinecke, B., Wolfe, P., Zhu, Z., Jiang, W. (2005). 8-Isoprostane F2alpha excretion is reduced in women by increased vegetable and fruit intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 768-776.
- Thomson, M.D., Thomson H.J. (2010). Botanical diversity in vegetable and fruit intake: Potential health benefits, U: *Bioactive foods in promoting health (fruits and vegetables)*, Watson, R.R., Preedy, V.R. (Ed.), Elsevier Inc., New York, pp. 37-58.
- Thurnham, D.L. (1994). Carotenoids: Functions and fallacies. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 53, 77-87.
- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., Niki, E. (1995). Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323, 137-147.
- Tumbas, V. (2010). Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstraktata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Tumbas, T.V., Čanadanović-Brunet, J.M., Četojević-Simin, D.D., Četković, G.S., Đilas, S.M., Gille, L. (2012). Effect of rosehip (*Rose canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1273-1281.
- Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N. (2007). Antioxidant and antimicrobial Activity of *Russula delica* Fr: An Edible Wild Mushroom. *Euroasian Journal of Analytical Chemistry*, 1, 54-67.
- Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bill.) Murrill. *Food Chemistry*, 101, 267-273.
- Uzakova, D.H., Kolesnik, A.A., Zherebin, Y.L., Sarycheva, I.K. (1987). Carotenoids of mulberry leaves and of silkworm excreta. *Chemistry of Natural Compounds*, 23, 124-125.
- Uzakova, D.H., Kolesnik, A.A., Zherebin, Y.L., Evstigneeva, R.P., Sarycheva, I.K. (1987). Lipids of mulberry leaves and of mulberry silkworm excreta. *Chemistry of Natural Compounds*, 23, 419-423.

- Veljković, D., Vučković, G.N. (2010). Minerali u ishrani. *Hemijski pregled*, 51, 14-19.
- Vidović, S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. *Doktorska disertacija*. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Vichasilp, C., Nakagawa, K., Sookwong, P., Higuchi, O., Luemunkong, S., Miyazawa, T. (2012). Development of high 1-deoxyojirimycin (DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction. *LWT-Food Science and Technology*, 45, 226-232.
- Vićentijević, Lj. (2001). *Farmaceutska tehnologija I*. Osmo izdanje. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2800-2802.
- Voet, D., Voet, J.G. (2004). *Biochemistry*, 3rd Edition, Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Vračar, Lj. (2001). Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Vujošević, M., Anđelković, S., Savić, G., Blagojević, J. (2008). Genotoxicity screening of the river Rasina in Serbia using the *Allium* anaphase-telophase test, *Environmental Monitoring and Assessment*, 147, 75-81.
- Wang, L., Folsom, A.R., Eckfeldt, J.H. (2003). Plasma fatty acid composition and incidence of coronary heart diseases in middle aged adults: Atherosclerosis Risk in Communities (ARCI) Study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 13, 256-266.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.
- Wang, L, Yang, B., Du, X., Yi, C. (2008). Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry*, 108, 737-41.
- Watkins, A., Li Y., Hennig B., Toborek, M.(2005). Dietary lipids and health. U: *Bailey's Industrial oil and fat products*. Shahidi, F. (Ed) Sixth Edition, Volume 1, Edible oil and fat products: Chemistry, properties and health effects, Wiley & Sons, New Jersey. pp. 577-606.
- WCRF/AICR (World Cancer Research Fund) (2008). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington.
- World Cancer Research Fund, (1997). Colon, rectum. *Food Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, Washington DC, American Institute for Cancer Research, 216-51.
- World Health Organization (WHO), (1997). *The World Health Report*, Geneva.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
- Wright, M.E., Park, Y., Subar, A.F., Freedman, N.D., Albanes, D., Hollenbeck, A., Leitzmann, M. F., Schatzkin, A. (2008). Intakes of fruit, vegetables, and specific botanical groups

- in relation to lung cancer risk in the NIH-AARP diet and health study. *American Journal of Epidemiology*, 168, 1024-1034.
- Wu, X., Prior, R.L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3101-3113.
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Yang, L. (2011). Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, 129, 443-453.
- Zadrnowski, R., Naczek, M., Mesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.
- Zambakhidze, N.E., Sulaberidze, K.V., Mzhavanadze, V.V., Tsiklauri, G.Ch. (2005). Sterols of mulberry leaves and small leaf curl disease. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 404-406.
- Zeković, Z. (1998). Ekstrakcija timijana (*Thymus vulgaris* L.) superkričnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- Živković, J. (2009). Farmakološki aktivne supstance kestena (*Castanea sativa* Mill.). Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Xu, L., Diosady, L.L. (2010). *Fats and Oils from Plant Materials, U: Extraction Optimization in Food Engineering*, Tzia, C., Lladakis, G. (Eds), Marcel Dekker Inc., USA.
- Yang, X., Yang, L., Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2374-2379.
- Ying, Z., Han, X., Li, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127, 1273-1279.
- Yeum, K.J., Russell, R.M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22, 483-504.
- <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/m/mulcom62.html>

7. PRILOZI

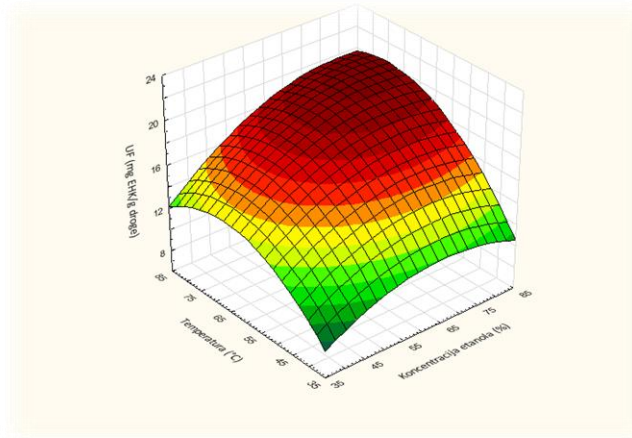


PRILOG 7.1. RSM analiza *M. alba folium*

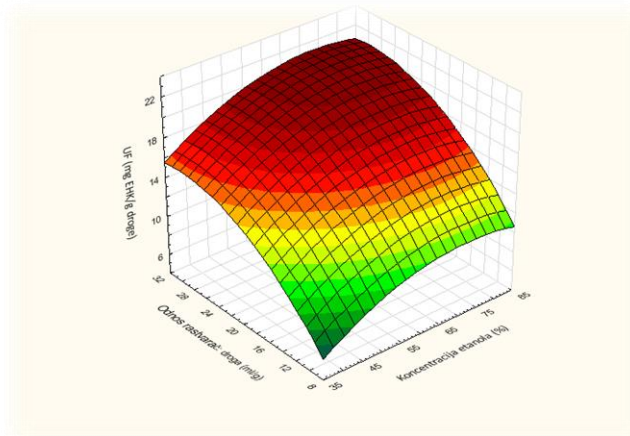
Tabela 1. Prave i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih (X_1 , X_2 , X_3) i eksperimentalni rezultati prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih fenola (UF), sadržaja ukupnih flavonoida (Ufl) i antioksidativne aktivnosti (IC_{50})

Redni broj	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Rastvarač:droga (ml/g)	Prinos ekstrakcije (% , g/100 g)	UF (mg EHK/ g droge)	UFI (mg ER/ g droge)	IC_{50} (mg/ml)
1	40 (-1)	40 (-1)	20 (0)	24,256	12,84	4,64	0,1380
2	40 (-1)	60 (0)	10 (-1)	20,568	9,92	5,69	0,1350
3	40 (-1)	80 (1)	20 (0)	23,020	15,12	5,74	0,1100
4	40 (-1)	60 (0)	30 (1)	24,539	18,47	5,28	0,0823
5	60 (0)	40 (-1)	10 (-1)	18,094	9,49	4,64	0,1570
6	60 (0)	80 (1)	10 (-1)	19,928	13,69	6,03	0,0753
7	80 (1)	60 (0)	10 (-1)	13,956	13,65	5,12	0,0741
8	80 (1)	80 (1)	20 (0)	16,280	20,66	5,49	0,0710
9	80 (1)	60 (0)	30 (1)	16,194	22,58	4,46	0,0740
10	60 (0)	80 (1)	30 (1)	22,940	23,07	4,58	0,0706
11	60 (0)	60 (0)	20 (0)	37,528	19,36	6,06	0,0759
12	60 (0)	60 (0)	20 (0)	38,260	19,98	6,02	0,0758
13	60 (0)	60 (0)	20 (0)	38,528	19,04	6,40	0,0821
14	60 (0)	60 (0)	20 (0)	37,528	19,86	6,01	0,0762
15	60 (0)	60 (0)	20 (0)	38,260	19,08	6,00	0,0809
16	80 (1)	40 (-1)	20 (0)	26,932	14,90	5,34	0,1197
17	60 (0)	40 (-1)	30 (1)	26,765	14,87	5,29	0,0874

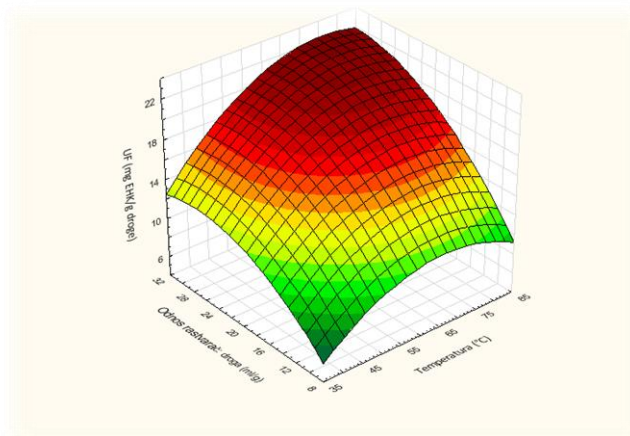
a)



b)

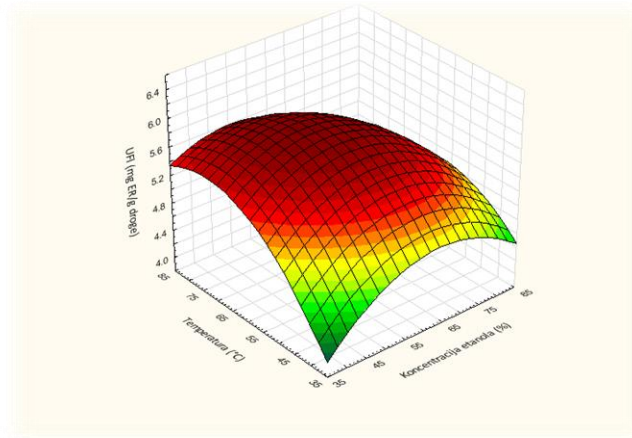


c)

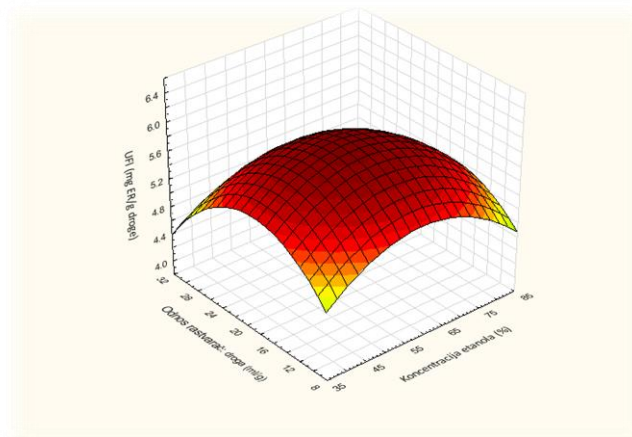


Slika 1. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih fenola: a) temperatura i koncentracija etanola (odnos rastvarač:droga 20 ml/g), b) odnos rastvarač:droga i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) odnos rastvarač:droga i temperatura (koncentracija etanola 60%)

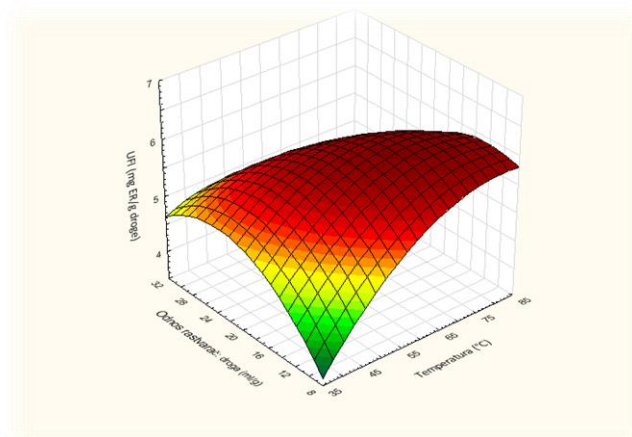
a)



b)

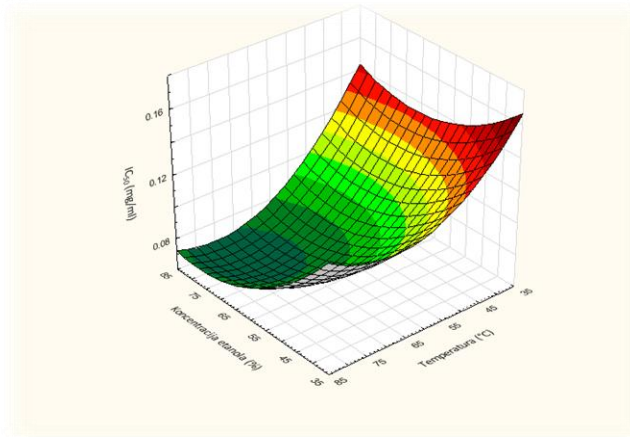


c)

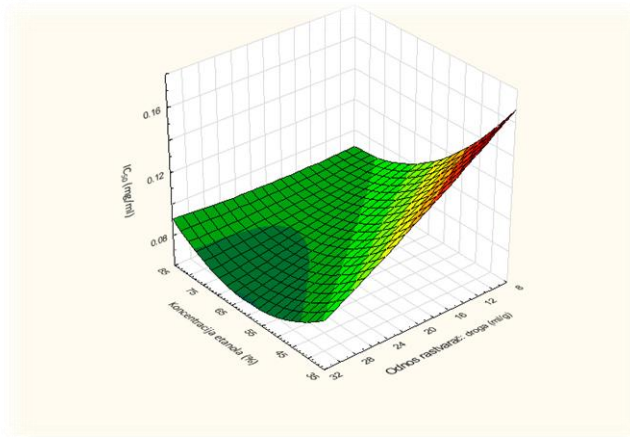


Slika 2. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih flavonoida: a) temperatura i koncentracija etanola (odnos rastvarač:droga 20 ml/g), b) odnos rastvarač:droga i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) odnos rastvarač:droga i temperatura (koncentracija etanola 60%)

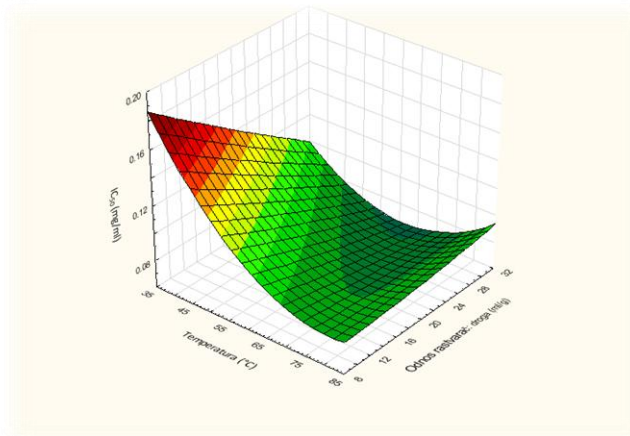
a)



b)



c)



Slika 3. Uticaj ispitivanih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata lista *M. alba*: a) temperatura i koncentracije etanola (odnos rastvarač:droga 20 ml/g), b) odnos rastvarač:droga i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) odnos rastvarač:droga i temperatura (koncentracija etanola 60%)

Tabela 2. Regresioni koeficijenti polinomne funkcije odziva

Odzivi ^a	Regresioni koeficijent	Standardna devijacija	F - vrednost	p - vrednost ^b
Sadržaj ukupnih fenola				
Odsečak	19,46	0,34		
X_1	1,93	0,27	51,07	0,0002
X_2	2,56	0,27	89,60	<0,0001
X_3	4,03	0,27	222,57	<0,0001
X_1^2	-1,35	0,37	13,20	0,0084
X_2^2	-2,23	0,37	35,81	0,0006
X_3^2	-1,96	0,37	27,65	0,0012
X_1X_2	0,87	0,38	5,19	0,0568
X_1X_3	0,092	0,38	0,058	0,8171
X_2X_3	1,00	0,38	6,85	0,0345
$R^2 = 0,9850$				
Sadržaj ukupnih flavonoida				
Odsečak	6,10	0,13		
X_1	-0,12	0,10	1,30	0,2924
X_2	0,24	0,10	5,48	0,0517
X_3	-0,23	0,10	5,23	0,0560
X_1^2	-0,40	0,14	7,87	0,0263
X_2^2	-0,40	0,14	7,97	0,0257
X_3^2	-0,56	0,14	15,96	0,0052
X_1X_2	-0,24	0,14	2,65	0,1479
X_1X_3	-0,063	0,14	0,19	0,6758
X_2X_3	-0,52	0,14	13,07	0,0086
$R^2 = 0,9004$				
IC₅₀ vrednost				
Odsečak	0,078	0,0022		
X_1	-0,016	0,0018	81,20	<0,0001
X_2	-0,022	0,0018	155,76	<0,0001
X_3	-0,016	0,0018	81,97	<0,0001
X_1^2	0,013	0,0024	27,29	0,0012
X_2^2	0,019	0,0024	60,80	0,0001
X_3^2	0,0005	0,0024	0,049	0,8313
X_1X_2	-0,0005	0,0025	4,35	0,0755
X_1X_3	0,013	0,0025	28,08	0,0011
X_2X_3	0,016	0,0025	42,75	0,0003
$R^2 = 0,9858$				

^a X_1 : rastvarač; X_2 : temperatura; X_3 : odnos rastvarač:droga.

^b $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

Tabela 3. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva za ekstrakciju lista *M. alba*

Izvor	Suma kvadrata	Stepen slobode	Srednja vrednost kvadrata	F-vrednost	p-vrednost ^a
Sadržaj ukupnih fenola					
Model	268,77	9	29,86	51,17	< 0,0001
Ostatak	4,09	7	0,58		
Odstupanje od modela	3,32	3	1,11	5,80	0,0612
Greška	0,76	4	0,19		
Ukupno	272,85	16			
Sadržaj ukupnih flavonoida					
Model	5,31	9	0,59	7,03	0,0088
Ostatak	0,59	7	0,084		
Odstupanje od modela	0,47	3	0,16	5,35	0,0695
Greška	0,12	4	0,029		
Ukupno	5,90	16			
IC₅₀ vrednost					
Model	0,012	9	0,0013	54,18	<0,0001
Ostatak	0,0002	7	0,00002		
Odstupanje od modela	0,0001	3	0,00004	4,79	0,0822
Greška	0,00004	4	0,000009		
Ukupno	0,012	16			

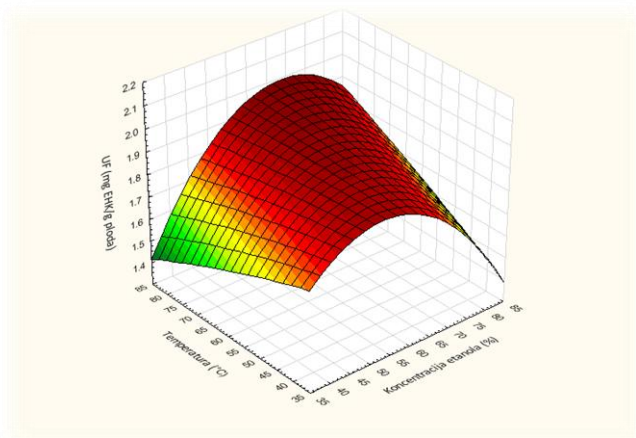
^a $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

PRILOG 7.2. RSM analiza *M. alba fructus*

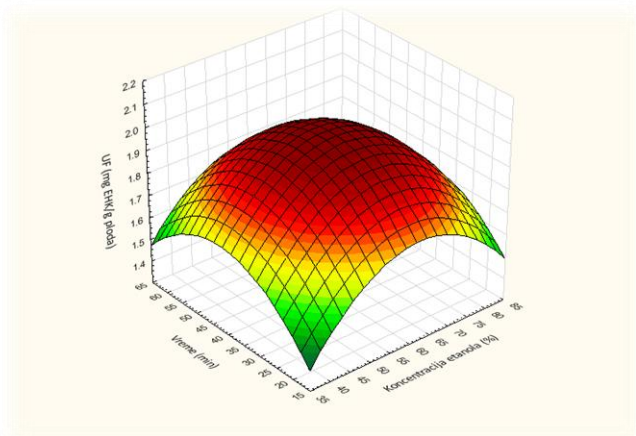
Tabela 4. Prave i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih (X_1 , X_2 , X_3) i eksperimentalni rezultati prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih fenola (UF), sadržaja ukupnih flavonoida (Ufl) i antioksidativne aktivnosti (IC_{50})

Redni broj	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Prinos ekstrakcije (% g/100 g)	UF (mg EHK/g ploda)	UFI (mg ER/g ploda)	IC_{50} (mg/ml)
1	40 (-1)	40 (-1)	40 (0)	14,858	1,88	1,08	0,0747
2	40 (-1)	60 (0)	20 (-1)	13,904	1,70	0,92	0,0851
3	40 (-1)	80 (1)	40 (0)	14,603	1,69	1,08	0,0799
4	40 (-1)	60 (0)	60 (1)	14,033	1,59	1,43	0,0773
5	60 (0)	40 (-1)	20 (-1)	16,432	1,71	0,85	0,0845
6	60 (0)	80 (1)	20 (-1)	15,962	1,79	1,02	0,0893
7	80 (1)	60 (0)	20 (-1)	11,748	1,75	1,15	0,0902
8	80 (1)	80 (1)	40 (0)	16,421	1,99	1,14	0,0719
9	80 (1)	60 (0)	60 (1)	13,614	1,57	1,63	0,0757
10	60 (0)	80 (1)	60 (1)	15,982	1,93	1,35	0,0657
11	60 (0)	60 (0)	40 (0)	14,105	2,09	1,71	0,0669
12	60 (0)	60 (0)	40 (0)	14,385	2,01	1,63	0,0703
13	60 (0)	60 (0)	40 (0)	14,440	2,03	1,74	0,0711
14	60 (0)	60 (0)	40 (0)	13,908	1,95	1,71	0,0720
15	60 (0)	60 (0)	40 (0)	14,798	1,95	1,87	0,0714
16	80 (1)	40 (-1)	40 (0)	14,039	1,67	1,22	0,0765
17	60 (0)	40 (-1)	60 (1)	13,376	1,93	1,15	0,0677

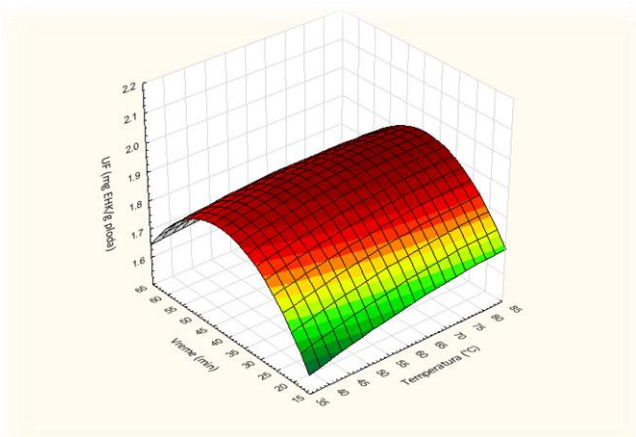
a)



b)

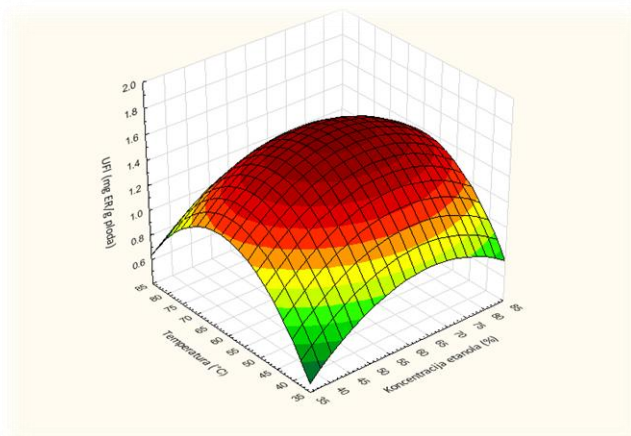


c)

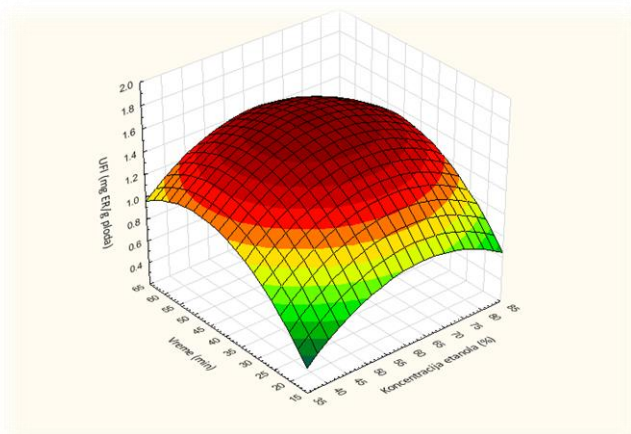


Slika 4. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih fenola: a) temperatura i koncentracija etanola (vreme 40 minuta), b) vreme i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) vreme i temperatura (koncentracija etanola 60%)

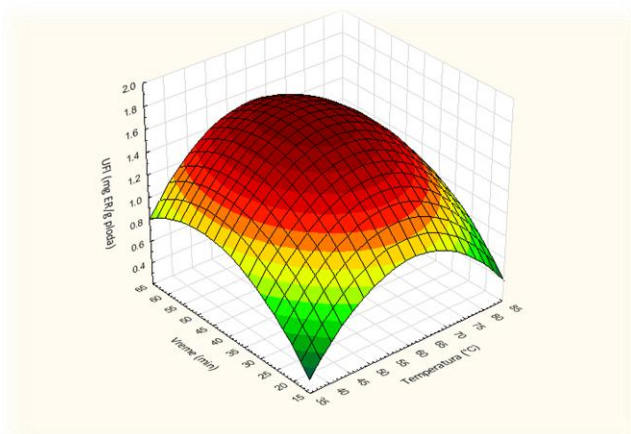
a)



b)

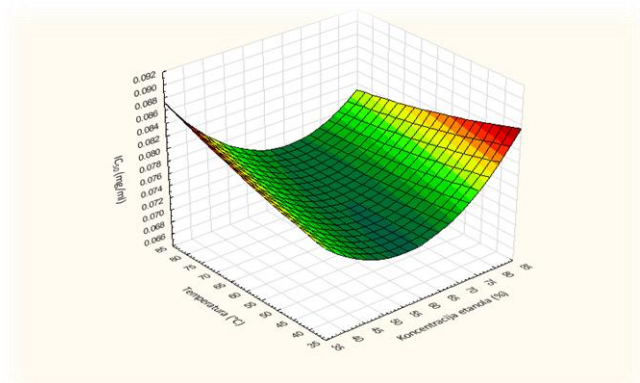


c)

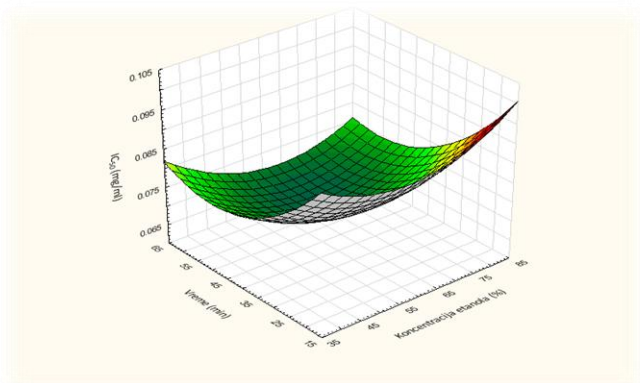


Slika 5. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih flavonoida: a) temperatura i koncentracija etanola (vreme 40 minuta), b) vreme i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) vreme i temperatura (koncentracija etanola 60%)

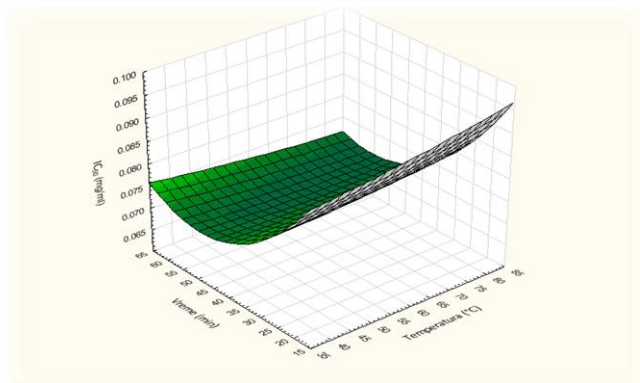
a)



b)



c)



Slika 6. Uticaj ispitivanih parametara na antioksidativnu aktivnost ploda *M. alba*: a) temperatura i koncentracija etanola (vreme 40 minuta), b) vreme i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) vreme i temperatura (koncentracija etanola 60%)

Tabela 5. Regresioni koeficijenti polinomne funkcije odziva

Odziv ^a	Regresioni koeficijent	Standardna devijacija	F - vrednost	p - vrednost ^b
Sadržaj ukupnih fenola				
Odsečak	8,01	0,18		
X_1	0,060	0,14	0,18	0,6863
X_2	0,11	0,14	0,57	0,4734
X_3	0,031	0,14	0,049	0,8310
X_1^2	-0,78	0,20	15,68	0,0055
X_2^2	-0,010	0,20	0,0028	0,9590
X_3^2	-0,64	0,20	10,58	0,0140
X_1X_2	0,52	0,20	6,58	0,0372
X_1X_3	-0,076	0,20	0,14	0,7154
X_2X_3	-0,075	0,20	0,14	0,7220
$R^2 = 0,8355$				
Sadržaj ukupnih flavonoida				
Odsečak	6,93	0,19		
X_1	0,31	0,15	4,18	0,0803
X_2	0,15	0,15	0,94	0,3646
X_3	0,81	0,15	28,50	0,0011
X_1^2	-0,83	0,21	15,84	0,0053
X_2^2	-1,57	0,21	56,36	0,0001
X_3^2	-0,98	0,21	21,78	0,0023
X_1X_2	-0,081	0,21	0,14	0,7166
X_1X_3	-0,028	0,21	0,017	0,9013
X_2X_3	0,033	0,21	0,024	0,8808
$R^2 = 0,9516$				
IC₅₀ vrednost				
Odsečak	0,070	0,0014		
X_1	-0,0003	0,0011	0,093	0,7692
X_2	0,0004	0,0011	0,15	0,7115
X_3	-0,0007	0,0011	49,32	0,0002
X_1^2	0,0053	0,0015	12,05	0,0104
X_2^2	0,0001	0,0015	0,0028	0,9593
X_3^2	0,0064	0,0015	17,28	0,0043
X_1X_2	-0,0025	0,0016	2,41	0,1641
X_1X_3	-0,0017	0,0016	1,14	0,3215
X_2X_3	-0,0017	0,0016	1,15	0,3187
$R^2 = 0,9243$				
^a X_1 : rastvarač; X_2 : temperatura; X_3 : vreme.				
^b $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno				

Tabela 6. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva

Izvor	Suma kvadrata	Stepen slobode	Srednja vrednost kvadrata	F-vrednost	p-vrednost ^a
Sadržaj ukupnih fenola					
Model	5,75	9	0,64	3,95	0,0418
Ostatak	1,13	7	0,16		
Odstupanje od modela	0,89	3	0,30		
Greška	0,24	4	0,060	4,98	0,0775
Ukupno	6,88	16			
Sadržaj ukupnih flavonoida					
Model	25,45	9	2,83	15,30	0,0008
Ostatak	1,29	7	0,18		
Odstupanje od modela	0,79	3	0,26	2,07	0,2473
Greška	0,51	4	0,13		
Ukupno	26,75	16			
IC₅₀ vrednost					
Model	0,00085	9	0,0000957	9,49	0,0036
Ostatak	0,00006	7	0,0000099		
Odstupanje od modela	0,00005	3	0,0000180	4,54	0,0889
Greška	0,00002	4	0,0000039		
Ukupno	0,00092	16			

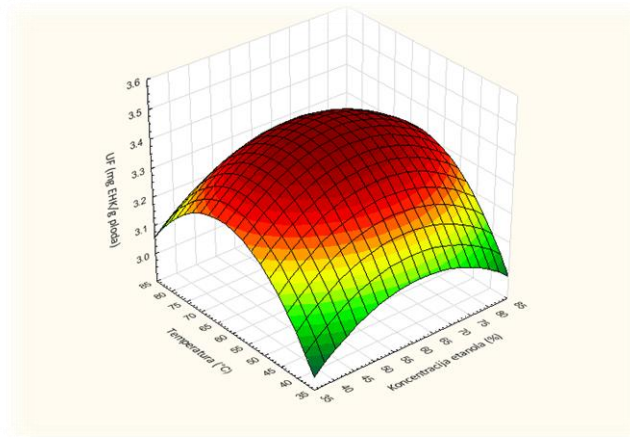
^a $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

PRILOG 7.3. RSM za *M. nigra fructus*

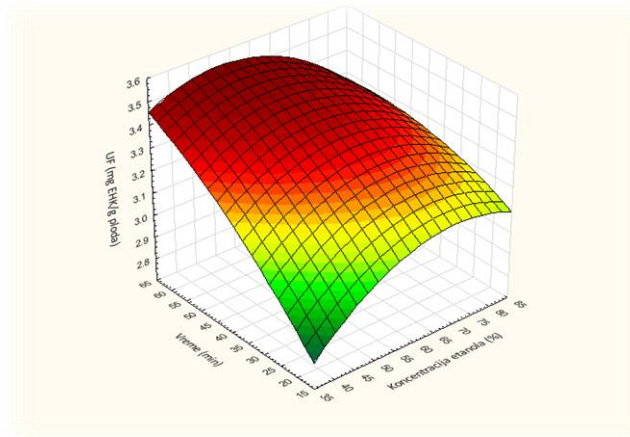
Tabela 7. Prave i kodirane vrednosti nezavisno promenljivih (X_1 , X_2 , X_3) i ekperimentalni rezultati prinosa ekstrakcije, sadržaja ukupnih fenola (UF), sadržaja ukupnih flavonoida (Ufl) i antioksidativne aktivnosti (IC_{50})

Redni broj	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Prinos ekstrakcije (% g/100 g)	UF (mg EHK/g ploda)	UFI (mg ER/g ploda)	IC_{50} (mg/ml)
1	40 (-1)	40 (-1)	40 (0)	12,828	3,22	1,70	0,0261
2	40 (-1)	60 (0)	20 (-1)	12,410	2,96	1,72	0,0306
3	40 (-1)	80 (1)	40 (0)	12,648	3,29	1,94	0,0270
4	40 (-1)	60 (0)	60 (1)	13,639	3,51	1,87	0,0300
5	60 (0)	40 (-1)	20 (-1)	12,070	2,96	1,71	0,0305
6	60 (0)	80 (1)	20 (-1)	7,978	3,32	1,92	0,0353
7	80 (1)	60 (0)	20 (-1)	12,237	3,30	1,94	0,0352
8	80 (1)	80 (1)	40 (0)	13,107	3,17	1,49	0,0254
9	80 (1)	60 (0)	60 (1)	13,928	3,55	1,74	0,0286
10	60 (0)	80 (1)	60 (1)	13,143	3,33	2,14	0,0276
11	60 (0)	60 (0)	40 (0)	11,446	3,37	2,37	0,0237
12	60 (0)	60 (0)	40 (0)	11,060	3,46	2,18	0,0243
13	60 (0)	60 (0)	40 (0)	11,235	3,52	2,22	0,0252
14	60 (0)	60 (0)	40 (0)	10,998	3,50	2,22	0,0249
15	60 (0)	60 (0)	40 (0)	11,562	3,46	2,26	0,0244
16	80 (1)	40 (-1)	40 (0)	12,127	3,09	1,53	0,0243
17	60 (0)	40 (-1)	60 (1)	12,207	3,44	2,01	0,0291

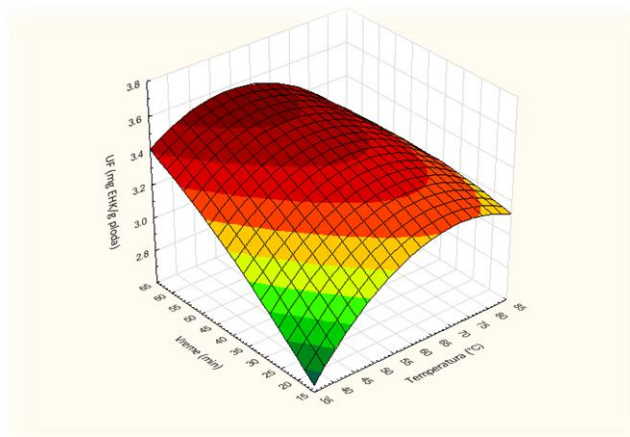
a)



b)

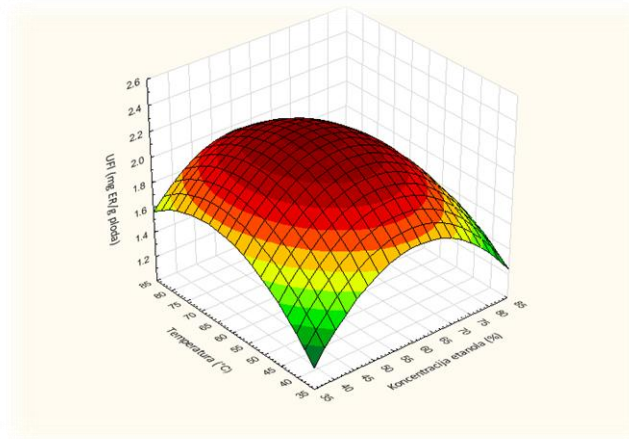


c)

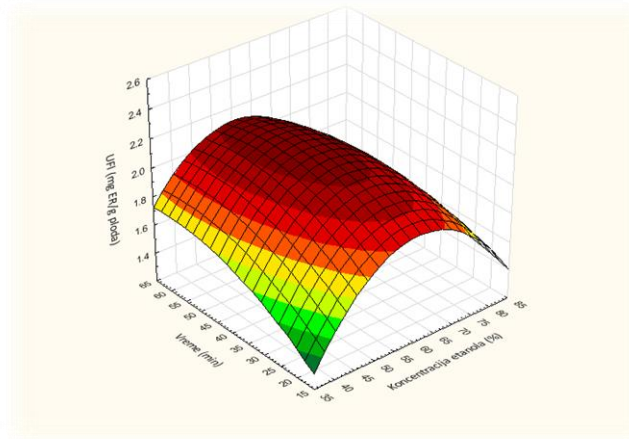


Slika 7. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih fenola: a) temperatura i koncentracija etanola (vreme 40 minuta), b) vreme i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) vreme i temperatura (koncentracija etanola 60%)

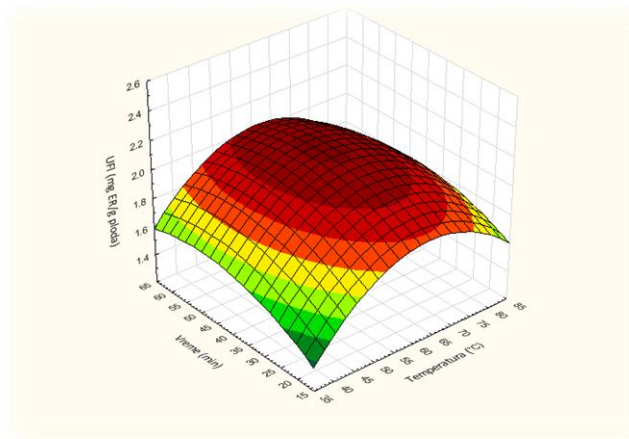
a)



b)

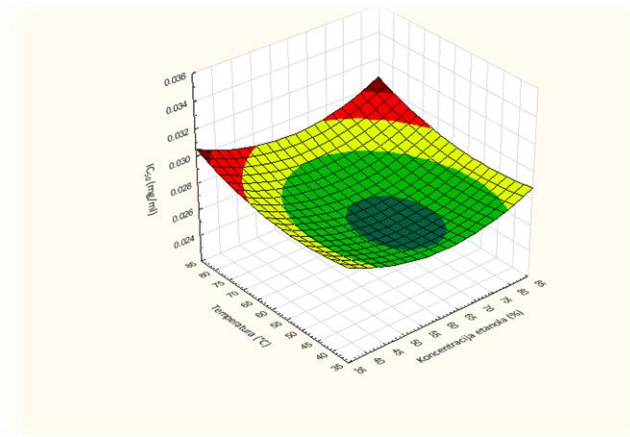


c)

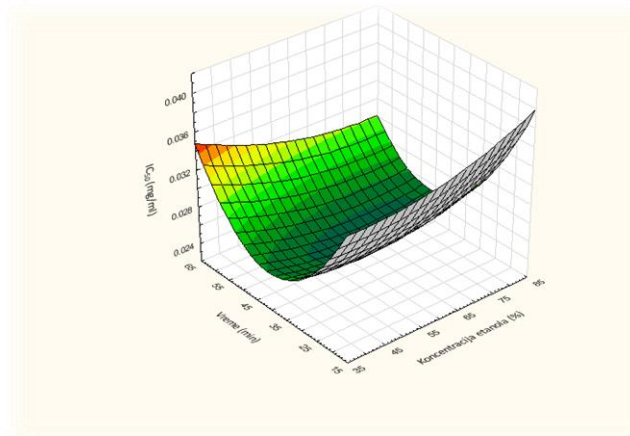


Slika 8. Uticaj ispitivanih parametara na sadržaj ukupnih flavonoida: a) temperatura i koncentracija etanola (vreme 40 minuta), b) vreme i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) vreme i temperatura (koncentracija etanola 60%)

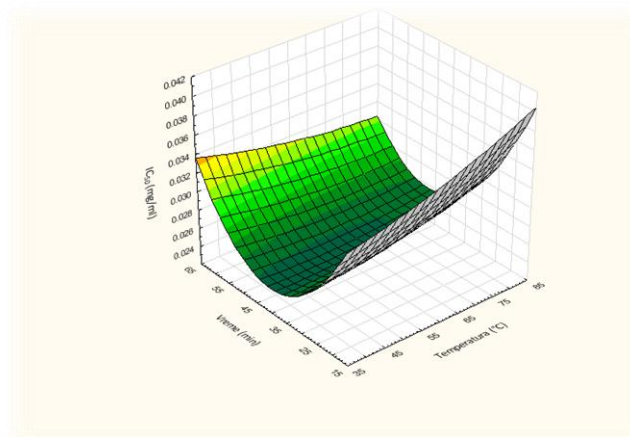
a)



b)



c)



Slika 9. Uticaj ispitivanih parametara na antioksidativnu aktivnost ploda *M. nigra*: a) temperatura i koncentracija etanola (vreme 40 minuta), b) vreme i koncentracija etanola (temperatura 60°C) i c) vreme i temperatura (koncentracija etanola 60%)

Tabela 8. Regresioni koeficijenti polinomne funkcije odziva

Odziv ^a	Regresioni koeficijent	Standardna devijacija	F - vrednost	p - vrednost ^b
Sadržaj ukupnih fenola				
Odsečak	18,00	0,24		
X_1	0,088	0,19	0,21	0,6615
X_2	0,25	0,19	1,67	0,2376
X_3	0,85	0,19	19,45	0,0031
X_1^2	-0,51	0,26	3,66	0,0974
X_2^2	-0,89	0,26	11,23	0,0122
X_3^2	-0,17	0,26	0,39	0,5509
X_1X_2	0,015	0,27	0,0029	0,9588
X_1X_3	-0,38	0,27	2,01	0,1994
X_2X_3	-0,61	0,27	4,99	0,0607
$R^2 = 0,8648$				
Sadržaj ukupnih flavonoida				
Odsečak	11,72	0,31		
X_1	-0,35	0,24	2,11	0,1893
X_2	0,35	0,24	2,10	0,1910
X_3	0,32	0,24	1,74	0,2286
X_1^2	-1,87	0,33	31,56	0,0008
X_2^2	-1,19	0,33	12,65	0,0093
X_3^2	-0,41	0,33	1,49	0,2614
X_1X_2	-0,37	0,34	1,2	0,3098
X_1X_3	-0,44	0,34	1,63	0,2425
X_2X_3	-0,11	0,34	0,11	0,7487
$R^2 = 0,8929$				
IC₅₀ vrednost				
Odsečak	0,025	0,0004613		
X_1	-0,000025	0,0003647	0,0047	0,9473
X_2	0,000662	0,0003647	3,30	0,1121
X_3	-0,002038	0,0003647	31,22	0,0008
X_1^2	0,0008375	0,0005027	2,78	0,1396
X_2^2	0,0003625	0,0005027	0,52	0,4942
X_3^2	0,005763	0,0005027	131,42	<0,0001
X_1X_2	0,00005	0,0005157		0,9255
X_1X_3	-0,0015	0,0005157		0,0227
X_2X_3	-0,001575	0,0005157		0,0185
$R^2 = 0,9646$				

^a X_1 : rastvarač; X_2 : temperatura; X_3 : vreme.

^b $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

Tabela 9. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva

Izvor	Suma kvadrata	Stepen slobode	Srednje kvadratno odstupanje	F-vrednost	p-vrednost ^a
Sadržaj ukupnih fenola					
Model	13,18	9	1,46	4,97	0,0230
Ostatak	2,06	7	0,29		
Odstupanje od modela	1,69	3	0,56	6,13	0,0562
Greška	0,37	4	0,092		
Ukupno	15,24	16			
Sadržaj ukupnih flavonoida					
Model	27,31	9	3,03	6,48	0,0111
Ostatak	3,28	7	0,47		
Odstupanje od modela	2,72	3	0,91	6,55	0,0505
Greška	0,55	4	0,14		
Ukupno	30,59	16			
IC₅₀ vrednost					
Model	0,0002	9	0,00002	21,22	0,0003
Ostatak	0,000007	7	0,000001		
Odstupanje od modela	0,000006	3	0,000002	6,08	0,0569
Greška	0,000001	4	0,0000003		
Ukupno	0,0002	16			

^a $p < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

PRILOG 7.4. GC/FID analiza ekstrakata lista i ploda duda

Tabela 10. Sastav i sadržaj masnih kiselina u ekstraktima lista i ploda duda

Masna kiselina	<i>M. alba</i>	<i>M. nigra</i>	<i>M. alba</i>	<i>M. nigra</i>
	list	list	plod	plod
	% (g/100 g s.e.)			
Kaprionska kiselina (C6:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Kaprilna kiselina (C8:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Kaprinska kiselina (C10:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Dekanoinska kiselina (C11:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Laurinska kiselina (C12:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Tridekanoinska kiselina (C13:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Miristinska kiselina (C14:0)	2,36	2,24	0,27	0,53
Miristoleinska kiselina (C14:1)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Pentadekanoinska kiselina (C15:0)	0,88	0,48	1,68	0,09
10- Pentadekanoinska kiselina (C15:1)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Palmitinska kiselina (C16:0)	26,38	25,99	37,56	16,77
Palmitoleinska kiselina (C16:1)	0,67	0,33	1,24	0,37
Heptadekanoinska kiselina (C17:0)	2,66	1,93	0,29	0,27
10- Heptadekanoinska kiselina (C17:1)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Stearinska kiselina (C18:0)	4,91	5,32	1,73	3,89
Elaidinska kiselina (C18:1n9t)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Oleinska kiselina (C18:1n9c)	2,86	2,30	7,61	6,91
Linolaideinska kiselina (C18:2n6t)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Linolna kiselina (C18:2n6c)	15,76	16,05	40,52	67,38
Arahidonska kiselina (C20:0)	4,45	4,13	0,34	0,37
γ-Linolenska kiselina (C18:3n6)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
11-Eikozanoenska kiselina (C20:1)	1,08	1,15	0,20	0,15
Linolenska kiselina (C18:3n3)	34,97	37,57	6,32	2,61
Heneikozanoinska kiselina (C21:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
11, 14-Eikozadenoinksa kiselina (C20:2)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Behenska kiselina (C22:0)	2,81	1,90	1,94	0,54
8, 11, 14-Eikozatrenoinska kiselina (C20:3n6)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Erukinska kiselina (C22:1n9)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
11, 14, 17-Eikozatrienonska kiselina (C20:3n3)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Arahidonska kiselina (C20:4n6)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Trikozanoinska kiselina (C23:0)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
13,16-Dokozadienoinska kiselina (C22:2)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Lignocerinska kiselina (C24:0)	1,22	0,61	0,30	0,12
Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eikozatrienoinska kiselina (C20:5n3)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Nervoinjska kiselina (C24:1)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02

Cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-Dokosaheksaenska kiselina (C22:6n3)	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Zasićene masne kiseline (SFA)	45,67	42,60	44,11	22,78
Nezasićene masne kiseline (UFA; MFA+PFA)	54,33	57,40	55,89	77,42
UFA:SFA odnos	1,19	1,35	1,23	3,40