



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Danica S. Dimitrijević

**ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA I
ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI
EKSTRAKATA DUDA (*Morus spp.*,
Moraceae)**

Doktorska disertacija

Niš, 2014



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Danica S. Dimitrijević

**ANALYSIS OF CHEMICAL
COMPOSITION AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF MULBERRY EXTRACTS
(*Morus spp.*, *Moraceae*)**

PhD thesis

Niš, 2014

Mentor:

Dr Danijela Kostić,

redovni profesor Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Ilanovi komisije:

1. **Dr Gordana Kocić**,

redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

2. **Dr Snežana Mitić**,

redovni profesor Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija ura ena je u laboratoriji Departmana za hemiju Prirodno-matemati kog fakulteta Univerziteta u Nišu u okviru projekta ON 172047 „Prirodno proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena“, rukovodioca dr Gordane Stojanović, redovnog profesora Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Izradom doktorske disertacije rukovodila je dr Danijela Kostić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, i predložila temu. Ovom prilikom joj se najiskrenije zahvaljujem na svestranoj pomoći i tokom istraživanja, sugestijama u toku izrade i pisanja rada, kao i na odličnoj saradnji.

Zahvaljujem dr Snežani Mitić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, koja je stručnim savetima i sugestijama doprinela kvalitetu ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem dr Gordani Kocić na korisnim savetima i učešću u radu komisije, dr Miljanu Mitić u na pomoći i prilikom izvođenja HPLC analize i dr Aleksandriću oruževi za pomoći u određivanju mikrobiološke aktivnosti ispitivanih ekstrakata.

Takođe zahvaljujem svom prijatelju dr Dragana Rangelovu na podršci i pomoći u tehnici obradi ilustrovanih eksperimentalnih rezultata.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na podršci i razumevanju.



(*M* rus spp., *Moraceae*)

2014

33.

161 , 46 , 57 a, 154

/ , : Morus spp., , ,

[581.192 + 542.943'78] : 582.635.3

(*Morus alba* L.),
(*Morus nigra* L.)

(*Morus rubra* L.)

ABTS

DPPH

(Fe, Cu, Mn, Cd, Ni, Zn i Pb)

50%.



KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	-
Identification number, INO:	
Document type, DT:	monograph
Type of record, TR:	textual / graphic
Contents code, CC:	doctoral dissertation
Author, AU:	Danica S. Dimitrijević
Mentor, MN:	Dr Danijela A. Kostić
Title, TI:	Analysis of chemical composition and antioxidant activity of mulberry extracts (<i>Morus</i> spp., <i>Moraceae</i>)
Language of text, LT:	Serbian
Language of abstract, LA:	Serbian and English
Country of publication, CP:	Serbia
Locality of publication, LP:	Serbia
Publication year, PY:	2014
Publisher, PB:	author's reprint
Publication place, PP:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD: <small>(chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendices)</small>	161 pages, 46 tables, 57 pictures, 154 references
Scientific field, SF:	Chemistry
Scientific discipline, SD:	Organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW:	Morus spp., phenolic compounds, antioxidant activity, content of metals, antimicrobial activity
UC	[581.192 + 542.943'78] : 582.635.3
Holding data, HD:	library
Note, N:	The experimental part of this work was performed in the research laboratory of the Faculty of Science and Mathematics in Niš.

Abstract, **AB:**

Fruit extracts of three types of mulberry: white mulberry (*Morus alba* L.), red mulberry (*Morus rubra* L.) and black mulberry (*Morus nigra* L.) were prepared in solvents of different polarity. The content of phenols, flavonoids and anthocyanins was determined using the spectrophotometric methods. It was found that the tested extracts are rich in phenolic compounds. Extracts of black mulberry has a particularly high content of anthocyanins, and in extracts of white mulberry are certain anthocyanins.

The antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods. The tested extracts showed high antioxidant activity. Aqueous extracts had the lowest antioxidant activity. Extracts of red mulberry showed the highest, and black mulberry lowest antioxidant activity.

Examined the metal content (Fe, Cu, Mn, Cd, Ni, Zn and Pb) in the fruit and prepared extracts using atomic absorption spectrophotometry. Mulberry fruit showed the highest iron content and low content of toxic metals. Water and water-alcohol solutions have a low extraction ratios for the investigated metals. Metal content was highest in extracts of acetone and acetone 50%. In general, the metal content in the mulberry fruit and its extracts is within the specified range, and can be used in the preparation of nutritional and pharmaceutical formulations with additional anti-microbial and anti-bacterial properties.

Tested the antimicrobial activity of extracts of the individual bacteria. The highest antimicrobial activity on the tested bacteria showed the methanol extract of mulberry fruit.

A comparative analysis of the results were performed.

Accepted by the Scientific Board on, **ASB:**

Defended on, **DE:**

Defended Board, **DB:** President:

Member:

Member, Mentor:

UVOD.....	1
1. TEORIJSKI DEO.....	5
1.1. MORUS spp. (<i>Moraceae</i>).....	6
1.1.1. Poreklo duda.....	7
1.1.2. Adaptacija.....	7
1.1.3. Opis.....	7
1.1.4. List.....	7
1.1.5. Cvet.....	8
1.1.6. Plod.....	8
1.1.7. Lokacija, zemljište i bolesti.....	8
1.1.8. Sadržaj mineralnih elemenata.....	9
1.1.9. Sadržaj fenolnih jedinjenja u belom, crvenom i crnom dudu.....	10
1.1.10. Izolovana jedinjenja HPLC analizom.....	13
1.1.11. Antimikrobna aktivnost duda.....	16
1.1.12. Lekovita svojstva duda.....	18
1.1.13. Upotreba duda.....	19
1.2. METODE EKSTRAKCIJE.....	21
1.2.1. Ekstrakcija vrsto-te no.....	23
1.2.2. Ekstrakcija ultrazvukom.....	24
1.3. FENOLNA JEDINJENJA.....	26
1.3.1. Biosinteza fenolnih jedinjenja.....	29
1.3.2. Flavonoidi.....	31
1.3.3. Antocijani.....	33
1.3.4. Flavan-3-oli.....	36
1.3.5. Flavonoli.....	37

1.3.6. Flavoni.....	37
1.3.7. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture.....	38
1.4. ANTIOKSIDANSI I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA.....	40
1.4.1. Podela antioksidanasa prema nivou i na inu delovanja.....	44
1.4.2. Podela antioksidanasa prema mestu nastajanja.....	44
1.4.3. Sistem antioksidativne zaštite.....	44
1.4.4. Enzimski antioksidansi.....	45
1.5. MIKRO, MAKRO I TOKSI NI ELEMENTI.....	47
1.6. METODE ANALIZE.....	53
1.6.1. UV/Vis spektrofotometrija.....	53
1.6.1.1. Primena UV/Vis spektrofotometrije za odre ivanje ukupnih fenola primenom Folin Ciocalteu metode.....	55
1.6.1.2. Primena UV/Vis spektrofotometrije za odre ivanje sadržaja flavonoida.	55
1.6.1.3. Primena UV/Vis spektrofotometrije za odre ivanja antocijana.....	56
1.6.1.4. Primena UV/Vis spektrofotometrije za odre ivanje antioksidativne aktivnosti.....	56
1.6.1.5. DPPH-metoda (Scavenging of 2,2-difenil-pikrilhidrazil Radical Assay).	57
1.6.1.6. TEAC-metoda (Total Equivalent Capacity Assay).....	58
1.7. ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROFOTOMETRIJA.....	59
1.7.1. Atomski apsorpcioni spektrofotometar.....	59
1.7.2. Svetlosni izvori.....	60
1.7.3. Šuplja katodna lampa.....	60
1.7.4. Lampa sa elektri nim praženjenjem.....	62
1.8. HPLC HROMATOGRAFIJA.....	62
1.8.1. Kvalitativna HPLC analiza.....	66
1.8.2. Kvantitativna HPLC analiza.....	67

1.9. MIKROORGANIZMI I ANTIMIKROBNA SVOJSTVA.....	69
1.9.1. Difuzioni metod.....	72
1.10. STATISTIKA OBRADA PODATAKA.....	73
2. EKSPERIMENTALNI DEO.....	74
2.1. MATERIJAL.....	75
2.2. APARATI.....	75
2.3. REAGENSI.....	76
2.4. METODE.....	77
2.4.1. Priprema uzoraka.....	77
2.4.2. Postupak ekstrakcije.....	78
2.4.3. Postupak mineralizacije.....	78
2.5. UV/Vis SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE.....	78
2.5.1. Odreivanje sadržaja ukupnih fenola.....	78
2.5.2. Odreivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	79
2.5.3. Odreivanje sadržaja monomernih antocijana (pH diferencijalna metoda).....	80
2.5.4. Odreivanje radikal „skevidžer“ kapaciteta.....	82
2.5.5. TEAC metoda.....	82
2.6. HPLC METODA.....	83
2.7. ODREIVANJE SADRŽAJA METALA AAS METODOM.....	84
2.8. ODREIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI.....	85
3. REZULTATI I DISKUSIJA.....	86
3.1. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA PLODA BELOG DUDA (<i>Morus alba L.</i>)....	87
3.1.1. Spektrofotometrijsko odreivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda belog duda (<i>Morus alba L.</i>).....	87
3.1.2. HPLC analiza ekstrakata ploda belog duda.....	93

3.1.3. Određivanje sadržaja metala u plodu i ekstraktima ploda belog duda.....	94
3.1.4. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda belog duda	
3.2. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA PLODA CRVENOG DUDA (<i>Morus rubra L.</i>)	
3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda crvenog duda (<i>Morus rubra L.</i>).....	98
3.2.2. HPLC analiza ekstrakata ploda crvenog duda.....	102
3.2.3. Određivanje sadržaja metala u plodu i ekstraktima ploda crvenog duda.....	104
3.2.4. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda.....	105
3.3. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA PLODA CRNOG DUDA (<i>Morus nigra L.</i>)	107
3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda crnog duda (<i>Morus nigra L.</i>).....	107
3.3.2. HPLC analiza ekstrakata ploda crnog duda.....	111
3.3.3. Određivanje sadržaja metala u plodu i ekstraktima ploda crnog duda.....	113
3.3.4. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda.....	115
3.4. UPOREDNI PREGLED REZULTATA DOBIJENIH ANALIZOM EKSTRAKATA PLODA BELOG, CRVENOG I CRNOG DUDA	116
3.4.1. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima tri vrste duda.....	116
3.4.2. Uporedni pregled sadržaja flavonoida u ekstraktima tri vrste duda.....	118
3.4.3. Uporedni pregled sadržaja monomernih antocijana u ekstraktima tri vrste duda	120
3.4.4. Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom DPPH metode.....	121
3.4.5. Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom ABTS metode.....	123
3.4.6. PCA analiza sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima crnog i crvenog duda..	124
3.4.7. Uporedni pregled rezultata HPLC analize ekstrakata tri vrste duda.....	127
3.4.8. Uporedni pregled sadržaja metala u plodovima i ekstraktima tri vrste duda....	128
3.4.9. PCA analiza sadržaja metala u ekstraktima crnog, crvenog i belog duda.....	134

3.4.10. Uporedni pregled antimikrobne aktivnosti ekstrakata ploda belog, crvenog i crnog duda.....	139
ZAKLJUČAK.....	140
CONCLUSION.....	143
LITERATURA.....	146
PRILOG.....	157
BIOGRAFIJA.....	159
BIBLIOGRAFIJA.....	160

UVOD

Pored velikog 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 Balkana rastu tri vrste roda *Morus*: *Morus alba*, *Morus rubra* i *Morus nigra* koje su u narodu poznatije pod imenom beli, crveni i crni dud. Biljke ovog roda su delimično poznate u tradicionalnoj medicini u kojoj su našle primenu u lečenju dijareje, krvnog pritiska, zarastanju rana i drugo. Na našem podneblju plod duda (dudinje) je minimalno zastupljen u ishrani, a još manje je istražen u pogledu hemijskog sastava i lekovitog delovanja. 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. U Evropu, pa tako i na Balkan, prenesen je kasnije. 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, sredstva protiv crevnih parazita i nesanice.

Beli dud se od davnina gaji, posebno u zemljama proizvođačima svile, jer njegovo lišće služi kao hrana za svilene bube, dok je crni cenjen zbog plodova koji su veoma zdravi za ishranu ljudi i domaćih životinja (živine). Ove dve vrste su i najzastupljenije u našim krajevima. Kod nas je dud prepoznatljiv simbol starinskih dvorišta i vojvođanskih salaša. Sadi se uz puteve i oko vinograda, a postoje i ukrasne vrste namenjene za sadnju u parkovima. Otporan je i dugovečan pa ima primeraka starih i po nekoliko stotina godina. Njegovo drvo koristi se u stolarstvu i za izradu buradi i bačvi. Stablo duda je visine do dvadeset metara, ispucale kore i okruglaste, široko razgranate krošnje. Listovi su zelene boje, jajastog oblika i nazubljenih ivica (kod belog duda su malo krupniji i nežniji). Cveta u maju, a cvetovi su sitni i okupljeni u male grozdaste cvasti. Plodovi ili dudinje sastoje se od gusto zbijenih bobica (sličnih kupini) vezanih za peteljku. Sazrevaju postepeno, od kraja juna do avgusta. Zreli plodovi crnog duda su tamnoljubičasti, a belog bledožuti. Tada su sočni, slatki, meki i najbolji za jelo. Sadrže prirodne šećere (najviše glukozu), vodu, limunsку i jabučnu kiselinu, pektine, sluzi, tanine, smole i vitamine C i B₂. Od

minerala najviše ima gvožđa, kalcijuma i mangana. Beli dud je sladji jer ima više šecera, a manje organskih kiselina. Dud ima mnoga lekovita svojstava. Od osušenih lisnih pupoljaka prave se čajevi protiv gojaznosti i oboljenja srca i krvnih sudova. Osim dudinja, leti se ubiru i listovi, koji se mogu i osušiti na provetrenom i zasenjenom mestu. Koriste se i kao dodatak varivima ili pripremljeni kao čaj, pomažu u lečenju šećerne bolesti. Nedozrele dudinje dobre su za zaustavljanje dijareje, dok one zrele regulišu probavu i čiste organizam, a njihov svež sok podstiče mokrenje, znojenje kod visoke telesne temperature, olakšava iskašljavanje i služi za ispiranje kod upale grla i usne šupljine. Sirup, dobijen isparavanjem soka, sličan je medu i zadržava sva korisna i lekovita svojstva ploda. Zrele dudinje jedu se sveže, osušene ili prerađene u džem, slatko, kompot i žele. Od njih se pravi i vino, kao i rakija dudovača.

Ova doktorska teza ima za cilj sprovođenje detaljnih hemijskih i biohemijskih ispitivanja tri vrste duda i to: *Morus alba* L. (beli dud), *Morus rubra* L. (crveni dud) i *Morus nigra* L. (crni dud).

U okviru izrade doktorske teze treba izvršiti:

- pripremu ekstrakata svežeg ploda duda primenom rastvarača različite polarnosti i njihovih smeša. Primeniće se sledeći rastvarači različite polarnosti: voda, etanol 50%, etanol, metanol 50%, metanol, aceton 50% i aceton.
- određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja primenom Folin-Ciocalteu reagensa.
- određivanje flavonoida primenom metode po Markamu.
- određivanje antocijana primenom pH diferencijalne metode u ispitivanim ekstraktima primenom spektrofotometrijske metode.
- određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata primenom DPPH i ABTS metode.
- HPLC analizu odabranih ekstrakata u cilju određivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava ekstrakata ispitivanih biljaka.
- ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta na izabrane mikroorganizme.
- određivanje sadržaja metala primenom AAS metode, kako u svežim plodovima duda, tako i u pripremljenim ekstraktima.

- korelacionu analizu između sadržaja polifenolnih jedinjenja i sadržaja teških metala PCA
(Analyses of Correlations among the Evaluated Parameters).

1. TEORIJSKI DEO

1.1. MORUS SPP. (Moraceae)

Obojena voća su dobar izvor fenolnih jedinjenja, uključujući antocijane, flavonoide i karotenoide (*Ozgen i sar.*, 2009; *Miliauskas i sar.*, 2004; *Ercisli i Orhan*, 2007; *Gerasopoulos i Stavroulakis*, 1997). Plodovi duda su bogati fenolima i imaju jedinstven kiseo i osvežavajuć ukus (*Kutlu i sar.*, 2011). Korišćeni su kao narodni lek za lečenje bolesti zuba, dijabetesa, hipertenzije, artritisa i anemije (*Sass-Kiss i sar.*, 2005). Sa ciljem pronalaženja novih izvora prirodnih antioksidanasa ispitivani su voće i povrće i druge biljke za koje se zna da poseduju antioksidativnu aktivnost (*Stinzing i sar.*, 2002; *Zadernowski i sar.*, 2005; *Wang i sar.*, 1997; *Ito i sar.*, 1983; *Singleton i Rossi*, 1965; *Ordom i sar.*, 2006).

Morus, rod cvetnica koji spada u familiju *Moraceae*, obuhvata 10 do 16 vrsta listopadnih drveta poznatijih kao dud. Najpoznatiju su beli dud (*Morus alba L.*), crveni (*Morus rubra L.*) i crni dud (*Morus nigra L.*) (slika 1.1.). U tabeli 1.1. je prikazana naučna klasifikacija duda.



Slika 1.1. Izgled ploda belog, crvenog i crnog duda.

Tabela 1.1. Naučna klasifikacija duda.

Carstvo:	<i>Plantae – Biljke</i>
Podcarstvo:	<i>Tracheobionta – Vaskularne biljke</i>
Razdeo:	<i>Magnoliophyta – Skrivenosemenice</i>
Klasa:	<i>Magnoliopsida – Dikotiledone biljke</i>
Podklasa:	<i>Hamamelididae</i>
Red:	<i>Rosales</i>
Familija:	<i>Moraceae – dud porodica</i>
Rod:	<i>Morus L. – dud</i>
Vrste:	<i>Morus alba L.</i> (Beli dud), <i>Morus rubra L.</i> (Crveni dud), <i>Morus nigra L.</i> (Crni dud)

1.1.1. Poreklo duda

Beli dud je poreklom iz istočne i centralne Kine. Vremenom je postao neutralizovan u Evropi pre nekoliko vekova. Stablo je uvedeno u Americi za gajenje svilenih crva u ranijim kolonijalnim vremenima i naturalizovano je i hibridizovano sa tamošnjim crvenim dudom. Crveni dud ili dud amerikanac je poreklom iz istočnog dela Sjedinjenih Američkih država, dok je crni dud poreklom iz Azije. Njegovi plodovi su stigli u Evropu pre rimskog doba (*Ozgen i sar.*, 2009; *Sass-Kiss i sar.*, 2005).

1.1.2. Adaptacija

Beli dud, a u manjoj meri i crveni dud, je otporan na suše, zagađenja i loše zemljište. Crni dud je osetljiviji, posebno na hladna klimatska područja i vlažna leta. Beli dud je najotprniji na hladnoću od sve tri vrsta duda, mada otpornost zavisi od klena do klena. Neki mogu biti oštećeni na temperaturi od -3,8°C, dok su neki izdržljivi i do temperature od -31,6°C. Crveni dud je izdržljiv do ispod nule dok je crni dud dosta osetljiv na niske temeperature, a osetljivost varira od klena do klena (*Ercisli i Orhan*, 2007; *Gerasopoulos i Stavroulakis*, 1997).

1.1.3. Opis

Sve tri vrste duda su listopadna drveća različite veličine (www.crfg.org/pubs/ff/mulberry.html; *Everett*, 1960; *Facciola*, 1990). Stablo belog duda može narasti do 24 m, različitog je oblika, uključujući opušten i piramidalni oblik. Na bogatom zemljištu, crveni dud može da dostigne visinu od 21m dok je stablo crnog duda najniže i može da poraste do visine od 9 m. Dugovečnost duda zavisi od vrste. Crveni dud retko živi duže od 75 godina, dok crni dud može da donosi plodove stotinama godina. Dud predstavlja atraktivno drvo koje donosi plodove i dok je malo i mlado.

1.1.4. List

Beli dud je dobio ime po boji svojih pupoljaka, a ne po boji svog voća. Lišće je sjajno i svetlozeleno, različitog oblika čak i na istom stablu. Listovi crvenog duda su deblji i veći, tupo nazubljeni. Grubi su na njihovoj gornjoj površini a u toku rasta mogu biti grubi i sa donje površine. Lišće crnog duda je slično lišću crvenog duda, samo su grančice tvrđe i pupoljci deblji.

Listanje drveta zavisi od vrste duda. Beli dud počinje da lista u rano proleće, skoro dva meseca pre listanja crnog duda (*Facciola, 1990*).

1.1.5. *Cvet*

Cvetovi duda su su ili jednodomni ili dvodomni, a ponekad u toku rasta mogu da pređu iz jednog pola u drugi. Cvetovi se održavaju na kratkim zelenim, visećim cvetnik resama koje se pojavljuju u pazuzu u toku rasta ili na ograncima starijeg drveta. Oprasuju se uz pomoć vetra, dok nekada daju plodove i bez oprasivanja. Ne zahtevaju unakrsno oprasivanje (*Johns i Stevenson, 1985*).

1.1.6. *Plod*

Botanički posmatrano, voće duda nije bobičasto. Kada se cvetovi oprase, plodovi počinju da se formiraju. Konačno, formiraju se i u potpunosti menjaju u teksturi i boji. Postaju sočni, masni i puni soka. Boja ploda ne utiče na identifikaciju vrste duda (*Ercisli i sar., 2010*). Beli dud može da proizvede bele do crne plodove. Voće belog duda je, generalno, veoma slatko ali mu često nedostaje potrebna kiselost. Voće crvenog duda je obično tamno crvene boje do crne. Kod najboljeg klona crvenog duda, ukus voća je skoro potpuno identičan ukusu crnog duda. Voće crnog duda je veliko i sočno, sa dobrom balansom slasti i kiselosti. Crni dud ima najukusnije plodove. Osvežavajući kiseo ukus ploda crnog duda podseća na grejpfrut. Dudovi sazrevaju tokom dužeg vremenskog perioda, za razliku od drugih voća koja daju sve plodove odjednom (*Everett, 1960*).

1.1.7. *Lokacija, zemljишte i bolesti*

Dud zahteva sunčevu svetlost i adekvatan prostor. Razdaljina između drveća treba da bude najmanje 4,5 m. Drveće ne bi trebalo da bude zasađeno blizu trotoara. Dudovi su otporni na vetar. Zahtevaju dobro isušeno tlo, po mogućству tamnu ilovaču. Uglavnom su bez štetočina i bolesti iako u nekim mestima može da se javi "kokica bolest" koja se manifestuje bubrenjem plodova. *Morus alba/Morus rubra* hibridi su podložniji ovoj bolesti koja se prenosi iz sezone u sezonu. Može se sprečiti sakupljanjem i spaljivanjem zaraženih plodova (*Ercisli i sar., 2010*).

1.1.8. Sadržaj mineralnih elemenata

Više autora je u svojim radovima publikovalo sadržaj makro-, mikro- i toksičnih elemenata u različitim vrstama duda (*Ercisli i Orhan, 2007; Ercisli i sar., 2010*). Istraživanja su pokazala da voće duda sadrži bitne makroelemente kao što su kalijum (K), natrijum (Na) i kalcijum (Ca) kao i mikro-elemente kao što su gvožđe (Fe), cink (Zn) i nikl (Ni) (tabela 1.2.).

Tabela 1.2. Sadržaj mineralnih elemenata u plodu duda sa različitih područja.

mg/100g	<i>Morus nigra L.</i>	<i>Morus rubra L.</i>	<i>Morus nigra L.</i>	<i>Morus rubra L.</i>	<i>Morus alba L.</i>	<i>Morus nigra L.</i>	<i>Morus alba L.</i>
	Turska	Turska	Turska	Turska	Turska	Pakistan	Pakistan
N	800	690	92	82	75	-	-
P	289	242	232	226	247	-	-
K	1005	929	922	834	1668	1270	1731
Ca	137	143	132	132	152	470	574
Mg	108	91	106	115	106	240	240
Na	58	45	59	61	60	272	280
Fe	5	5	4,2	4,5	4,2	77,6	73
Cu	-	-	0,4	0,4	0,5	-	-
Mn	7	5	4,2	4,0	3,8	-	-
Ni	-	-	-	-	-	1,6	2,2
Zn	3	3	3,2	3,2	2,8	59,2	50,2
Literatura	<i>Ercisli i sar., 2010</i>	<i>Ercisli i sar., 2010</i>	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>	<i>Imran i sar., 2011</i>	<i>Imran i sar., 2011</i>

Značajne količine makro- (kalijum, natrijum, kalcijum i magnezijum) i mikro- (gvožđe, cink i nikal) elemenata su pronađene u svim vrstama duda. Sadržaj kalcijuma se kreće od 132 do 534 mg/100g svežeg voća. Sadržaj magnezijuma se kreće od 91 do 240 mg/100g voća dok se

sadržaj natrijuma kreće od 45 do 280 mg/100g standardnom procedurom. Kalijum je najdominantniji element čija se koncentracija kreće u rasponu od 834 do 1731 mg/100g svežeg voća. Sadržaj mikroelemenata u testiranim ekstraktima duda se kreće od 0,4 do 59,2 mg/100g. Gvožđe i cink su mikroelementi zastupljeni u najvećim količinama, dok je bakar najmanje zastupljen.

1.1.9. Sadržaj fenolnih jedinjenja u belom, crvenom i crnom dudu

Fenolna jedinjenja se nalaze u svim delovima biljke dud. Metode izolovanja ovih jedinjenja zavise od količine biljnog materijala i vrste jedinjenja koje se određuju.

Rezultati sprovedeni u različitim regionima o sadržaju fenolnih jedinjenja u dudu (plod, list, koren) prikazani su u tabeli 1.3.

Tabela 1.3. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana i antioksidativna aktivnost ekstrakata belog, crvenog i crnog duda sa različitih područja.

Uzorak	Poreklo	Deo biljke	Rastvarač	Ukupni fenoli	Sadržaj flavonoida	Sadržaj monomernih antocijana	Antioksid. aktivnost	Literatura
<i>Morus alba L.</i>	Koreja	Plod	Etanol	96-257 ^a	0,56-6,54 ^b	13,7-205,7 ^c	90 ^d	<i>Bae i Suh, 2007</i>
	Turska	Plod	Metanol	181 ^a	29 ^e	-	-	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>
	Pakistan	Plod	Metanol	1650 ^f	-	-	95 ^d	<i>Imran i sar., 2011</i>
	Pakistan	Plod	Metanol	775 ^a	-	-	22,85 ^g	<i>Memon i sar., 2010</i>
	Pakistan	List	Metanol	1416 ^a	-	-	48,13 ^g	<i>Memon i sar., 2010</i>
	Srbija	List	Etanol	66,77 ^j	33,30 ^k	-	-	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	Srbija	Koren	Etanol	170,2 ^j	52,29 ^k	-	-	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	Srbija	Plod	Etanol 50%	4,13 ^j	0,89 ^k	-	-	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	Tajvan	Plod	Voda	1515 ^a	250,1 ^e	-	-	<i>Lin i Tang, 2007</i>
<i>Morus</i>	Turska	Plod	Metanol	1035 ^a	219 ^e	-	-	<i>Ercisli i</i>

<i>Morus rubra</i> L.	Turska	Plod	Etanol	215 ^a	-	10,9 ⁱ	442 ^h	<i>Orhan, 2007</i>
	Turska	Plod	Aceton 50%	160,30 ^a	-	9,80 ⁱ	-	<i>Ercisli i sar., 2010</i>
	Turska	Plod	Metanol	1422 ^a	276 ^e	-	-	<i>Ozgen i sar., 2009</i>
<i>Morus nigra</i> L.	Turska	Plod	Metanol	880 ^f	-	-	30 ^d	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>
	Pakistan	Plod	Metanol	661 ^a	-	-	42,57 ^g	<i>Imran i sar., 2011</i>
	Pakistan	List	Metanol	2004 ^a	-	-	65,99 ^g	<i>Memon i sar., 2010</i>
	Turska	Plod	Etanol	169 ^a	-	71,9 ⁱ	748 ^h	<i>Ercisli i sar., 2010</i>
	Turska	Plod	Metanol	1943-2237 ^a	-	-	-	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
	Turska	Plod	Metanol	450 ^a	-	-	95 ^d	<i>Kutlu i sar., 2011</i>
	Turska	Plod	Voda	330 ^a	-	-	75 ^d	<i>Kutlu i sar., 2011</i>
	Turska	Plod	Metanol 50%	580 ^a	-	-	80 ^d	<i>Kutlu i sar., 2011</i>
	Turska	Plod	Aceton 50%	273,7 ^a	-	57,1 ⁱ	-	<i>Ozgen i sar., 2009</i>
	Koreja	Plod	Etanol	867 ^a	-	-	-	<i>Chun i sar., 2011</i>
	Srbija	List	Etanol	115,23 ^j	67,36 ^k	-	-	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	Srbija	Koren	Etanol	186,30 ^j	67,11 ^k	-	-	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	Srbija	Fruit	Etanol 50%	63,7 ^j	1,50 ^k	-	-	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	Brazil	Plod	Metanol 50%	373 ^a	-	-	-	<i>Hassimotto i sar., 2007</i>

^aUkupni fenoli izraženi kao ekvivalent galne kiseline na 100g svežeg voća, ^bFlavonoidi izraženi kao katehin ekvivalent, ^cMonomerni antocijani izraženi kao ekvivalent malvidin-3-glukozid, ^dAntioksidativna aktivnost izražena kao % inhibicije, ^eFlavonoidi izraženi kao ekvivalent kvercetina na 100g svežeg voća, ^fUkupni fenoli izraženi kao ekvivalent taninske kiseline, ^gAntioksidativna aktivnost izražena kao ekvivalent kvercetina, $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$.

^hAntioksidativna aktivnost izražena kao ekvivalent troloksa na 100g, ⁱMonomerni antocijani izraženi kao ekvivalent cijanidin-3-glukozid na 100g, ^jUkupni fenoli izraženi kao ekvivalent hlorogenske kiseline na gram suvog ostatka, ^kFlavonoidi izraženi kao ekvivalent rutina na gram suvog ostatka.

U jednoj od ovih studija (*Bae i Suh, 2007*) ispitivan je sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost pet sorti Belog duda iz Koreje (Pachungsipyung (M-1), Whazosipmunja (M-2), Suwonnosang (M 3), Jasan (M-4) i Mocksang (M-5). Za analizu, voće duda je homogenizovano i ekstrahovano pomoću 70% etanola, 4h na sobnoj temperaturi. Etanolni ekstrakti su pokazali visoku antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost ekstrakata sorti M-2 i M-4 bila je veća u odnosu na ostale sorte belog duda.

U prethodnom ispitivanju, određivan je hemijski sastav belog, crvenog i crnog duda iz istočne Anadolije, region Turske (*Ercisli i Orhan, 2007*). Najveći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida pokazao je crni dud (1422 mgGAE/100g i 276 mgQE/100g, respektivno).

Etanolni ekstrakt crnog duda iz Turske imao je veći sadržaj bioaktivnih komponenti u odnosu na crveni dud (169 i 215 mgGAE/100g, respektivno) (*Ercisli i sar., 2010*). Sa druge strane, u drugom ispitivanju, crni dud iz Turske pokazao je veći sadržaj fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu (1943-2237 mgGAE/100g) (*Ercisli i Orhan, 2008*).

Ispitivana su antioksidativna svojstva tri ekstrakta crnog duda iz Turske (*Kutlu i sar., 2011*). Posle ekstrakcije zakiseljenim metanolom, zakiseljenom vodom i nezakiseljenim rastvorom metanola 50%, fenolni sadržaj bio je 450, 330 i 580 mgGAE/100g, respektivno.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u antocijanima bogatim vrstama ploda duda ubranim u Turskoj (*Morus nigra L.* i *Morus rubra L.*) bio je 273,7 i 160,3 mgGAE/100g, respektivno (*Ozgen i sar., 2009*).

U prethodnoj studiji o dudu koji je ubran u severnom regionu Pakistana, plodovi belog i crnog duda su očišćeni, sušeni, presovani i prebačeni u zatamljene staklene boce i čuvani u zamrzivaču do analize (*Imran i sar., 2011*). Zatim je osušeno voće ekstrahovano metanolom. Dobijeni sirovi ekstrakti su filtrirani i uparavani u vakuumu do suva. Ukupni sadržaj fenola je određivan Folin-Ciocalteu metodom korišćenjem taninske kiseline kao standarda. Antioksidativna aktivnost određivana je pomoću DPPH testa (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (*Everett, 1960*). Plod i list belog i crnog duda iz Pakistana su liofilizirani na -30°C a zatim ekstrahovani metanolom (*Memon i sar., 2010*) (tabela 1.3.).

Za određivanje ukupnih fenola, plod crnog duda ubran u Koreji, potopljen je u 70% rastvor etanola u roku 4h , a zatim je vršena filtracija. Proces je ponovljen dva puta na sobnoj temperaturi (*Chun i sar., 2011*).

Uzorci lišća i korena crnog duda iz Srbije su prirodno sušeni mesec dana pre ekstrakcije, samleveni u blenderu a zatim ekstrahovani u 70% rastvoru etanola na 30°C. Uzorci su čuvani u polietilenskim kesama na -20°C do analize (*Radojković i sar., 2012*).

Uzorak crnog duda iz Brazila ekstrahovan je tri puta sa po 100 ml rastvorom methanol-voda-sirčetna kiselina (70:25:5 v/v) u toku 2 minuta u ledenom kupatilu a zatim je određivan ukupni sadržaj fenola (*Hassimotto i sar., 2007*). Ukupni sadržaj fenola belog duda sa Tajvana određivan je Folin-Ciocalteu metodom (*Lin i Tang, 2007*) rezultati su prikazani u tabeli 1.3.

1.1.10. Izolovana jedinjenja HPLC analizom

Fenolna jedinjenja koja su izolovana iz različitih delova duda (plod, list, koren, stablo), a zatim identifikovana HPLC analizom prikazana su u tabeli 1.4.

Tabela 1.4. Jedinjenja izolovana iz duda (plod, list, koren, stablo) HPLC analizom.

JEDINJENJE	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Morus rubra</i> L.	<i>Morus alba</i> L.	LITERATURA
Cijanidin- 3-O-β-D-glukopiranozid	-	-	+	<i>Du i sar., 2008</i>
Cijanidin-3-O-β-D-galaktopiranozid	-	-	+	<i>Du i sar., 2008</i>
Cijanidin- 7-O-β-D-glukopiranozid	-	-	+	<i>Du i sar., 2008</i>
Cijanidin-3-glukozid	+	-	-	<i>Perez-Gregorio i sar., 2011</i>
	+	-	+	<i>Pawlowska i sar., 2008</i>
	+	-	-	<i>Hassimotto i sar., 2007</i>
Kvercetin-3-O-ramnozid-7-O-glukozid	-	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>
Kvercetin-3-7-D-O-β-O-glukopiranozid	-	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>
Kaempferol-7-O-glukozid	-	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>
Kaempferol-3-O-rutinozid	+	-	+	<i>Pawlowska i sar., 2008</i>
Kaempferol	-	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
Rutin	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>

	-	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
	+	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>
	+	+	+	<i>Isabelle i sar., 2008</i>
	+	-	+	<i>Radojković i sar., 2012</i>
Kvercetin	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
	+	-	+	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	-	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
	+	+	+	<i>Isabelle i sar., 2008</i>
Katehin	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
Kvercetin-3-O-glukozid	+	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>
Kvercetin-3-O-rutinozid	+	-	-	<i>Perez-Gregorio i sar., 2011</i>
Taksifolin	+	-	-	<i>Mazimba i sar., 2011</i>
Hlorogenska kiselina	+	-	+	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
	+	+	+	<i>Gungodgu i sar., 2011</i>
	-	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
	+	-	+	<i>Radojković i sar., 2012</i>
p-kumarinska kiselina	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
	+	-	+	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
m-kumarinska kiselina	+	-	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
	+	-	+	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
o-kumarinska kiselina	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
Vanilinska kiselina	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
	+	-	+	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
Galna kiselina	+	-	+	<i>Radojković i sar., 2012</i>
	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
	-	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
	+	-	+	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
Kafena kiselina	-	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
	+	+	+	<i>Gundogdu i sar., 2011</i>
	-	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>

Ferulna kiselina	+	-	+	<i>Chu i sar., 2006</i>
	+	-	+	<i>Radojković i sar., 2012</i>
Kriptohlorogenska kiselina	-	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>
Neohlorogenska kiselina	-	+	+	<i>Thabti i sar., 2012</i>

Iz belog duda koji je ubran u Kini izolovana su sledeća jedinjenja: cijanidin-3-O-β-D-glukopiranozid, cijanidin-3-O-β-D-galaktopiranozid i cijanidin-7-O-β-D-glukopiranozid (*Du i sar., 2008*). Cijanidin-3-glukozid i kvercetin-3-O-rutinozid izolovani su iz crnog duda koji je ubran u Španiji (*Perez-Gregorio i sar., 2011*), dok su HPLC-PDAESI-MS analizom crnog i belog duda iz Poljske izolovani cijanidin-3-glukozid i kaempferol-3-O-rutinozid (*Pawlowska i sar., 2008*).

Crveni i beli dud iz Tunisa su analizirani injektiranjem rastvora poznate koncentracije hlorogenske kiseline (250 µg/ml), kafene kiseline (100 µg/ml), rutina (235 µg/ml) i kvercetina (200 µg/ml) (*Thabti i sar., 2012*). Hlorogenska i kafena kiselina su odabrane zato što su već bile identifikovane sa svojim derivatima u ekstraktima crvenog i belog duda. Rutin je korišćen kao ekvivalent za kvantifikaciju kvercetina i kaempferol-diglikozida. Kaempferol derivati se razlikuju od kvercetin derivata samo po položaju hidroksilne grupe u položaju 3' flavanskog prstena. Za kvantifikaciju monoglikozid derivata kvercetina i kaempferola kao standard korišćen je kvercetin (*Thabti i sar., 2012*).

HPLC metoda, kao primarna analitička metoda, primenjivana je za analizu flavonoida, kumarina i hlorogenske kiseline u plodu, kori i lišću belog duda iz Kine iz kog su izolovani kamepferol, rutin, hlorogenska i galna kiselina (*Chu i sar., 2006*). Ova analitička metoda korišćena je, takođe, za izolovanje rutina, kvercetina, katehina, hlorogenske, kafene, galne, vanilinske kiseline i m- i o-kumarinske kiseline iz ekstrakata crnog, crvenog i belog duda iz Turske (*Gundogdu i sar., 2011*). Kvercetin i rutin su takođe izolovani iz belog, crvenog i crnog duda iz Kine (*Isabelle i sar., 2008*).

Beli i crni dud iz Srbije sadrži rutin, kvercetin i fenolne kiseline: galnu, kafenu, hlorogensku, vanilinsku, ferulnu, dihidroksibenzoevu i p-kumarinsku kiselinu (*Radojković i sar.,*

2012). Hlorogenska, p- i m-kumarinska, vanilinska, galna i ferulna kiselina izolovane su iz ploda i lista belog i crnog duda iz Pakistana (*Memon i sar.*, 2010).

1.1.11. Antimikrobnna aktivnost duda

Antimikrobnna aktivnost jedinjenja izolovanih iz različitih delova belog i crnog duda prikazana je u tabeli 1.5.

Tabela 1.5. Antimikrobnna aktivnost jedinjenja izolovanih iz različitih delova duda (MIC=minimum inhibitorne koncentracije).

UZORAK	JEDINJENJE	DEO BILJKE	AKTIVNOST	MIC (µg/ml)	LITERATURA
<i>Morus alba</i> L.	Kuvanon G	Koren	<i>Streptococcus mutans</i>	8	<i>Park i sar., 2003</i>
			<i>Streptococcus sanguis</i>	8	
			<i>Streptococcus sobrinus</i>	8	
			<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	125	
			<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	1000	
			<i>Candida albicans</i>	1000	
			<i>Lactobacillus acidophilus</i>	>1000	
			<i>Lactobacillus casei</i>	>1000	
<i>Morus alba</i> L.	Mulberofuran G	Koren	<i>Candida albicans</i>	>60	<i>Sohn i sar., 2004</i>
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>60	
			<i>Escherichia coli</i>	30	
			<i>Salmonella typhimurium</i>	7,5	
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,25	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	5	
<i>Morus alba</i> L	Albanol B	Koren	<i>Candida albicans</i>	>60	<i>Sohn i sar., 2004</i>
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>60	
			<i>Escherichia coli</i>	20	
			<i>Salmonella typhimurium</i>	5	
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	

			<i>Staphylococcus aureus</i>	5	
<i>Morus alba</i> L.	Halkomoracin	List	<i>Micrococcus luteus</i>	1,56	<i>Sohn i sar., 2004</i>
			<i>Bacillus subtilis</i>	3,13	
			<i>Escherichia coli</i>	>100	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	
<i>Morus nigra</i> L.	Ukupni ekstrakt	Stabljika	<i>Staphylococcus aureus</i>	125	<i>Mazimba i sar., 2011</i>
			<i>Bacillus subtilis</i>	125	
			<i>Micrococcus flavus</i>	500	
			<i>Streptococcus faecalis</i>	500	
			<i>Salmonella abony</i>	250	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	
<i>Morus nigra</i> L.	Ukupni ekstrakt	Kora	<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5	<i>Mazimba i sar., 2011</i>
			<i>Bacillus subtilis</i>	62,5	
			<i>Micrococcus flavus</i>	250	
			<i>Streptococcus faecalis</i>	250	
			<i>Salmonella abony</i>	125	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	
<i>Morus nigra</i> L.	Ukupni ekstrakt	Voćni sok	<i>Bacillus spizizenii</i>	19,68	<i>Khalid, 2011</i>
			<i>Bacillus subtilis</i>	18,46	
			<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	15,57	
			<i>Enterococcus faecalis</i>	16,03	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	17,37	
			<i>Escherichia coli</i>	9,98	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,87	
			<i>Salmonella typhimurium</i>	11,73	

Oksiresveratrol, arilbenzofuran moracin M2, ciklomorusin, morusin, kuvanon C5, kuvanon C6, betulinska kiselina, α -amirini acetat i β sitosterol-3-O- β -D-glukozid su izolovani iz

stablike crnog duda iz Bocvane (*Mazimba i sar.*, 2011). Oksiresveratrol i arilbenzofuran moracin M2 pokazali su baktericidnu aktivnost prema *Staphylococcus aureus* (minimalna baktericidna koncentracija (MBC) = (125 i 62,5) µg/mL, respektivno); arilbenzofuran moracin M2 pokazao je, takođe, baktericidno dejstvo prema *Streptococcus faecalis* (MBC = (500 i 250) µg/mL, respektivno) (*Mazimba i sar.*, 2011). Antibakterijski test je vršen za različite mikroorganizme kao što su *Staphylococcus mutant* ATCC 25175, poznat kao oralni patogen, *Streptococcus sanguis* ATCC 35105, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27351, *Staphylococcus aureus* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 10231, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 4646 i *Porphyromonas gingivalis* W50.

Antibakterijska aktivnost kuvanon G je ispitivana u smislu minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) u poređenju sa nekim komercijalno dostupnim sredstvima koja se koriste za kontrolu karijesa. MIC kuvanona G protiv *Streptococcus* bila je 8 µg/ml što je manje u odnosu na 32 µg/ml sanguinarina, 125 µg/ml karvakrola i 500 µg/ml timola i eukaliptola koji su komercijalni agenti sa antibakterijskom aktivnošću. Ovo ukazuje da kuvanon G ima mnogo jaču antibakterijsku aktivnost u odnosu na komercijalne agente. Antibakterijska aktivnost kuvanona se može uporediti sa antibioticima kao što su vankomicin i hlorheksidin koji, međutim, poseduju štetnu stranu tako što dovode do promene boje zuba, povraćanja, dijareje, pada imuniteta (*Park i sar.*, 2003). Druga jedinjenja koja su izolovana iz duda sa antibakterijskom aktivnošću prikazana su u tabeli 5 (*Sohn i sar.*, 2004; *Fukai i sar.*, 2005; *Khalid*, 2011).

1.1.12. Lekovita svojstva duda

Glavna upotreba duda je, globalno, za ishranu svilenih crva, ali u zavisnosti od lokacije, često je cenjen zbog svog ploda koji se može konzumirati svež, u vidu soka ili džema, kao ukusno povrće (mladi listovi i peteljke) i u medicinske svrhe (čaj od lišća) (*Maslimani i sar.*, 2008).

Voće duda koristi se za mnoge medicinske svrhe jer hrani kožu i krv, kod bolesti jetre i bubrega. Takođe, korist se za lečenje urinarnih infekcija, zujanja u ušima, vrtoglavice, zatvora kod starijih osoba, anemije, za lečenje bola u grlu, groznice i depresije (*Darias-Martin i sar.*, 2003). Sok iscedeđen iz ploda duda, ima delikatan ukus i miris. Od ploda duda može se napraviti

vino koje je slatkog i kiselog ukusa i koristi se za čišćenje krvi. Mnogi smatraju da jedna čaša ovog vina dnevno poboljšava zdravlje tako što čisti organizam od nečistoća i omogućuje izbacivanje fekalnih ostataka u crevima. Pored toga, plodovi duda su bogati antocijanima koji predstavljaju osnovni izvor antioksidativne aktivnosti (*Elmaci i Altug, 2002; Katsube i sar., 2006; Asano i sar., 1994; Chen i sar., 2006; Zhang i sar., 2011; Du i sar., 2003; Naderi i sar., 2004*). Aktivni biomolekuli različitih vrsta duda su Kvanon I, Kvanon I heksametil-etal, Kvanon I oktametil-etal, 2'-hidroksi-2,4,4'-trimetoksihalkon i 2'-hidroksi-3'prenil-2,4,4'-trimetoksihalkon III, Mulberofuran T i Kwanon E, morusin, mulberofuran D, G, K , kvanon G, H, Mulberozid A, Cis-mulberozid A, Oksiresveratrol, Izokvercetin, moracin E, F, G and H, Kwanon D, E, F, Deoksinojirimicin-1 itd. iz plodova, lišća, korena i kore belog duda (*Rastogi i Mehrotra, 1990*). Ovi molekuli imaju lekovita svojstva kao što su adstringentno, anti-HIV, antiinflamatorno, antidiaforetično, purgativno itd. (*Asano i sar., 1994; Chen i sar., 2006; Zhang i sar., 2011; Du i sar., 2003*). Iz korena crvenog duda izolivani su rubraflavoni A, B, C, D koji deluju kao laksativi, purgativi, protiv urinarnih infekcija i slabosti. Iz korena, lišća i ploda crnog duda izolovan je deoksinojirimicin koji se koristi u lečenju dijabetesa, side, kancera i visokog arterijskog pritiska. Takođe se koristi kao purgativ (*Sohn i sar., 2004; Duke, 1992; Ahmad i sar., 1985; Liu i sar., 2009; Wrolstad, 2001*).

1.1.13. Upotreba duda

U svetu dud se najviše koristi kao stočna hrana. Pored lišća, dud ima sladak plod dobrog ukusa i mirisa sa hranljivim elementima od vitalnog značaja za ljudski metabolizam. Dud voće može da se koristi za pravljenje džema, voćnog soka, želea, celuloze, voćnog sosa i torte (www.tytyga.com, 2009). Na kineskom tržištu dud se često konzumira u obliku paste "sangshengao". Ova pasta se meša sa topлом vodom kako bi se napravio čaj koji poboljšava funkcionisanje jetre i bubrega (www.itmonline.com, 2009; *Kim i sar., 1996*). Voće duda se može sušiti i čuvati kao prah. Oko 10g sušenog voća može dati 100mg antocijana. Zbog sadžaja resveratrola voće duda ima antimutageno dejstvo i može da inhibira mutaciju zdravih i normalnih ćelija u kancerogene ćelije (www.itmonline.com, 2009). Veruje se da može da spreči bolest srca, kancer i druge bolesti koje su povezane sa hroničnim zapaljenjima. Plod u prahu ima anti-aging efekat jer se bori protiv slobodnih radikala. Takođe, održava normalan nivo holesterola i ugljenih hidrata u ljudskom telu (*Liu i sar., 2009*). Prezrelo i kiselo voće može da

se konvertuje u vino koje ima sladak i kiseo ukus. Koristi se za poboljšanje opšte vitalnosti organizma. U Azerbejdžanu, Gruziji i Jermeniji popularan je liker “tut araghi” koji se konzumira za povećanje potencije. On je jedna od nacionalnih Azerbejdžanskih oblika vodke. Veruje se da mala doza ovog pića štiti želudac i srce od bolesti. U Grčkoj se plod duda koristi za proizvodnju tradicionalnog, aromatičnog pića “mouro distillate”. U Evropi je popularno da dame piju vino od voća duda (www.eHow.com). Pošto je voće duda bogato antocijanima, zaslužuje da bude eksplorativano za proizvodnju prirodnih boja koje se koriste u prehrambenoj industriji. Konkretno, voće duda sadrži cijanin koji je crveni pigment i koji daje crvenu do ljubičastu boju voću. Glavni antocijani koji su pronađeni su cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinoid. Ovi pigmenti se mogu koristiti kao dijetetski modulatori mehanizma kod raznih bolesti i kao prirodna obojena hrana jer postoji potražnja za prirodnim kolorantima u prehrambenoj industriji (Wrolstad, 2001). Voće duda može se koristiti kao stočna hrana preživara (Kim i sar., 1996) i u farmaceutskoj industriji (Habib, 2004). Jedina upotreba duda u modernoj medicine je za pripremanje sirupa koji se dodaju kao prirodne boje lekovima (Singhal i sar., 2009).

1.2. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je metoda razdvajanja komponenata iz smeše u cilju prečišćavanja, a radi lakše identifikacije ili određivanja sadržaja. Cilj i zadatak ekstrakcije je da se korisna komponenta koja se nalazi u materiji, pomoću pogodnog rastvarača izoluje, odnosno rastvara, a nakon toga odstranjenjem rastvarača, dobije u čistom stanju.

Ekstrakcija iz neke čvrste materije zasniva se na difuziji korisne komponente iz unutrašnjosti same noseće materije u rastvarač koji je u stalnom dodiru sa materijom i selektivan je prema korisnoj komponenti. Difuzija traje sve dok postoji razlika u koncentraciji (Δx) korisne komponente u samoj nosećoj materiji i rastvaraču. U momentu dodira čestice materije sa rastvaračem, sva korisna komponenta se nalazi u unutrašnjosti čestice. Njena koncentracija je tu maksimalna (x_g), dok u rastvaraču je jednak nuli (x_0). Nakon kratkog vremena, zbog postojanja razlike koncentracije ($\Delta x = x_g - x_0$) započinje difuzija korisne komponente u rastvarač kroz granični sloj. Pogonska sila ekstrakcije je prema tome, razlika koncentracije korisne komponente u samoj materiji i rastvaraču (Δx).

Na brzinu ekstrakcije utiču:

- Veličina dodirne površine rastvarača i čestice materije;
- Debljina graničnog sloja oko čestice i
- Temperatura sistema.

Ekstrakcija je vrlo efikasna, brza popularna tehnika razdvajanja (i koncentrovanja) supstanci. Primjenjuje se kako za razdvajanje supstanci prisutnih u vrlo niskim koncentracijama tako i za razdvajanje supstanci prisutnih u makrokoličinama. Razdvajanja su čista, problemi kod ekstrakcije nisu jako izraženi, a dobijeni ekstrakt se vrlo često može direkno upotrebiti za određivanje izdvojene komponente.

Hemiska analiza kompleksnih uzoraka često zahteva odvajanje analita od matrice uzorka, odnosno ekstrakciju. To je operacija potpunog ili delimičnog odvajanja smese na temelju različitih rastvorljivosti u pojedinim rastvaračima. Efikasnost ekstrakcije zavisi od polarnosti rastvarača ili smeše rastvarača. U idealnom slučaju postupak ekstrakcije trebao bi biti jednostavan, brz, jeftin, trebao bi dati kvantitativne analitičke rezultate bez gubitaka ili razgradnje analita i trebao bi dati rastvor analita koji je dovoljno koncentrovan (Raynie, 2000).

Za ekstrakciju aromatičnog i lekovitog bilja u farmaciji se najčešće koristi smeša etanol – voda kao ekstragens, jer etanol u malim količinama ne deluje štetno na ljudski organizam. Smeša etanol – voda je pretežno polaran ekstragens, pa se iz biljnog materijala mogu ekstrahovati polarne komponenete u koje spadaju fenoli, flavonoidi, kumarini, stilbeni, antrahinoni i dr. Sa druge strane veći sadržaj etanola u smeši omogućava i ekstrakciju nepolarnih komponenata (npr. etarska ulja), pa su proizvodi (ekstrakti) dobijeni primenom navedenog ekstragensa u pogledu hemijskih karakteristika kompletniji. Konkretno, primenom smeše etanol – voda dobijaju se tečni ekstrakti (*Extracta fluida*), koji služe dalje za dobijanje gustih ekstrakata (*Extracta spissa*) i suvih ekstrakata (*Extracta sicca*) (Lepojević, 2000).

Ekstrakcija može biti jednosepena (*maceracija*) ili višestepena (*remaceracija*).

Prema najjednostavnijem mehanizamu, proces ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljne sirovine odigrava se kroz dve faze:

Ispiranje (brza ekstrakcija), kada neposredno po potapanju biljnog materijala u rastvarač dolazi do brzog spiranja i rastvaranja ekstraktivnih materija iz biljnih ćelija koje se nalaze na površini čestica biljnog materijala i čija brzina zavisi uglavnom od njihove rastvorljivosti u rastvaraču i hidrodinamičkih uslova u suspenziji.

Unutrašnja difuzija (spora ekstrakcija), kada dolazi do prenosa mase ekstraktivnih materija iz nerazorenih ćelija u unutrašnjost čestica biljnog materijala prema rastvoru. Ovaj prenos mase kroz čestice biljnog materijala, natopljenog rastvorom, i graničnog sloja rastvora oko čvrstih čestica vrši se difuzijom.

Zatim se vrši filtracija, centrifugiranje i sušenje. Za ekstrakciju čvrstih supstanci treba povećati dodirnu površinu između faza (usitnjavanjem). Za povećanje količine supstanci, potrebno je produžiti vreme trajanja procesa ekstrakcije.

Moguće metode ekstrakcije su:

- Ekstrakcija rastvaračem;
- Ekstrakcija tečno-tečno;
- Ekstrakcija čvrsto-tečno;
- Superkritična ekstrakcija;
- Ekstrakcija mikrotalasima;
- Soxlet ekstrakcija i
- Ekstrakcija uktrazvukom.

U ovom radu korišćene su dve metode ekstrakcije: ekstrakcija čvrsto-tečno i ekstrakcija ultrazvukom.

1.2.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno

Čvrsto-tečnu ekstrakciju definišu opšti zakoni prenosa mase (Lepojević, 2000). U opštem slučaju proces prenosa mase predstavlja prenos materije u smeru uspostavljanja ravnoteže (Pekić i Miljković, 1980). Proces difuzije je odgovoran za proces prenosa mase, tj. molekulska difuzija se ostvaruje usled koncentracionog gradijenta rastvorenih materija u fazama koje su u kontaktu, kao i usled haotičnog kretanja molekula materije određene kinetičke energije (Tolić, 1996). Porastom temperature raste i kinetička energija molekula, te će i brzina kretanja biti veća, a samim tim kao rezultat se javlja pozitivan uticaj na brzinu difuzije. Kako sistem ima težnju da uspostavi termodinamičku ravnotežu, molekuli materije koja difunduje kretaće se haotično sa mesta veće na mesto manje koncentracije.

Na brzinu difuzije takođe utiče molekulska masa jedinjenja koje difunduje, debljina sloja kroz koji difunduje, kao i veličina dodirne površine faza. Ukoliko je površina kontakta veća, a debljina sloja manja, difuzija je brža.

Uticaj pojedinih faktora na proces difuzije matematički je definisana prvim Fikovim zakonom difuzije. Ovaj zakon se odnosi na stacionarni proces difuzije, pri čemu je koncentracija materije u jednoj tački sistema konstantna. Drugi Fikov zakon difuzije predstavlja proces nestacinarne difuzije, kojim se izražava promena koncentracije materije koja difunduje u određenoj tački sistema sa vremenom (Lepojević, 2000; Pekić i Miljković, 1980).

Pri ekstrakciji aktivnih principa iz biljaka prisutni su sledeći koeficijenti prenosa mase: koeficijent unutrašnje difuzije (D_u), koeficijent slobodne difuzije (D_s) i koeficijent turbulentne difuzije (E_D).

Na tok ekstrakcije utiču sva tri koeficijenta, dok je sumarni koeficijent prenosa mase (K), koju opisuje sam proces izražen jednačinom:

$$K=1/(l/E_D+l/D_u+s/D_s) \quad 1.1.$$

gde je:

l – prečnik čestica,

s – debljina graničnog sloja.

Operacija čvrsto-tečne ekstrakcije ima dva perioda, brzu i sporu ekstrakciju. Neposredno pre ekstrakcije vrši se usitnjavanje osušenog biljnog materijala. Pri ekstrakciji usitnjenog biljnog materijala dolazi do kvašenja, rastvaranja i brzog prenos mase iz razorenih ćelija (brza ekstrakcija) i period spore difuzije rastvorenih supstancija iz nerazorenih ćelija. Prva faza ekstrakcije teče nekoliko puta brže od druge i zavisi od hidrodinamičkih uslova, kao i od stepena usitnjenosti biljnog materijala. Druga faza ekstrakcije zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala (koeficijent unutrašnje difuzije D_u).

1.2.2. Ekstrakcija ultrazvukom

Ultrazvučna ekstrakcija jednostavan je postupak koji uključuje upotrebu zvučnih talasa kako bi se ekstrahovao uzorak uronjen u organskom rastvaraču. Uzorak sa odgovarajućim rastvaračem stavlja se u ultrazvučno kupatilo. Ultrazvučna ekstrakcija omogućava delotvorniju ekstrakciju od mućkanja i Soxhlet ekstrakcije. Uzrok povećanoj delotvornosti ultrazvučne ekstrakcije je mnogo bolji kontakt između čvrste komponente i rastvarača. Ultrazvuk je po definiciji zvuk iznad gornje granice čujnosti za normalno ljudsko uho. Ljudsko uho čuje frekvencije između 20 Hz i 20 kHz. Titraji ispod 20 Hz nazivaju se infravukom, a titraji iznad 20 kHz ultravukom. To široko područje se uglavnom deli na dva područja koja određuju potencijalnu primenu ultrazvuka. Ako je primenjena frekvencija visoka, govorimo o dijagnostičkom ultrazvuku niske energije (1 do 10 MHz), a ako je frekvencija niska, govorimo o ultrazvuku visoke energije (20 do 100 kHz). Dijagnostički ultrazvuk ne uzrokuje fizičke niti hemijske promene.

Za razliku od elektromagnetskih talasa, ultrazvuk se ne može širiti kroz vakuum. Prilikom širenja zvučnog talasa kroz rastvor nastaju longitudinalni talasi što dovodi do naizmeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije. Ekspanzijom se molekuli udaljavaju, a kompresijom približavaju, pri čemu dolazi do lokalizovane promene pritiska u rastvoru. Mehurići rastu usled difuzije para u njihovu unutrašnjost, pa uvek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tokom faze kompresije. Kada mehurići dosegnu kritičnu veličinu ne mogu efikasno apsorbovati energiju, odnosno energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinska faza, pa u mehurićima dolazi do brze kondenzacije. Kritična veličina mehurića zavisi od primenjene frekvencije i medija koji se tretira. Mehurići implodiraju u manje od mikrosekunde, pa se kondenzovani molekuli sudaraju velikom brzinom pri čemu nastaju šok talasi. Ovi šok talasi

uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i pritiske (do 100 MPa), što dovodi do menjanja fizičko hemijskih svojstava lokalnih molekula.

Zbog toga, u bilo kojem vremenu temperatura rastvora jednaka je sobnoj temperaturi, pa se ovaj fenomen zbog toga naziva i „hladno vrenje” (*Drljača, 2009*).

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine, pokretanjem tečnosti, mlazom plina ili na najčešće upotrebljavan način pomoću električne snage. Generator pretvara napon jednakosmerne struje u visoke frekvencije od približno 25 kHz (25000 ciklusa po sekundi) električne energije. Električna ili mehanička energija se pretvara u energiju zvuka pomoću ultrazvučnih pretvarača (*Drmić i Režak, 2010*).

Ultrazvučna kupatila (slika 1.2.) se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupnai relativno su jeftina. Ultrazvučna kupatila rade na frekvenciji od 20-40 kHz. Prednosti postupka ultrazvučne ekstrakcije su njena relativna brzina, jednostavnost, smanjenje čestica, ubrzani prenos mase i to što ne zahteva skupe instrumente, a nedostaci veliki volumen rastvarača i moguća potreba višestruke ekstrakcije. Ekstrakti se nakon završene ekstrakcije moraju filtrirati (*Drmić i Režak, 2010*).



Slika 1.2. Ultrazvučno kupatilo.

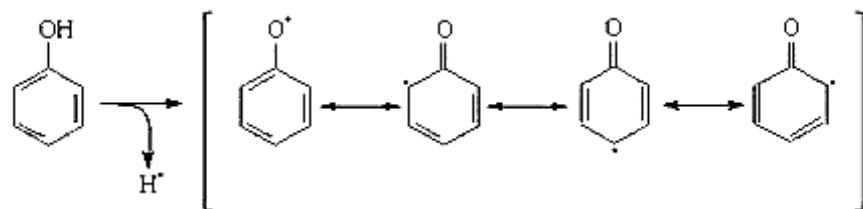
Usitnjavanje biljnog materijala je takođe veoma značajan korak u pripremi sirovine pre operacije ekstrakcije. Najčešće se izvodi mlevenjem do određenog stepena usitnjjenosti, što svakako zavisi od vrste biljne sirovine i samog postupka ekstrakcije. Operacijom usitnjavanja biljnog materijala narušava se njegova struktura i povećava površina kontakta za razmenu mase, a samim tim poboljšava prenos mase. Takođe izborom odgovarajućeg rastvarača može se postići visok stepen selektivnosti ekstrakcije (*Milošević, 2011*).

1.3. FENOLNA JEDINJENJA

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 opršivanje cvetova 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 1.3.)



Slika 1.3. Rezonantna stabilizacija fenoksi radikala.

Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu biljnih metabolita koja mogu biti vrlo jednostavne strukture, kao što su fenolne kiseline, ili vrlo složene strukture, odnosno, polikondenzovana jedinjenja kao što su proantocijanidoli. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Do danas je identifikovano više od hiljadu, u slobodnom obliku ili češće u obliku glikozida (Leucuta i sar., 2005). Monosaharidi koji najčešće ulaze u sastav glikozida su: glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza, glukuronska i galakturonska kiselina, pored toga šećeri mogu biti

prisutni u obliku: mono-, di-, tri-, ili tetra-saharida. Najveću grupu fenolnih jedinjenja čine flavonoidi. Tabela 1.6. predstavlja najvažnije klase fenolnih jedinjenja.

Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline (derivati benzoeve i cimetne kiseline), flavanoli, flavonoidi i dihidrohalkoni.

Fenoli imaju kiseo karakter usled disocijacije hidroksilne grupe. Oni su slabo reaktivna jedinjenja i obično grade vodonične veze. Druga njihova veoma važna osobina je da mogu da grade komplekse sa teškim metalima. Takođe se mogu lako oksidovati i mogu graditi polimere tamne boje. Tamnjene biljnih delova na mestu preseka je posledica ovih reakcija kojima podležu fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja se veoma retko nalaze slobodna u biljnim ćelijama. Ona se najčešće kupljuju sa drugim molekulima, kao što su ostaci šećera (glikozidi), ostaci sumporne kiseline i sirčetne kiseline.

Fenolna jedinjenja su toksična u obliku aglikona (slobodnom obliku), njihova toksičnost se smanjuje kada se vežu sa drugim molekulima. Zaštitna uloga fenolnih jedinjenja se može objasniti činjenicom da na mestu oštećenja biljke dolazi do porasta sinteze fenolnih jedinjenja koja se nagomilavaju na mestu oštećenja u obliku polimerne mase. Glikozidacija flavonoida ima važan ekološki značaj. Oni štite biljke od različitih insekata i drugih štetočina. Mnoga fenolna jedinjenja imaju ulogu fungicida i pesticida.

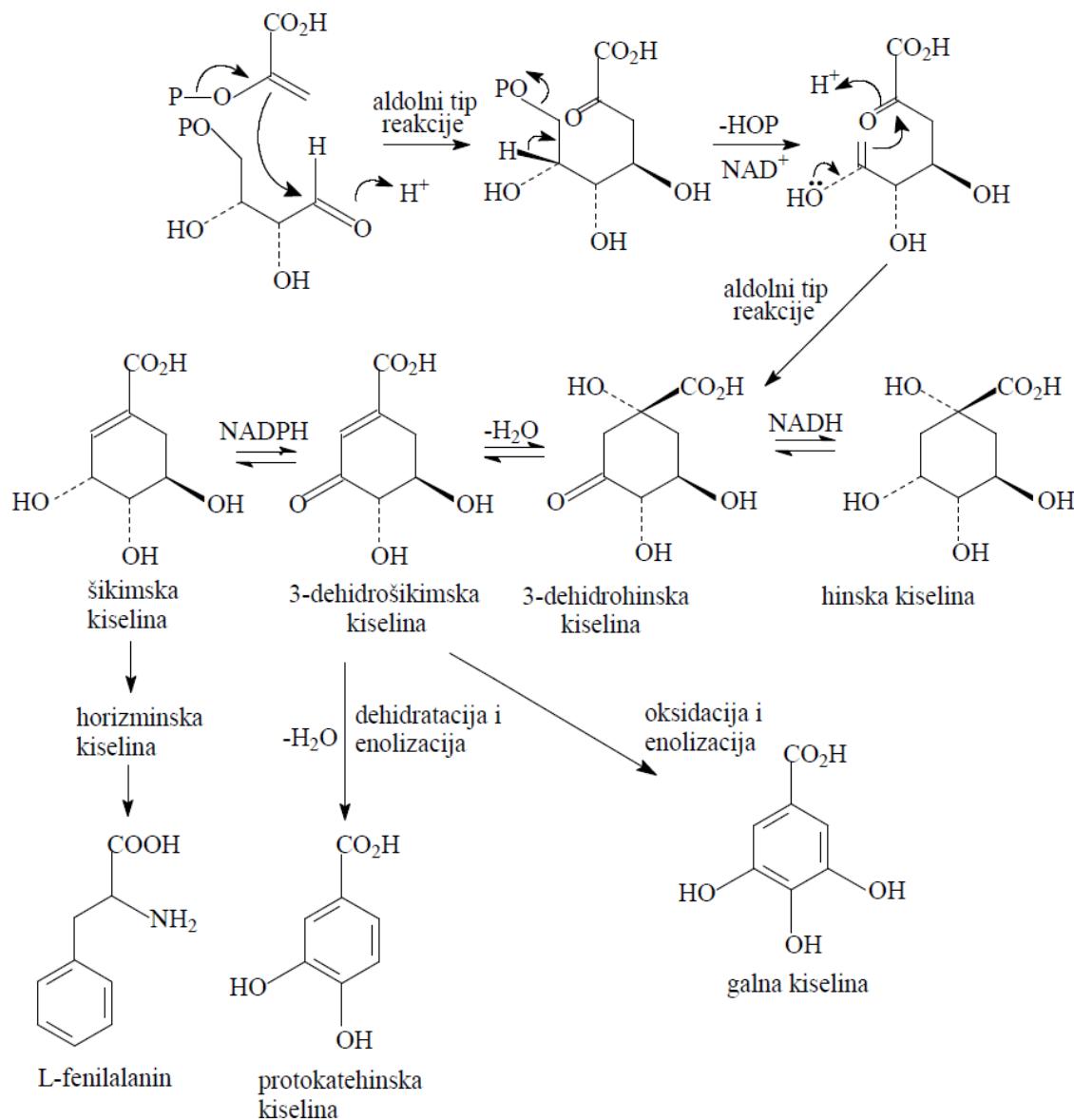
U tabeli 1.6. prikazane su najvažnije klase fenolnih jedinjenja.

Tabela 1.6. Najvažnije klase fenolnih jedinjenja.

Broj C-atoma	Osnovni skelet	Klasa	Jedinjenje
6	C ₆	Prosti fenoli, Benzohinoni	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
7	C ₆ - C ₁	Fenolne kiseline	p-hidroksibenzoeva kiselina
8	C ₆ - C ₂	Fenilsirćetne kiseline	p-hidroksifenilsirćetna
9	C ₆ - C ₃	Cimetne kiseline	Kafena kiselina, ferulna kiselina
		Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
		Kumarini	Umbeliferon, skopolin
		Hromoni	Eugenin
10	C ₆ - C ₄	Naftohinoni	Juglon
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	Hantoni	Mangostin, magniferin
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	Stilbeni,	Razveratrol
		Antrahinoni	Apigenin, luteolin, sinensitin, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Flavanoli	Dihidrokvarcetin I dihidrokamferol glikozidi
		Flavanoni	Hesperidin, naringenin
		Flavanon glikozidi	Hesperidin, neohesperidin, narirutin, naringinin, eriocitrin
		Antocijanini	Glikozidi peralgonidina, peonidina, delfnidina, petunidina, cijanidina
		Katehini	Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin
		Halkoni	Floridin, arbutin, halkonarigenin
18	(C ₆ - C ₃) ₂	Lignani, neolignani	Pinorezinol
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon, amentoflavon

1.3.1. Biosinteza fenolnih jedinjenja

Metabolički put šikimske kiseline predstavlja glavni hemizam biosinteze fenolnih jedinjenja u biljkama, pri čemu pored nastajanja aromatičnih aminokiselina kao međuproizvoda nastaje galna, protokatehinska i cimetna kiselina (Slika 1.4.).

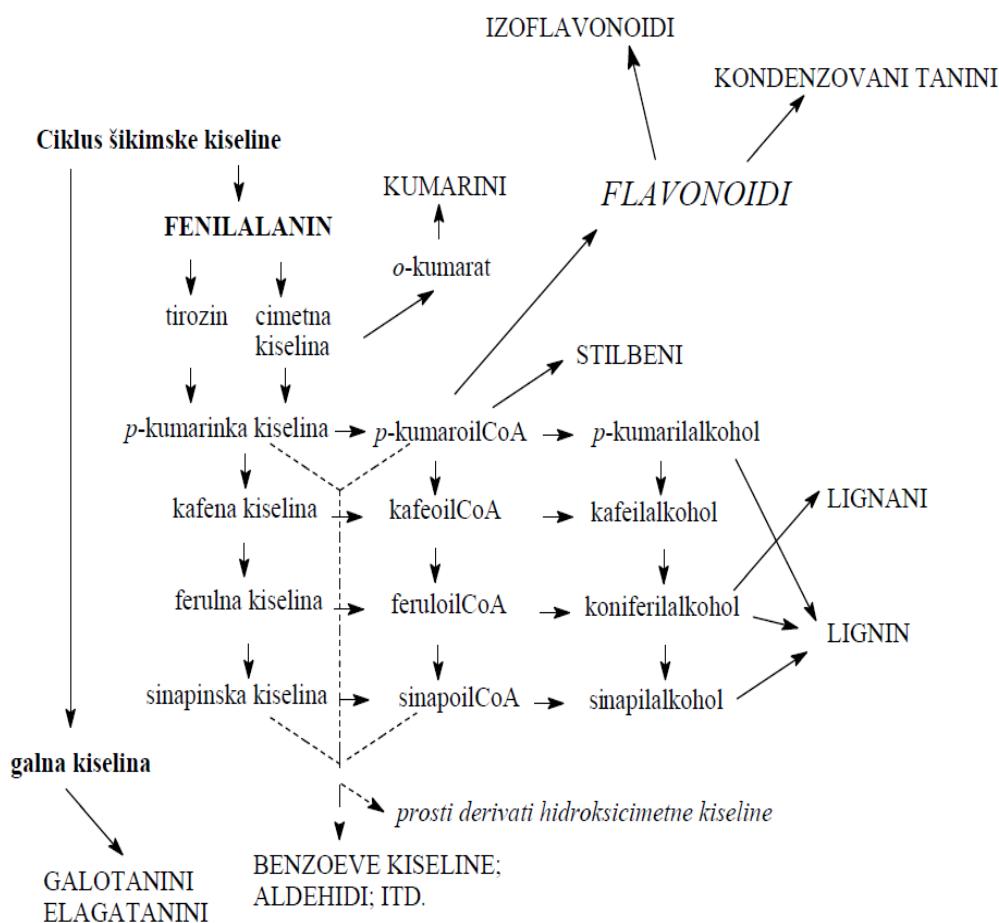


Slika 1.4. Biosinteza fenolnih jedinjenja ciklusom šikimske kiseline.

Ciklus počinje reakcijom fosfoenolpiruvata (PEP) i D-eritoza-4-fosfata u kojoj nastaje 3-dezoksi-D-arabino-7-fosfat-heptulosonska kiselina (DAHP). Nizom veoma složenih biohemijskih reakcija nastaje šikimska kiselina iz koje nastaje fenilalanin (Dewick, 2002).

Fenilalanin, nastao tokom ciklusa šikimske kiseline, deaminacijom u prisustvu fenilalaninamoniumliazе daje cimetnu kiselinu, koja se dalje transformiše do ostalih C6–C3 fenilpropanoida, kumarinske, kafene, ferulne i sinapinske kiseline i njihovih derivata (Parr i Bolwell, 2000) (Slika 1.5.)

Kumarini nastaju iz cimetne kiseline preko trans-2 kumarinske kiseline, ciklizacijom koja obuhvata neenzimsku transformaciju prirodnog trans-oblika u cis-izomer. Redukcijom ferulne kiseline nastaje koniferil alkohol, važan prekursor lignina.

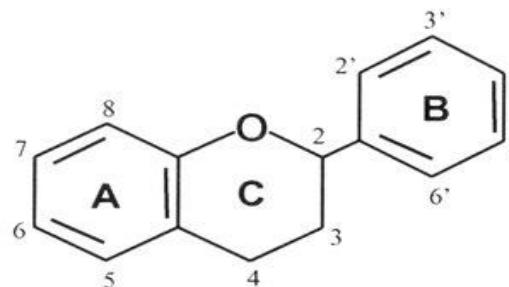


1.5. Šematski prikaz porekla različitih fenolnih jedinjenja iz jednostavnih fenilpropanoida.

Između različitih klasa flavonoida postoje određeni odnosi, koji omogućavaju biološku transformaciju jednih oblika u druge.

1.3.2. Flavonoidi

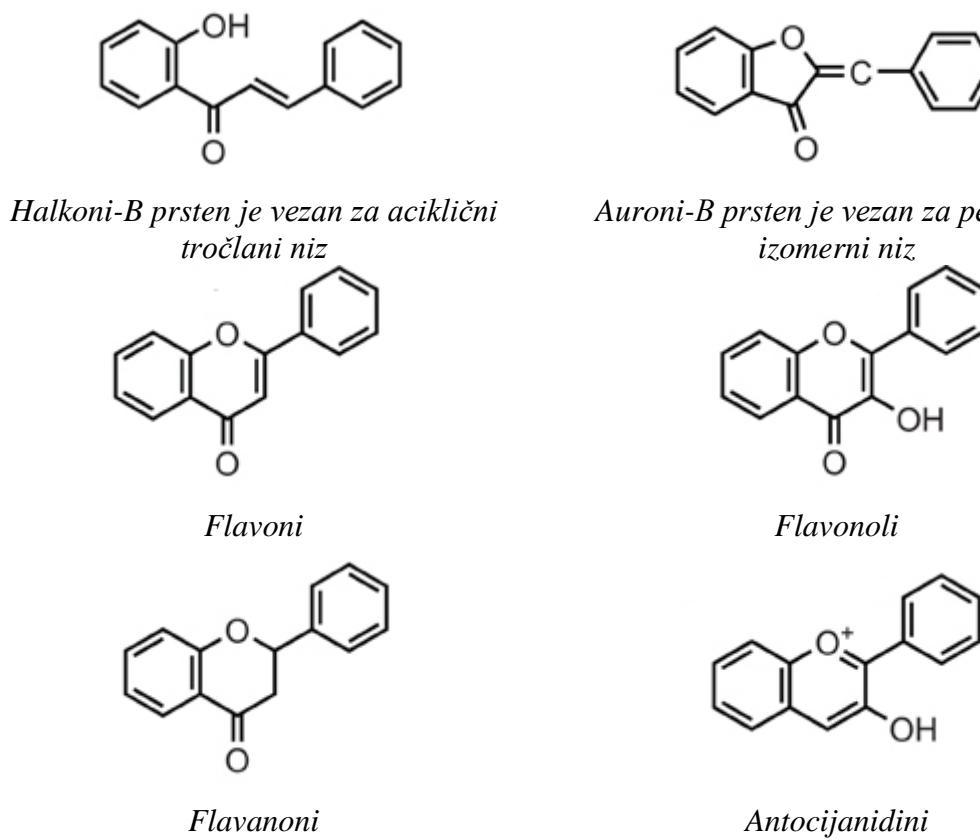
Flavonoidi su polifenolna jedinjenja koja imaju 15 C-atoma, sadrže dva benzenova jezgra koja su međusobno povezana tročlanim ugljovodoničnim nizom. Skelet flavonoida se može predstaviti kao C₆ - C₃ - C₆ sistem. Na slici 1.6. prikazan je osnovni skelet flavonoida.



Slika 1.6. Osnovni skelet flavonoida.

Hemijska struktura flavonoida bazira se na C₁₅ skeletu sa hromanovim prstenom za koji je vezan bezenov prsten u položajima najčešće 2, ređe 3 ili 4.

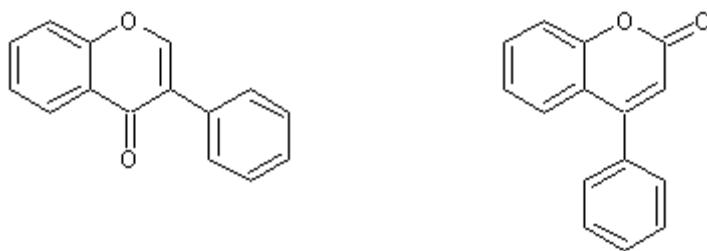
Klase flavonoida međusobno se razlikuju prema oksidacionom statusu heterocikličnog prstena C i poziciji vezivanja B-prstena. Šest najznačajnijih grupa flavonoida su prikazane na slici 1.7.



Slika 1.7. Najzastupljenije klase flavonoida.

Flavonoidi se u prirodi najčešće nalaze u obliku monoglikozida, a ređe u obliku di i tri glikozida. Glikozide najčešće grade sa D-glukozom, D-galaktozom i L-ramnozom. Ostali monosaharidi su manje zastupljeni. Flavonoidna jedinjenja su veoma značajni biljni pigmenti. Flavonoida i njihovi glikozidi se znatno razlikuju po nijansama boja. Nalaze se u svim delovima biljaka.

Postoje još dve klase flavonoida a to su izoflavonoidi i neoflavonoidi koji se nazivaju abnormalni flavonoidi. Njihova struktura je prikazana na slici 1.8. Kod izoflavonoida (izoflavoni i izoflavonoli) - prsten B je vezan za heterociklični prsten u položaju 3, dok je kod neoflavonoida B prsten vezan u položaju 4.



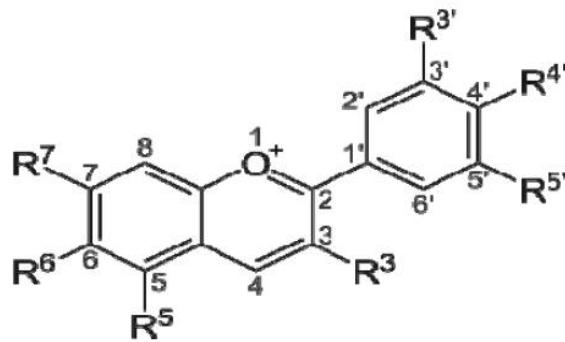
Izoflavanoidi-B prsten je vezan za heterociklični prsten u položaju 3

Neoflavanoidi-B prsten je vezan za heterociklični prsten u položaju 4

Slika 1.8. Strukture abnormalnih flavonoida.

1.3.3. Antocijani

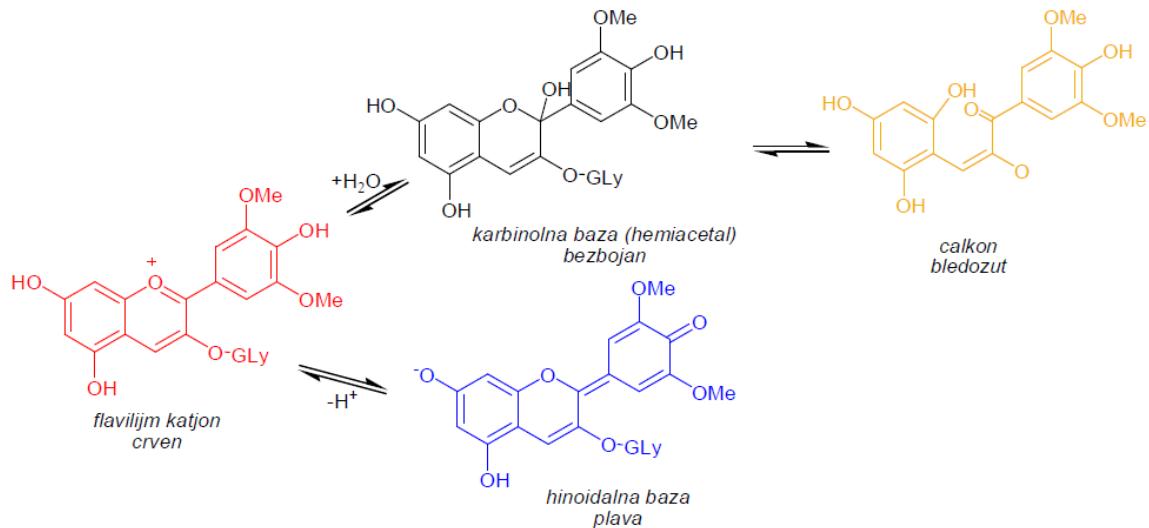
Antocijani (*anthos*-cveće, *kyanos*-plav) su klasa flavonoidnih jedinjenja koja predstavljaju prave biljne pigmente. Prvi put su izolovani još 1835. godine. Mogu se naći u svim delovima biljke, od cveta do korena, a osim što biljci daju obojenost, štite je i od prekomerne UV svetlosti i od štetnog dejstva slobodnih radikala. Osnovna struktura antocijana je prikazana na slici 1.9.



Slika 1.9. Osnovna struktura antocijana.

Antocijani se najčešće javljaju u prirodi u obliku glikozida. Posle hlorofila, antocijani su glavna grupa biljnih pigmenata koji su vidljivi za oko čoveka. Oni imaju veliki ekonomski značaj kao voćni pigmenti i koriste se za bojenje sokova, vina i drugih proizvoda kao prirodni

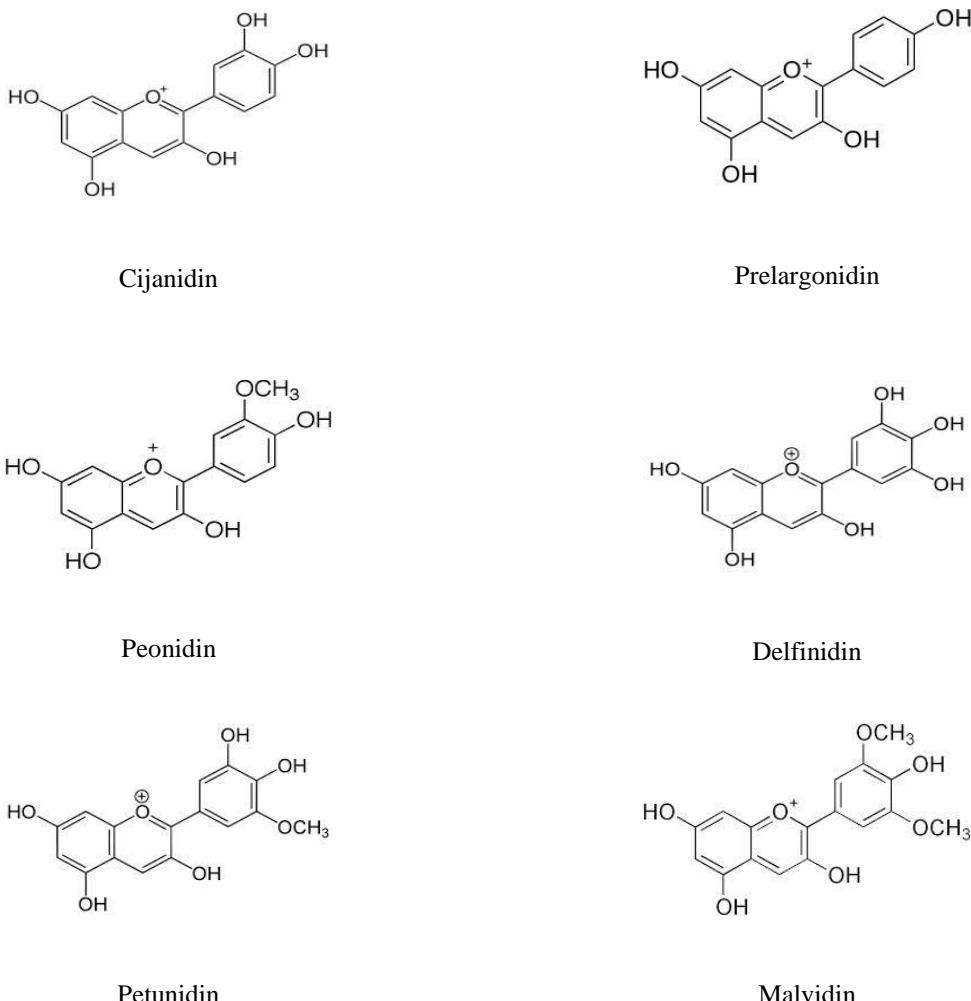
pigmenti. Antocijani su obojeni različitim nijansama od plave u alkalnoj sredini do crvene u kiseloj sredini (slika 1.10.).



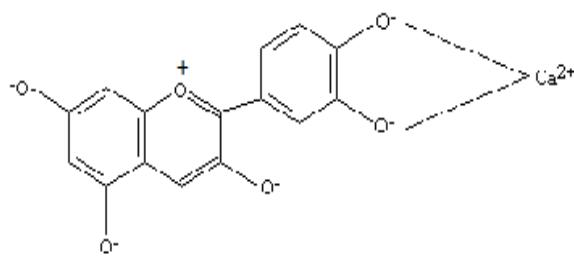
Slika 1.10. Ponašanje antocijana u zavisnosti od pH sredine.

U vodenoj sredini antocijanini podležu strukturnim transformacijama koje određuju njihovu boju i stabilnost. U zavisnosti od pH antocijanini u rastvoru egzistiraju kao: plava hinoidalna baza, crveni flavilijum katjon, bezbojna karbinolna baza (hemiacetal) i bezbojni čalkon. Flavilijum katjon je stabilan jedino u veoma niskom području pH. Kako se pH vrednost povećava, boja flavilijum kartjona (crvena) prelazi u bezbojan hromenol (pH=4-5). Pri pH vrednosti 6-7 boja je ljubičasta, zbog prisustva hinoidne anhidrobaze, pH=7-8 zbog prisustva jonske anhidro baze boja je tamno plava, i pri pH=7-8 jonska anhidro baza se transformiše tako što se prsten otvara i dobija se halkon žute boje.

Najznačajniji antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfnidin, pelunidin i malvidin. Njihove strukture su prikazane na slici 1.11.

*Slika 1.11. Strukture najznačajnijih antocijana.*

Povećanje broja hidroksilnih grupa u molekulu vodi više ka plavoj boji (pelargonidin → cijanidin → delfinidin), dok formiranje glikozida i metilovanje rezultira pojavom crvene boje (pelargonidin → pelargonidin-3-glikozid, cijanidin → peonidin). Oni mogu da sa metalnim jonima kao što su Ca (II) i Mg (II) u alkalnom rastvoru da grade komplekse. Na slici 1.12. je prikazan kompleks antocijana i Ca^{2+} jona.

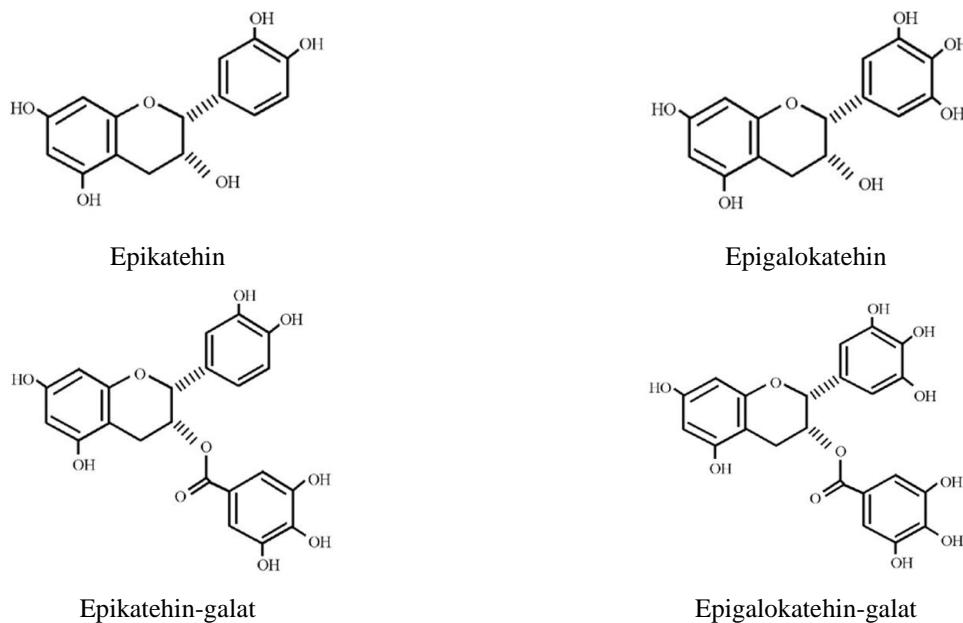


Slika 1.12. Kompleks antocijana i metalnih jona.

Pri višim pH vrednostima boja se može stabilizovati prisustvom višeivalentnih jona Al^{3+} , Fe^{3+} . Formirani kompleks sa metalima je tamno plave boje.

1.3.4. Flavan-3-oli

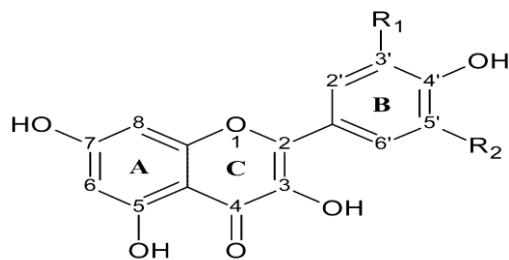
Flavan-3-oli su gradivne jedinice tanina. Tanini (proantocijanidoli ili proantocijanidini) su polimeri koji se sastoje iz dve ili više različito vezane jedinice flavan-3-ola ili flavan-3,4-diola, pri čemu stereohemija supstituenata na C_2 i C_3 atomu pojedinih jedinica, kao i stereohemija međusobno povezanih jedinica ima važnu ulogu. Najčešće jedinice proantocijanidola su: (-)-epikatehin sa 2,3 cis i (+)-catehin sa 2,3 trans položajem supstituenata, kao i galokatehin i epigalokatehin i njihova jedinjenja sa galnom kiselinom (slika 1.13.).



Slika 1.13. Strukture epikatehina i epigalokatehina i njihovih jedinjenja sa galnom kiselinom.

1.3.5. Flavonoli

Flavonoli su veoma rasprostranjeni u biljkama i javljaju se najčešće kao glikozidi, a mogu da budu i kopigmenti antocijana u cvetnim laticama i lišću viših biljaka. Nalaze se u svim delovima biljaka. Poznato je preko 100 flavonolnih aglikona, a najrasprostranjeniji su kempferol, kvercetin i miricetin (slika 1.14.).



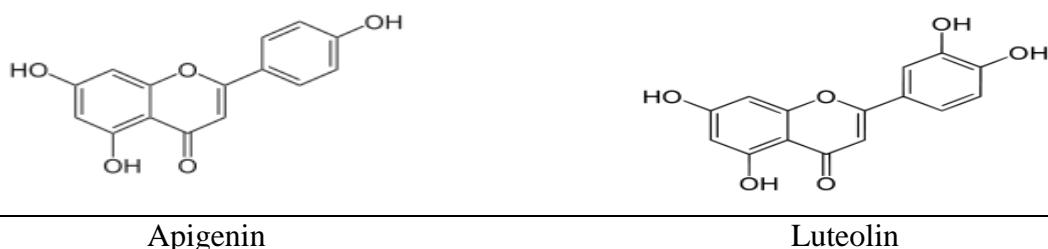
<i>Kempferol</i>	$R_1=R_2=H$
<i>Kvercetin</i>	$R_1=OH, R_2=H$
<i>Miricetin</i>	$R_1=R_2=OH$

Slika 1.14. Strukture najznačajnijih flavonola.

Flavonoli koji imaju hidroksilnu grupu u položaju 6 ili 8 imaju jaču žutu boju od ostalih jedinjenja iz ove grupe.

1.3.6. Flavoni

Flavoni se razlikuju od flavonola po tome što nemaju OH-grupu u položaju 3. I oni su veoma rasprostranjeni u biljnem svetu. Takođe se retko nalaze kao slobodni, a češće u obliku glikozida. Najrasprostranjeniji flavoni su apigenin i luteolin (slika 1.15.). Do danas postoji oko 100 aglikona flavona.



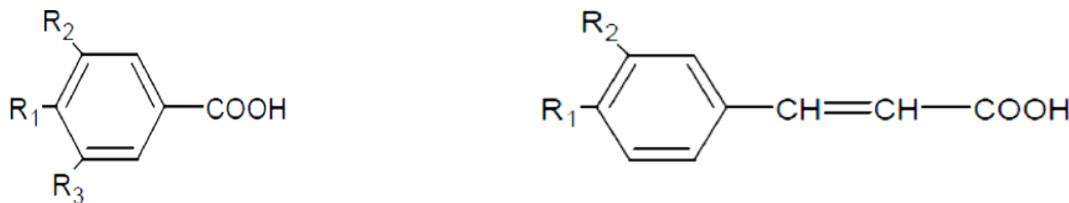
Slika 1.15. Struktura najznačajnijih flavona.

Flavoni i flavonoli grade sa šećerima O-glikizide. Šećerna komponenta je najčešće vezan u položajima 3,7 i 4'. Od monosaharida najzastupljeniji su glukoza, galaktoza, glukuronska kiselina, ksiloza, ramnoza i arabinoza. Monosaharidi se najčešće nalaze u stabilnijem piranoznom obliku. Takođe, pronađeni su i neki disaharidi i trisaharidi vezani sa flavonima i flavonolima.

Flavoni i flavonoli mogu graditi acil-derivate sa biljnim kiselinama kao što su p-kumarinska kiselina, kafena kiselina, sinapinska kiselina, ferulna, galna, benzoeva, salicilna, sirćetna i malonska.

1.3.7. Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture

Fenolna jedinjenja neflavonoidne strukture, fenolne kiseline i stilbeni, sadrže C6-C1, C6-C3 ili C6-C2-C6 osnovni skelet. Fenolne kiseline su derivati benzoeve i cimetne kiseline. P-hidroksi benzoeva, vanilinska, galna i prokatehinska kiselina su derivati benzoeve kiseline dok su ferulna, kafena i kumarinska kiselina derivati cimetne kiseline (slika 1.16.).



Benzoeva kiselina	R ₁ =R ₂ =R ₃ =H	Cimetna kiselina	R ₁ =R ₂ =H
p-hidroksibenzoeva kiselina	R ₁ =OH; R ₁ =R ₂ =H	Kafena kiselina	R ₁ =R ₂ =OH
Vanilinska kiselina	R ₁ =OH; R ₂ =CH ₃ O; R ₃ =H	Ferulna kiselina	R ₁ =OH, R ₂ =OCH ₃
Galna kiselina	R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH	p-kumarna kiselina	R ₁ =H, R ₂ =OH

Slika 1.16. Najznačajnije fenolne kiseline.

Fenolne kiseline su velika grupa fenolnih jedinjenja, koja se nalaze u hrani biljnog porekla. Fenolne kiseline imaju različite funkcije u biljkama uključujući asimilaciju hranljivih materija, sintezu proteina, aktivnost enzima i fotosinteze. Dele se na derivate cimetne i hidroksibenzoeve kiseline. Najzastupljeniji hidroksi derivati benzoeve kiseline su: *p*-

hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina.

Fenolne kiseline su poznati antioksidansi zbog sposobnosti da predaju vodonik ili elektron kao i zato što njihovi stabilni interemedijeri radikali sprečavaju oksidaciju različitih komponenti, naročito masnih kiselina i ulja.

Hidroksi derivati benzoeve i cimetne kiseline su prisutni u hrani biljnog porekla (voće, povrće, žitarice). Nalaze se u svim delovima biljaka (koren, stabljika, lišće, seme). U različitim delovima biljaka nalaze se različite koncentracije fenolnih kiselina. Osim toga, u različitim stadijumima razvoja biljaka prisutne su različite fenolne kiseline. Uslovi rasta, kao što je temperatura, utiču na sadržaj fenolnih kiselina.

Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina vezana estarskom, etarskom ili acetalnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom) ili sa manjim organskim molekulima (glukoza, kvinska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni).

Hidroksibenzoeva kiselina u slobodnoj i esterifikovanoj formi dokazana je samo u nekim višim biljkama. Cimetne kiseline (*p*-kumarna, kafena, ferulna i sinapinska kiselina) su više zastupljene u odnosu na hidroksibenzovu kiselinu. Kafena i kininska kiselina formiraju hlorogensku kiselinu, koja se nalazi u mnogim vrstama voća, a u većoj koncentraciji u kafi (jedna šoljica sadrži 70-350 mg hlorogenske kiseline). Cimetna kiselina je pronađena u svim delovima voća, a najveći sadržaj je utvrđen u spoljašnjem omotaču zrelog ploda. Kafena kiselina je izolovana iz kafe. U slobodnom i esterifikovanom obliku je najviše zastupljena fenolna kiselina i čini od 75 do 100% ukupnog sadržaja derivata cimetne kiseline u voću. Najvažniji izvor ferulne kiseline su zrna žitarica u kojima je dominanta fenolna kiselina.

Fenolne kiseline su prisutne u voću u glikozidnoj formi, iz koje se mogu oslobođiti kiselom hidrolizom (Riberau-Gayon, 1965). Slobodne fenolne kiseline prisutne u obojenom voću i sokovima, uglavnom su nastale reakcijama kiselom hidrolizom glikozida, alkalnom hidrolizom estara ili termičkom degradacijom kompleksa antocijana (Galvin, 1993). Estri sa vinskom

kiselinom, pre svega estar kafene kiseline lako podležu oksidaciji i odgovorni su za brzo potamnjivanje šire.

1.4. ANTIOKSIDANSI I ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Antioksidativna zaštita je fiziološki proces koji u zdravom organizmu funkcioniše neprekidno i ima za cilj da spreči štetno delovanje prooksidativnih faktora. Iako je kiseonik neophodan za život, to samo po sebi ne znači da on nije opasan za njegovo očuvanje. U procesu stvaranja energije ćelije koriste kiseonik, koji u reakciji oksidacije može da stvara „nusproizvode“ poznate pod nazivom slobodni radikali ili ROS (reaktivne kiseonikove vrste) (Halliwell, 1989). Slobodni radikali predstavljaju atome, jone, molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne aktivnosti i nestabilnosti. Oni mogu biti neutralni, ali i pozitivno (*radikal-katjon*) i negativno (*radikal-anjon*) nanelektrisani. Nespareni elektron se može nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali dele na slobodne radikale kiseonika, hlora, azota itd.

Ako ovo njihovo dejstvo nije neutralisano antioksidansima, koji imaju sposobnost da slobodnom radikalu predaju elektron, dolazi, do lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala, koji mogu oštetiti ćelijske zidove, zidove krvnih sudova, proteine, masti, pa čak i molekule DNK u jedru ćelije. Prema tome, iako su oksidacione reakcije od suštinskog značaja za život, one mogu biti štetne za organizam i da prouzrokuju mnoge bolesti. Da bi to sprečile, životinje i biljke su razvile složene sisteme antioksidativne zaštite (Vertuani, 2004).

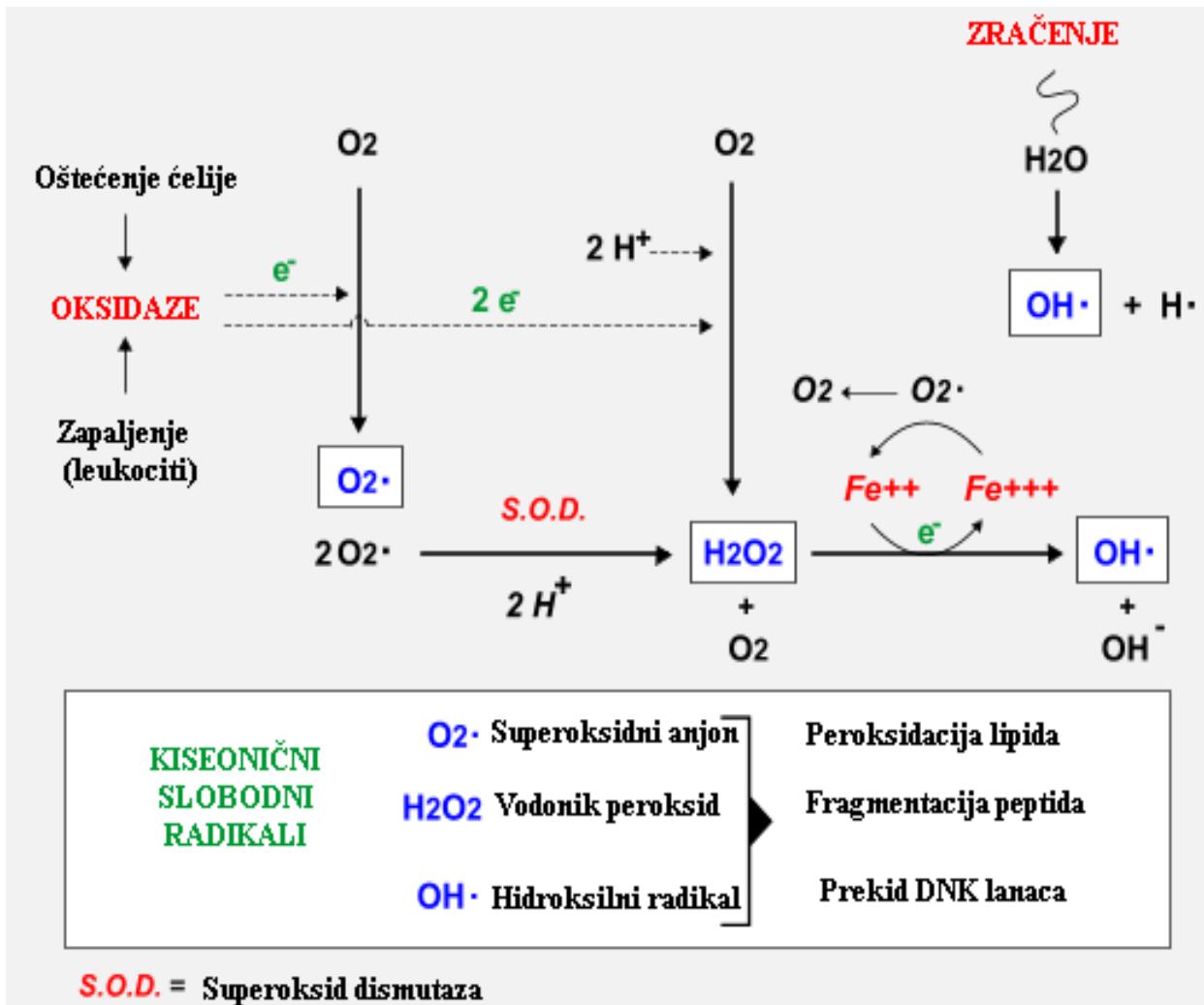
Reaktivne vrste se dele na reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste i zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti oni lako stupaju u rekciju, međusobno ili sa drugim molekulima, pri čemu nespareni elektroni obrazuju hemijske veze, oslobođa se energija, a sistem prelazi u niže energetsko stanje.

Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa:

- termolizu
- fotolizu
- oksido-redukcione procese i
- radijaciju visoke energije (Piletić i sar., 1993).

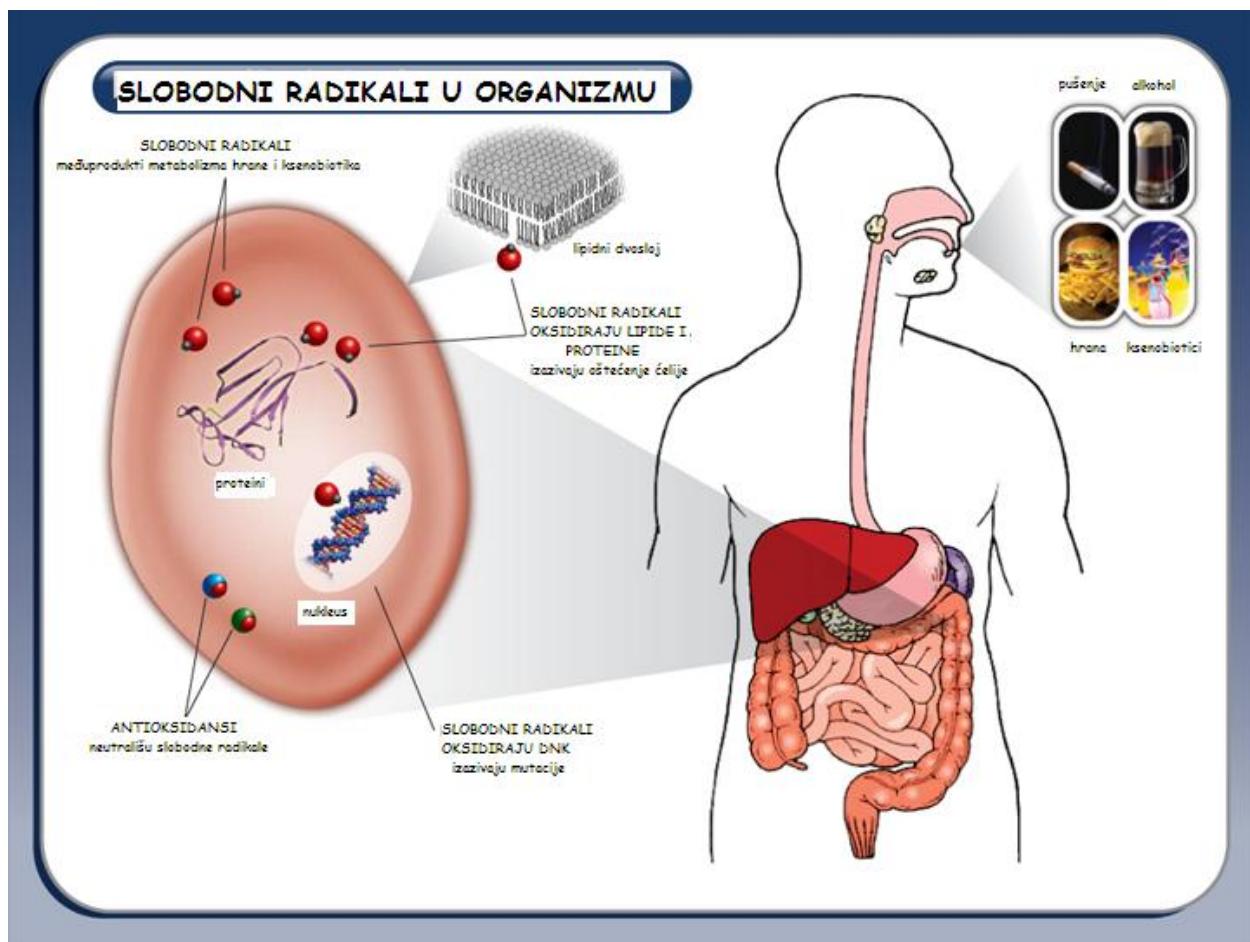
U biosistemima se produkcija slobodnih radikala dešava tokom sledećih procesa: apsorpcije radijacije, fagocitoze, biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu, enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, itd. Količinu slobodnih radikala povećavaju zagađeni vazduh, pušenje, stres, izlaganje suncu, hronične bolesti, infekcije i genetska predispozicija na neku bolest.

Na slici 1.17. prikazan je mehanizam nastajanja slobodnih radikala.



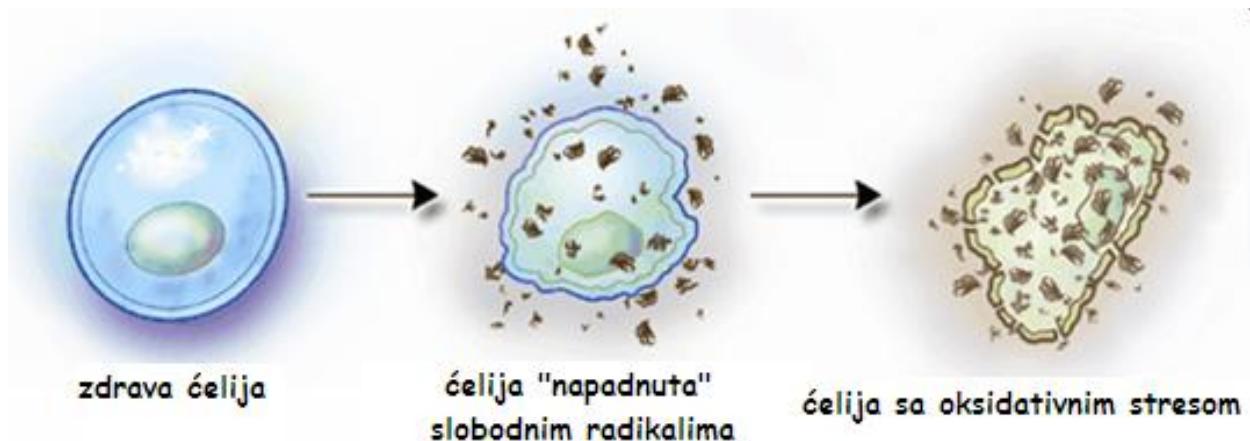
Slika 1.17. Mehanizam nastajanja slobodnih radikala.

Na slici 1.18. prikazani su slobodni radikali u organizmu.



Slika 1.18. Slobodni radikali u organizmu.

Prevelika produkcija slobodnih radikala ili smanjenje antioksidantnih protektivnih mehanizama organizma, dovodi do *oksidativnog stresa* i oštećenja ćelija i tkiva. Izgled ćelije pre i posle oksidativnog stresa prikazan je na slici 1.19.



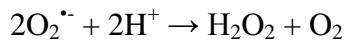
Slika 1.19. Izgled ćelije pre i posle oksidativnog stresa.

Neki slobodni radikali nastaju i u toku normalnog metabolizma. Preko 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara redukuje se do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitihondrija (*Acworth, 2003*).

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) odnosno njegov protonovani oblik, peroksilni radikal ($HO_2^{\cdot-}$), nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, a može se dobiti i jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksidu. Značajne količine produkuju se u reakcijama katalizovanim nekim oksidazama (npr. ksantin oksidazom) (*Ohara i sar., 1993*).

Hidroksil radikal, ($\cdot OH$) je najreaktivniji od svih ROS i najodgovorniji za citostatičke efekte kiseonika. Brzo reaguje sa biomolekulima, pa je njegov poluživot kratak. Hidroksil radikal se u ćelijama stvara kada postoje uslovi za Haber-Vejsovou ili Fentonovu reakciju. Takođe, nastaje dejstvom γ -zračenja na molekul vode, u procesu fagocitoze, troelektronskom redukcijom iz molekulskog kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija.

Vodonik peroksid (H_2O_2) nije slobodni radikal, ali se ubraja u reaktivne vrste kiseonika. Najstabilniji je, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom enzimskom mutacijom, dejstvom superoksid dismutaze:



Proces stvaranja vodonik peroksidu odvija se na nivou peroksizoma, mitohondrija, mikrozoma i ćelijske membrane.

Singletni kiseonik (1O_2) je izrazito reaktivan, nastaje enzimskim putem, u prisustvu mieloperoksidaza i laktoperoksidaza.

Antioksidansi, prema najšire prihvaćenoj definiciji bioloških antioksidansa koju je dao *Halliwell* (*Halliwell, 1990*) su supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata. Antioksidansi su definisani i kao supstance koje mogu štititi ćelije vlastitog organizma od štetnog delovanja oksidativnog stresa ili slobodnih radikala (*Leposavić, 2008*).

Antioksidansi mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima zahvaljujući njihovoj sposobnosti da:

- deluju kao "hvatači" (skevindžer) slodobnih radikala,

- deluju kao donori elektrona,
- donori H-atoma peroksil ili hidroksil radikalima,

ili da:

- deluju kao akceptori elektrona,
- akceptori H-atoma ugljenikovih slobodnih radikala.

1.4.1. Podela antioksidanasa prema nivou i načinu delovanja

Shi i sar. (Shi i sar., 2001) klasifikovali su antioksidanse prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu na:

- *Preventivne antioksidanse*, koji sprečavaju nastanak slobodnih radikala.
- “*Skevindžer*” antioksidanse, koji poseduju sposobnost da “hvataju” slobodne radikale.
- “*Reparacione*” antioksidanse, koji deluju posebnim mehanizmima, obnavljujući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U “reparacione” antioksidante ubrajaju se fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze, itd.

1.4.2. Podela antioksidanasa prema mestu nastajanja

Prema mestu nastajanja antioksidasi značajni za ljudski organizam dele se na: *endogene i egzogene*.

- *Endogeni antioksidansi* predstavljaju antioksidanse koji nastaju u ljudskom organizmu.
- *Egzogeni antioksidansi* unose se putem hrane ili lekova. Fenolna jedinjenja su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanasa, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama (*Ruberto i sar.*, 2007).

1.4.3. Sistem antioksidativne zaštite

Sistem antioksidativne zaštite obuhvata enzimske i neenzimske antioksidanse, a svi antioksidansi mogu se podeliti i na ćelijske, membranske i ekstraćelijske antioksidanse (*Vertuani*,

2004). Sistem antioksidativne zaštite obuhvata enzimske i neenzimske antioksidanse, i deluje na sledećim nivoima u kojima:

- Uklanja kiseonik ili smanjuje njegovu koncentraciju
- Uklanja jone metala koji su katalizatori u reakcijama oksidativnog stresa
- Uklanja superoksidni anjon, vodonik peroksid i druge reaktivne vrste kiseonika (ROS)
- Vezuje slobodne radikale kao što su: hidroksil-, alkoksil-, peroksil- radikali

Reagujući sa slobodnim radikalima, antioksidansi ih pretvaraju u neradikale predajući im elektron , a sami postaju slabo reaktivni radikali.

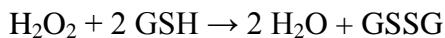
1.4.4. Enzimski antioksidansi

Enzimski antioksidansi spadaju u celularne antioksidanse. Nalaze se u zdravim ćelijama arterijskih zidova, dok je ekstracelularna tečnost siromašna enzimskim antioksidansima. U enzimske antioksidanse spadaju:

- *Superoksid dizmutaza (SOD)*
- *Katalaza*
- *Glutation peroksidaza*
- *Glutation reduktaze i transferaze*
- *Tiol-disulfid oksidoreduktaze*
- *Peroksiredoksini*

Glutation peroksidaza je tetramerni enzim za čiju je aktivnost neophodan selen. To je enzim sa sistematskim imenom *glutation:vodonik-peroksid oksidoreduktaza*. Ovaj seleno protein u svom aktivnom centru umesto normalnog cisteina, sadrži selenocistein. Selen, koji je zamjenio sumpor u cisteinu, povećava nukleofilna svojstva i ionizuje brže da oslobodi proton, čime se postiže veća efikasnost enzima kao katalizatora.

Glutation peroksidaza, zajedno sa katalazom učestvuje u otklanjanju H_2O_2 . U reakciji sa H_2O_2 redukovani oblik glutationa (GSH) prelazi u oksidovani oblik (GSSG) i nastaje voda.



1.3.

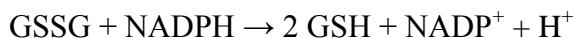
Najvažnije što se tiče oksidativnih promena u zidu arterija je to što glutation peroksidaze mogu da katalizuju glutation (GSH) zavisne redukcije lipidnih peroksida (LOOH) do odgovarajućih alkohola (LOH).



1.4.

Peroksidaze koji sadrže selen sačinjavaju familiju enzima kojoj pripadaju najmanje četiri tipa enzima. „Klasična“ glutation peroksidaza (GSHPx) deluje na H_2O_2 i hidroperokside masnih kiselina i holesterola, ali ne i na esterifikovane lipide kao što su oni prisutni u lipoproteinima. Fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza (PHGPx) je jedini enzim za koji se zna da redukuje lipidne hidroperokside iz lipoproteina. Ova izoforma je vezana za membranu, i kao i GSHPx se ne nalazi u ekstracelularnim tečnostima.

Glutation reduktaza ima ulogu održavanju rezervi redukovanih glutationa u ćeliji, tako što koristi redukovani energiju iz pentoza fosfatnog puta (NADPH). Čak i kada su prisutne velike količine H_2O_2 ovaj enzim je veoma efikasan u održavanju ćelijskih rezervi glutationa.



1.5.

Intracelularni odnos oksidovanog i redukovanih glutationa (GSSG/GSH) je odraz oksidativnog stanja ćelije i pokazatelj detoksikacionih kapaciteta ćelije.

1.5. MIKRO, MAKRO I TOKSIČNI ELEMENTI

Mnogi elementi utiču i na sekundarni metabolizam biljaka i samim tim na produkciju biološki aktivnih jedinjenja (Sykorova i sar., 2009; Ozcan i sar., 2004). 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 strukturalnih i funkcionalnih komponenti ćelija i izvor su energije. Mikro sastojci (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.

- *Makroelementi ili makrokonsistuenti* (glavni elementi) su elementi koji su neophodni u relativno velikim količinama za normalno funkcionisanje fizioloških procesa ljudskog organizma. Makroelementi su: vodonik, ugljenik, kiseonik, natrijum, magnezijum, fosfor, sumpor, hlor, kalijum i kalcijum.
- *Mikroelementi, mikronutritijenti ili “trace elements”* (elementi u tragu, esencijalni elementi), su esencijalni sastojci hrane neophodni za normalno funkcionisanje organizma, a potrebni su u vrlo malim količinama. Mikroelementi su: hrom, mangan, gvožđe, kobalt, bakar, cink, selen, molibden i jod.
- Grupu drugih elemenata čine fluor, silicijum, vanadijum, nikal i kalaj koji se nalaze u tragu i mogu da budu esencijalni.

Esencijalni elementi su hrom, mangan, gvožđe, kobalt, bakar, cink, selen, molibden i jod.

To su sve 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. 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 krvu zavisnosti.

Gotovo svi mikro- i makroelementi koji se mogu naći u delovima duda su uključeni u normalno funkcionisanje biološkog sistema i pozitivno deluju na određena fiziološka stanja. Utvrđeno je prisustvo 10 elemenata od kojih je kalijum dominantan, a zatim slede azot, fosfor, kalcijum, magnezijum, natrijum, gvožđe, mangan, cink i bakar (Ercisli i Orhan, 2007; Lin i Lai, 2009; Imran i sar., 2010; Yang i sar., 2010). Visok nivo gvožđa u crnom dudu (*Morus nigra* L.)

je od velikog nutritivnog značaja, naročito u onim delovima sveta gde su anemija i nedostatak gvožđa relativno česte pojave (*Imran i sar., 2010*).

Kalijum je mineral bez kojeg nisu mogući brojni metabolički procesi u organizmu, uključujući pravilno funkcionisanje mozga, srca i mišića, nalazi se u bananama, krompiru i drugom ukusnom voću i povrću. Visok pritisak, moždani udar i oslabljeni refleksi samo su neke od posledica nedostatka kalijuma neophodnog za održavanje kiselo-bazne ravnoteže i osmotskog pritiska u organizmu. Osim toga što deluje kao elektrolit, taj mineral neophodan je za očuvanje srca, mozga, bubrega, mišićnih tkiva i drugih važnih organa ljudskog tela. Usled nedostatka tog elementa mogu se javiti brojni zdravstveni problemi počev od bezazlenijih kao što su umor i slabost mišića, ali i opasnijih poput izostanak refleksne reakcije, ubrzan rad i lupanje srca, anemija, jake glavobolje (*Veljković i Vučković, 2010*). Dnevne potrebe za kalijumom iznose 590mg, a mogu biti i veće. Ukoliko višak kalijuma, iz nekog razloga, ne može da se izluči iz организма, 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 организма i gubitka apetita (*Veljković i Vučković, 2010*).

Kalcijum je jedan od minerala neophodnih našem organizmu. On čuva naše kosti, ali je i njegov doprinos celokupnom našem zdravlju je veliki. Veoma je važno u mladosti unositi u organizam putem ishrane dovoljne količine kalcijuma, jer će se u suprotnom nedostatak kalcijuma odraziti kroz razne bolesti u kasnijim godinama života. 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 biohemiskih i fizioloških procesa u organizmu. On reguliše proizvodnju energije u ćelijama, metabolizam i rad više od 300 različitih enzima. Istovremeno, štiti srce i krvne sudove, snižava nivo masti u krvi i sprečava slepljivanje crvenih krvnih zrnaca, odnosno stvaranje ugrušaka. Mišićima i nervima je takođe neophodan, jer reguliše prenos nadražaja do mišića sprečavajući trzaje i drhtanje, što je veoma važno za ujednačeni rad srca. (*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. Kliničke posledice nedostatka magnezijuma uključuju različite neurološke i neuromišićne znake kao što su grčevi, premor 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*). Nizak nivo magnezijuma u krvi često se sreće kod osoba obolelih od dijabetesa (*Kobrin i Goldfarb, 1990*). Poznat je antistresni mineral. 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 difundije 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.). Litijum se koristi i za lečenje mentalnih bolesti: šizofrenija, alkoholizam, odvikavanje od pušenja, kofeina, marihuane, depresija, demencije (zaboravnost), periodična agresivna ponašanja i učestale promene raspoloženja, poboljšanje pamćenja.

Gvožđe ulazi u sastav hemoglobina, mioglobin i respiratornih enzima, i jedan je od najvažnijih oligoelemenata. Neophodan je sastojak važnih enzima i koenzima (peroksidaze, citochrom) (*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*).

Cink je mineral koji se u organizmu nalazi u količini od svega 2-3g, ali je neophodan za normalno funkcionisanje organizma. Neophodan je za rast i razvoj, za funkcionisanje imunog sistema, pomaže u bržem zarastanju rana, smanjuje rezistenciju na insulin, sprečava uvećanje prostate, utiče na stvaranje spermatozoida, koristi se u tretmanu impotencije i steriliteta, utiče na stvaranje testosterona, vraća mentalnu svežinu, za otklanjanje belih pega na noktima, kod akni, kod gubitka osećaja ukusa. Cink se koristi u prevenciji prehlada i gripe ili kod hroničnih infekcija, jer podstiče imuni sistem i ima antioksidativnu ulogu. Takođe je bitan za rast i razvoj novorođenčadi. 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*). 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. 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 smrti, 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 prepostavljaju 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; Neve, 1996*).

I ako se *mangan* smatra mikroelementom, on je definitivno jedan od bitnijih minerala kada je telo u pitanju. Mangan učestvuje u nekoliko važnih funkcija u organizmu, između ostalog pomaže u zarastanju rana i pomaže pravilan razvoj kostiju, plus on je sastavni deo u procesu metabolizma. Mangan je takođe antioksidans. Jedna od najvažnijih uloga mangana je njegova uloga antioksidansa. Antioksidansi su neophodni da bi se ublažila oštećenja koja izazivaju slobodni radikali. Konkretno, mangan pomaže mitohondrijama da smanje nivo stresa koje prouzrokuju oksidansi kojima su konstantno izložene zbog njihove velike potrošnje kiseonika. Kao i za skeletni sistem, mangan je potreban enzimima koji su uključeni u procesu formiranja

hrskavica i kostiju. Bez adekvatne količine mangana, celokupno očuvanje ovih komponeti skeletnog sistema može biti ugroženo. Nekoliko enzima su aktivirani manganom. Ovi enzimi koji se aktiviraju manganom pomažu u procesu metabolizma holesterola, ugljenih hidrata i aminokiselina. Zarastaje rana je sposobnost tela za koju su zaduženi mnogi enzimi i amino kiseline. Naime, mangan je uključen u proizvodnju kolagena. Telo mora proizvoditi dovoljne količine kolagena koji je neophodan kada je koža oštećena, pa je u tom slučaju značaj mangana najveći.

Bakar je jedan od najznačajnijih katalizatora u našem organizmu. Učestvuje u formiranju kostiju, održava mijelin u nervnom sistemu, prisutan je u dva ključna enzima aerobnog metabolizma: citohrom C oksidazi i superoksid dismutazi. Superoksid dismutaza nalazi se u citosolu. Ona katalitički odstranjuje slobodni radikal jona superokksida (O_2^{2-}) koji nastaje u aerobnom metabolizmu. Na taj način ona štiti ćelijske membrane. Osim bakra ona sadrži i cink. 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*).

U tabeli 1.7. prikazane su potrebne dnevne doze nekih mikro- i makroelemenata.

Tabela 1.7. Potrebne dnevne doze nekih mikro- i makroelemenata.

ELEMENT	RD ¹	DRI ²	UL ³
Ca	1 mg	1,3 mg	2,5 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, bubrežima 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 bubrežima izaziva oštećenje tkiva bubrega, utiče na nastanak kamenca u bubrežima i povećanje pritiska. Kadmijum utiče na strukturu kostiju dovodeći do njihove deformacije. Čest je uzrok anemije, oštećenja srca i bubrega, a i kancerogen je. Kadmijum je metal koji se obično može naći u prirodi. Takođe je prisutan u mnogim tipovima đubriva, odakle može da završi i u hrani. Može se naći u hlebu, žitaricama, krompiru i drugom povrću sa korenom, ali i u iznutricama životinja, kao što su bubrezi i jetra.

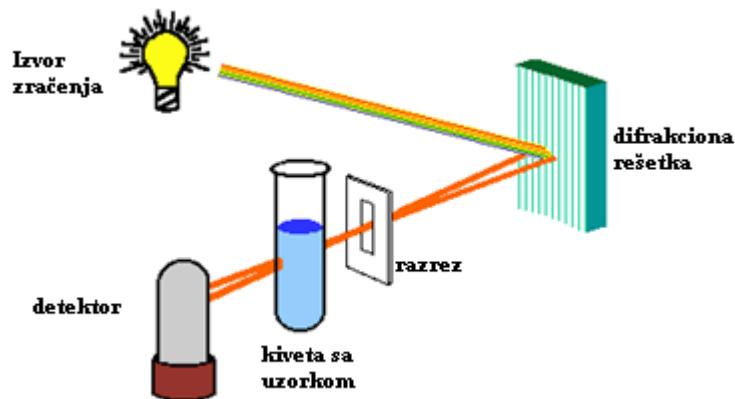
Arsen je manje toksičan od ostalih teških metala. Arsen koji je vezan u organskim jedinjenjima (As^{5+}) i elementarni arsen nisu toksični za razliku od neorganskog trovalentnog arsena (As^{3+}). Akumulira se u telu, posebno u kosi, koži i nekim unutrašnjim organima. Trovanje arsenom izaziva opadanje kose, dermatitis i probleme organa za varenje, zatim premorenost, glavobolju, zbumjenost, psihološke probleme i određene promene na jetri i bubrežima (Jakšić, 2010; Švarc-Gajid, 2009).

1.6. METODE ANALIZE

1.6.1. UV/Vis spektrofotometrija

Ultraljubičasta/Vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja obuhvata proučavanje apsorpcije elektromagnetskog zračenja u oblasti između 200 i 800 nm. Koristi se za kvantitativno određivanje organskih jedinjenja u rastvoru. Ona je nezamenljiva metoda za identifikaciju prirodnih konjugovanih jedinjenja, kao što su: biljni pigmenti (karotenoidi), poliacetileni, porfirini, flavonoidi, itd. Njene prednosti nad ostalim metodama su u velikoj osetljivosti i jednostavnom rukovanju instrumentom.

Instrument koji se koristi u UV/Vis spektrofotometriji zove se *UV/Vis spektrofotometar*. On meri intenzitet svetla koji je prošao kroz analizirani uzorak i upoređuje ga sa intenzitetom upadnog svetla. Spektrofotometar se sastoji iz svetlosnog izvora iz koga se svetlost deli na dva jednakata zraka (referentni i analitički), monohromatora, detektora i uređaja za pojačavanje, merenje i beleženje signala (pisača) (slika 1.20.). Kao izvor zračenja koristi se kombinacija volframove (za vidljivu oblast) i deuterijumske lampe za blisku ultraljubičastu oblast. Kao detektor se najčešće koristi fotomultiplikator.



Slika 1.20. Šema spektrofotometra.

Prolaskom zračenja iz vidljivog dela spektra kroz obojeni rastvor, joni prelaznih metala apsorbuju deo svetlosti pri čemu se pobuđuju elektoni iz d-orbitale, dok se kod organskih molekula najčešće pobuđuju π -elektroni. Najčešće se snimaju spektri razblaženih rastvora, a mogu se snimati i spektri gasova ili para.

Kvantitativna spektrofotometrijska analiza zasniva se na Beer-ovom zakonu ($A=\varepsilon \cdot l \cdot c$), koji glasi: *apsorbanca rastvora direktno je proporcionalna koncentraciji apsorbujuće vrste i debljini sloja kroz koje zračenje prolazi.* Za kvantitativnu analizu je bitno da se merenja apsorbance vrše sa najvećom mogućom tačnošću i osetljivošću.

Intenzitet apsorpcije zračenja definisan je Lambert-Berr-ovim zakonom:

$$A = \log I_{10}(I_o - I) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad 1.6.$$

ε -molarna apsorptivnost

l -debljina sloja (cm)

c -koncentracija apsorbujuće supstance (mol/l)

A - apsorbanca

I_0 - intenzitet upadnog zraka

I - intenzitet zraka po prolasku kroz uzorak

U rastvoru koji sadrži više komponenti koje apsorbuju elektromagnetsko zračenje, a koje međusobno ne reaguju, apsorbanca rastvora jednaka je zbiru pojedinačnih apsorbanci svih komponenti.

$$A = \sum A_i = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n \quad 1.7.$$

Lambert-Berr-ov zakon ne važi kada:

- rastvorak postoji u više oblika koji su u međusobnoj ravnoteži
- rastvorak i rastvarač grade asocijat
- postoji termička ravnoteža između osnovnog i pobuđenog stanja
- jedinjenja fluoresciraju ili se hemijski menjaju prilikom apsorpcije zračenja (Todorović, 1997).

Za analizu najbolje je napraviti koncentrovani rastvor od kojeg se postupnim razblaživanjem dobija rastvor koncentracije pogodne za spektrofotometriranje. Pripremljeni rastvor se prebacuje u analitičku čeliju (standardne debljine od 1 cm) od kvarca (sistem propustljiv za blisku UV i vidljivu oblast) ili stakla (sistem propustljiv samo za vidljivu oblast). Takođe se priprema i istovetna referentna čelija sa čistim rastvaračem.

1.6.1.1. Primena UV/Vis spektrofotometrije za određivanje ukupnih fenola primenom

Folin Ciocalteu metode

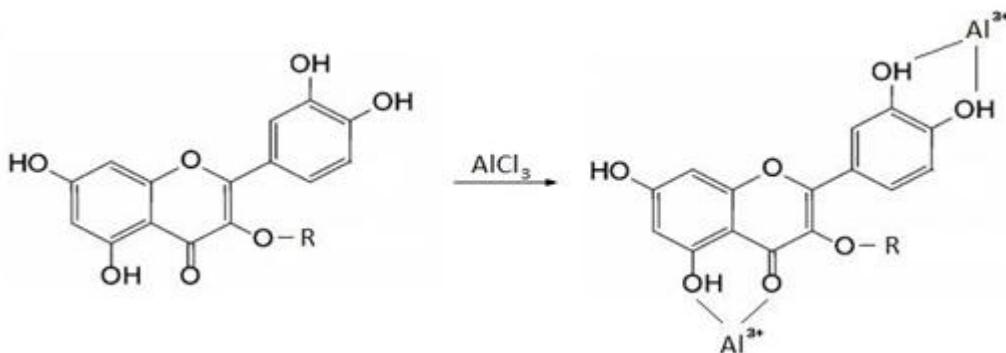
Za određivanje sadržaja ukupnih fenola koristi se Folin Ciocalteu metoda (*Singleton i Rosi, 1965*). Za ovu metodu koristi se Folinov reagens koji predstavlja smešu komplksa fosfomolibdenove kiseline i fosfovolframove kiseline. U reakciji sa fenolnim jedinjenjima ovaj reagens oksiduje fenolna jedinjenja, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida i molibden-oksida.



Rastvor postaje intenzivno plave boje, a intenzitet boje srazmeran je količini fenolnih jedinjenja. Plava boja oksida je stabilna i intenzitet boje je meren spektrofotometrijski, na talasnoj dužini $\lambda = 760$ nm. Kao standardno fenolno jedinjenje korišćena je galna kiselina i ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima izražavan je kao ekvivalent mase u miligramima galne kiseline na 100 grama biljnog materijala (mg GAE/100 g).

1.6.1.2. Primena UV/Vis spektrofotometrije za određivanje sadržaja flavonoida

Flavonoidi imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalne komplekse (*Jia i sar., 1999*). Naročito je važan kompleks sa Al^{3+} (slika 1.21.).



Slika 1.21. Kompleks Al^{3+} jona sa rutinom.

Sadržaj ukupnih flavonoida određivan je korišćenjem spektrofotometrijske metode koja je zasnovana na formiranju kompleksa između flavonoida i aluminijuma (*Ordom i sar., 2006*). Princip ove metode zasniva se na tome da AlCl_3 sa keto grupom u položaju C₄ i hidroksilnom grupom flavonoida u položajima C₃ i C₅ formira stabilan kiseli kompleks koji apsorbuje na 415 nm.

1.6.1.3. Primena UV/Vis spektrofotometrije za određivanja sadržaja antocijana

Antocijani se u biljkama nalaze u obliku glikozida. U rastvoru podležu reverzibilnim strukturnim promenama sa promenom pH sredine, i ova osobina je iskorišćena za kvantitativno spektrofotometrijsko određivanje antocijana. Za određivanje monomernih antocijana koristi se pH diferencijalna metoda koja se zasniva na osobini monomernih antocijana da su pri pH 1,0 u obliku oksonijum jona crvene boje, dok su pri pH 4,5 antocijani u bezbojnom poluketalnom obliku (Guisti i Wrolstad, 2003). pH diferencijalna metoda je detaljno opisana u eksperimentalnom delu. Zavisnost boje antocijana u zavisnosti od pH sredine prikazana je u tabeli 1.8.

Tabela 1.8. Zavisnost boje antocijana u zavisnosti od pH sredine.

PH VREDNOST SREDINE	FORMA ANTOCIJANA
pH < 2	Crveno obojen katjon (najstabilnija forma)
2 < pH < 4,5	Crveno obojen katjon u ravnoteži sa bezbojnom pseudo ili leuko bazom
4,5 < pH < 7	Ljubičasto obojena leuko baza (najnestabilnija forma)
7 < pH < 10	Plavo obojena so anhidro baze
pH > 10	Obojeni halkon

1.6.1.4. Primena UV/Vis spektrofotometrije za određivanje antioksidativne aktivnosti

Elektron-transfer metode (ET) su metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti i one podrazumevaju prisustvo oksidansa (proba) i antioksidansa u reakcionaloj smeši. Elektron-transfer reakcija koja se odigrava je:

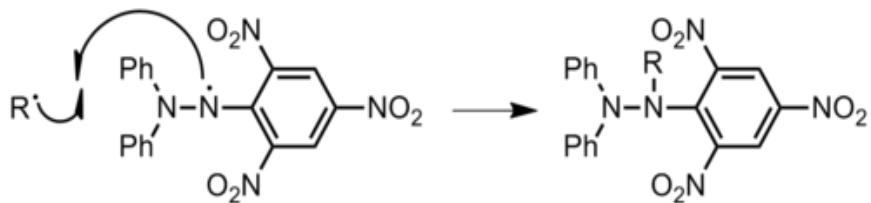


Kada oksidanasa, odnosno proba, uzme elektron iz antioksidansa dolazi do promene boje rastvora. Promena intenziteta obojenosti rastvora je proporcionalna koncentraciji antioksidansa, a reakcija između oksidansa i antioksidansa je završena kada se boja rastvora više ne menja. Spektrofotometrijska analiza se zasniva na merenju apsorbance ispitivanog rastvora i prati njena zavisnost od molarne koncentracije. Zavisnost promene apsorbance i koncentracije antioksidansa je linearна. Iz nagiba krive se određuje antioksidativni kapacitet.

U ovom radi su korišćene dve metode za određivanje antioksidativne aktivnosti: DPPH i ABTS, koje su detaljno opisane u eksperimentalnom delu.

1.6.1.5. DPPH- metoda (*Scavenging of 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil Radical Assay*)

Određivanje „scavening“ antioksidanskog slobodno-radikaliskog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalu zasniva se na redukciji ljubičastog 2,2-difenilenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH^{\cdot}) odgovarajućim antioksidansima do bledo-žutog hidrazina. Antioksidativna aktivnost se određuje u organskom sistemu praćenjem promene apsorpcije na 515 do 528 nm, sve dok apsorpcija ne postane konstantna (Slika 1.22.); ili ESR-om (*elektron-spin rezonancom*) (Brand-Williams i sar., 1995; Fuhrman i sar., 2001; Lachman i sar., 2007).



Slika 1.22. Mehanizam neutralisanja slobodnog radikala DPP-radikalom.

Reakcioni mehanizam se bazira na elektron-transfer reakciji (ET). Antioksidativni kapacitet u odnosu na DPPH^{\cdot} je pod jakim uticajem rastvarača i pH reakcije. Stark (1969) je zaključio da je smeša vode i etanola u odnosu 1:1 (50%) dobar izbor za lipofilne i hidrofilne antioksidanse i brzina reakcije DPPH^{\cdot} i antioksidansa može značajno da raste sa povećanjem količine vode. Za sadržaj vode veći od 60% antioksidativni kapacitet opada, jer deo DPPH^{\cdot} koaguliše što otežava reakciju sa antioksidansima.

Rezultati su predstavljeni kao efikasna koncentracija (EC_{50}): količina antioksidansa koja je smanjuje koncentraciju DPPH za 50%. Vreme potrebno da se postigne stabilno stanje sa efikasnom koncentracijom (EC_{50}) je izračunato iz kinetičke krive i definiše se kao TEC_{50} .

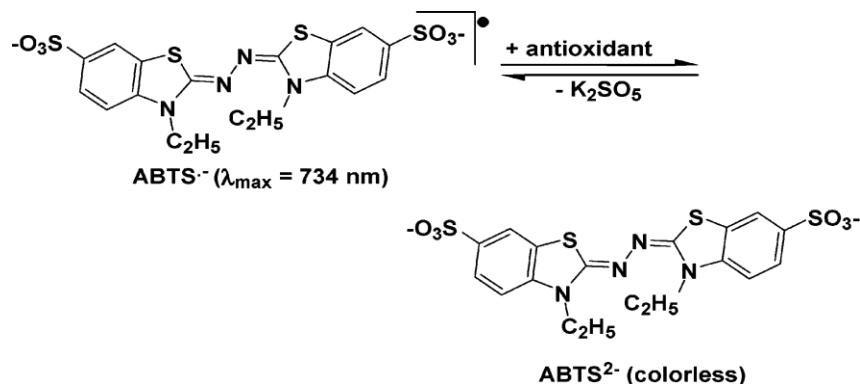
Sterni prilaz DPPH^{\cdot} određuje reakciju, jer mali molekuli lakše prilaze ovom radikalnu i imaju relativno veći antioksidativni kapacitet. Sa druge strane, veoma veliki antioksidansi, koji brzo reaguju sa peroksil radikalom, u ovom slučaju reaguju sporo ili ne reaguju.

Spektrofotometrijska merenja mogu biti pod uticajem jedinjenja, kao što su karotenoidi koji apsorbuju na talsnoj dužini određivanja, i pod uticajem zamućenosti uzorka.

DPPH test nije pogodan za merenje antioksidativnog kapaciteta plazme, jer se proteini precipituju u alkoholnom reakcionom medijumu. DPPH reakcija je „vremenska“ i može da traje od 20 minuta do 6 sati.

1.6.1.6. TEAC- metoda (*Total Equivalent Capacity Assay*)

Ova metoda uključuje stvaranje dugo-živećih radikala, 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat) radikal-katjon (ABTS^{•+}) (Slika 1.23.) koji ima apsorpcione maksimume na talasnim dužinama od 414, 645, 734 i 815 nm.



Slika 1.23. Mehanizam delovanja ABTS^{•+}.

U zavisnosti od uslova korišćenja metoda, za određivanje ABTS^{•+} mogu se koristiti različite strategije (Re, 1999). ABTS^{•+} može biti određen reakcijom u kojoj se koristi mangan-dioksid ili kalijum-persulfat, enzimskim reakcijama korišćenjem mioglobina ili ren-peroksidaze, ili elektrohemski. Vreme trajanja reakcije je od 1 do 30 minuta. Određivanje se uglavnom vrši talasnoj dužini od 734 nm.

Rezulati se izražavaju kao Trolox ekvivalenti. Svako jedinjenje koje ima niži redoks potencijal od ABTS[•] može reagovati sa radikalom.

1.7. ATOMSKA APSORPCIONA SPEKTROFOTOMETRIJA

Atomska apsorpcija je proces koji se dešava kada atom u osnovnom stanju apsorbuje energiju u obliku elektromagnetskog zračenja specifične talasne dužine, rezonantne talasne dužine, i biva preveden u ekscitovano stanje. Apsorpcioni spektar elementa sastoji se od serija rezonantnih linija koje nastaju kada element iz osnovnog elektronskog stanja pređe u različita ekscitovana stanja. Uglavnom je prelaz između osnovnog i prvog ekscitovanog stanja praćen linijom najjačeg intenziteta koja se najčešće koristi za određivanje elementa. Prelaz elementa iz osnovnog u ekscitovano stanje se dešava kada atomi u osnovnom energetskom stanju prime određe ni iznos energije koji je proporcionalan frekvenciji njegovog prelaza do sledećeg energetskog nivoa. Pri tome se samo deo energije ukupnog zračenja izvora (P) apsorbuje.

Intenzitet propuštene svetlosti dat je sledećom formulom:

$$P = P_o e^{-(\varepsilon l)} \quad 1.10.$$

Gde je:

ε - apsorpcioni koeficijent analita,

l - horizontalna putanja dužine zračenja kroz plamen.

Atomska apsorpcija se meri merenjem razlike ukupnog zračenja rezonantnih linija u prisustvu i odsustvu atoma analita. Širina emitovane linije svetlosnog izvora mora biti reda veličine apsorpcione linije analita. Ovaj zahtev izvora svetlosti ispunjava cev sa šupljom katodom.

Količina apsorbovane energije iz snopa zračenja na talasnoj dužini rezonantne linije će zavisiti od količine atoma u osnovnom energetskom stanju. Odnos između količine apsorbovane energije i koncentracije ispitivanog elementa se može odrediti pomoću serije standardnih rastvora. Nepoznate koncentracije elementa u uzorcima se određuju upoređivanjem količine zračenja koje apsorbuju uzorci prema zračenju apsorbovanom od strane standardnih rastvora pri istim uslovima atomizacije. Savremeni softveri instrumenata automatski izračunavaju koncentraciju određivanog elementa u uzorku. Tehnika AAS omogućava prilično osetljivo određivanje većine elemenata (Risher i sar., 2003).

1.7.1. Atomski apsorpcioni spektrofotometar

Atomski apsorpcioni spektrofotometar se sastoji iz četiri osnovna dela: emisionog, apsorpcionog, selekcionog i mernog dela. Uloga emisionog dela je da obezbedi izvor zračenja rezonantne talasne dužine. Apsorpcioni deo je najvažniji deo aparata i ima zadatak da stvara

atome elementa u osnovnom stanju. U zavisnosti od načina atomizacije, ovi aparati se mogu podeliti u dve grupe: plamene i besplamene (*Marjanović i Jankovitć, 1983*). Kod besplamenih instrumenata atomizacija se može vršiti laserskim zracima, pomoću električnog luka u grafitnim kivetama ili katodnim isparavanjem. Selektioni deo, monohromator, ima ulogu da iz snopa svetlosnih zraka izdvoji uži snop zraka. Kod ovih instrumenata uloga monohromatora je svedena na minimum jer izvor zračenja obezbeđuje monohromatsko zračenje. Merni deo može biti fotoćelija ili fotomultiplikator.

Moderni aparati imaju mogućnost biranja talasne dužine preko prekidača ili tastature. Instrumentom se veoma jednostavno upravlja pomoću softvera integrisanog u instrument. Softver u sebi sadrži prozore i padajuće menije koji korisniku pokazuju sve mogućnosti aparature i omogućavaju da se na jednostavan način odaberu željeni uslovi analize. Ovakav način upravljanja instrumentom korisniku dozvoljava da prati napredak bilo koje automatske sekvene uključujući detalje metoda, signalnu grafiku, kalibraciju, izmerene parametre rastvora umomentu posmatranja kako u toku analize tako i po njenom završetku, a moguće je i paralelno štampanje izveštaja.

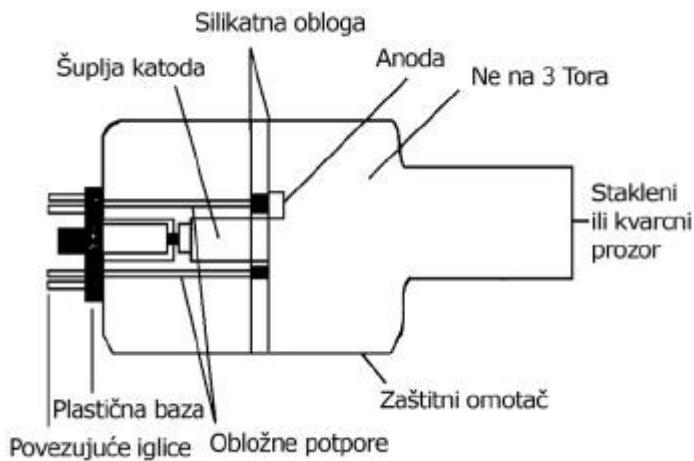
1.7.2. Svetlosni izvori

Svetlosni izvori u atomskom apsorpcionom spektrofotometru treba da obezbede monohromatsko zračenje rezonantne talasne dužine. Najčešće korišćeni i zvor svetlosti je šuplja katodna lampa i lampa sa električnim pražnjenjem.

1.7.3. Šuplja katodna lampa

Šuplja katodna lampa je najčešće korišćen izvor zračenja u atomskoj apsorpcionoj spektrofotometriji. Njeni osnovni delovi su anoda, katoda i stakleni ili kvarcni izlazni prozor, koji su zatvoreni u Pyrex cilindar (*Patnaik, 2004*) napunjen inertnim gasom (argon ili neon) pod pritiskom od 4-10 torr (1/760 atm=1 torr). Neonski gas obezbeđuje veći intenzitet emitovanih elementovih linija. Neon se kao inertni gas koristi samo kada neonska emisiona linija leži u blizini rezonantne linije katodnog elementa. Anodna žica se najčešće pozicionira duž cilindrične katode. Katoda je izgrađena u vidu šupljeg cilindra prevučenog elementom čiji spektar treba proizvesti, ili u nekim slučajevima, legure pažljivo odabrane mešavine metala koje spektralno ne interferiraju. Zaštitni omotač (neprovidan) oko spoljašnjosti katode odmah iza oboda sprečava neželjena pražnjenja oko spoljašnjosti katode. Izvori zračenja se u glavnom zagrevaju strujama

do 30 mA. Šematski prikaz šuplje katodne lampe sa svim njenim delovima prikazan je na slici 1.24.



Slika 1.24. Šuplja katodna lampa.

Šuplje katodne lampe emituju svetlost prolazeći kroz nekoliko faza. Saopštavanjem potencijala između anode i katode gasno punjenje se jonizuje. Pozitivno nanelektrisani joni sesudaraju sa negativno nanelektrisanom katodom. Atomi metala se nakon izbjivanja iz katode daljeekscituju preko sudara sa ionizovanim gasom emitujući svetlost specifične talasne dužine za taj element prilikom vraćanja iz ekscitovanog u osnovno atomsко stanje. Pošto katoda lampi sadrži jedan element određivanje svakog pojedinačnog elementa zahteva posebnu lampu. Ovo predstavlja osnovni nedostatak šupljih katodnih lampi. Komercijalne lampe su dostupne za 65 pojedinačnih elemenata, ali je dostupno i 20 multielementnih lampi (Patnaik, 2004). Lampe za pojedinačne elemente izrađene su za neke metale: cezijum, osmanijum, uranijum, za radioaktivne elemente, plemenite gasove, dok su lampe za halogene, ugljenik, azot, kiseonik i sumpor, nedostupne.

Male širine emisionih linija šupljih katodnih lampi obezbeđuju visoku selektivnost određivanja iako, u zavisnosti od elementa, može doći do preklapanja apsorpcionih linija različitih elemenata. Spektralna interferencija se može desiti kada različiti atomi apsorbuju energiju na talasnim dužinama koje se razlikuju za 0,05 nm i manje. Spektralna preklapanja se jedino mogu prevazići uklanjanjem interferentnog elementa ili, ako je moguće, izvođenjem određivanja na drugoj apsorpcionoj liniji.

1.7.4. Lampa sa električnim pražnjenjem

Lampa sa električnim pražnjenjem (electrodeless discharge lamp - EDL) se sastoje od elementa ili soli elementa smeštenih u kvarcnu cev ispunjenu atmosferom inertnog gasa. Kvarcna cev se nalazi u keramičkom cilindru na koji je namotan radiofrekventni kalem. Kada se primeni radiofrekventno polje dovoljne jačine, inertni gas se ionizuje i udružena energija izaziva isparavanje elementa i ekscitovanje atoma unutar cevi, što rezultira emisijom karakterističnog spektra. U većini instrumenata EDL i njeno postolje često su lako zamenljivi sa šupljom katodnom lampom.

U poređenju sa šupljom katodnom lampom EDL izvori obezbeđuju veći intenzitet zračenja a samim tim i veću osetljivost određivanja. Ovi izvori nude veću preciznost a njihova primena se preporučuje za analize u kojima je velik intenzitet šuma posledica slabe katodne emisije. Izvori ovog tipa su dostupni za sledeće elemente: arsen, bizmut, kadmijum, cezijum, živa, kalijum, fosfor, olovo, antimон, rubidijum, selen, titan, cink (Patnaik, 2004).

1.8. HPLC HROMATOGRAFIJA

HPLC skraćenica obuhvata dva tumačenja: tečna hromatografija pod visokim pritiskom (High Pressure Liquid Chromatography), kao i tečna hromatografija visokih mogućnosti (High Performance Liquid Chromatography).

Kod HPLC hromatografije mobilna, tečna faza funkcioniše pod visokim pritiskom, što je razlikuje od ostalih tečnih hromatografija. Visok pritisak omogućava kontinuiran protok mobilne faze i uspostavljenje dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom, što je uslov dobre selektivne raspodele komponenti datog uzorka. Visok pritisak omogućuje i efikasno eluiranje razdvojenih komponenti smeše iz kolone. Tu su pre svega snažne pumpe koje mogu stvarati pritisak 10^6Pa (10-tak atmosfera), sposobljene za kontinualnu promenu brzine mobilne faze. Uzorak se ubacuje u inekcioni blok, nakon čega ulazi u mobilnu fazu pod visokim pritiskom, podleže razdvajaju na koloni, zatim detekciji i na kraju analizi kao i kvantitativnoj kolekciji ukoliko se koristi preparativni tip kolone.

Mobilnu fazu predstavlja rastvarač ili smeša rastvarača. Izbor rastvarača je sličan kao i kod drugih podeonih hromatografija. Ako se koristi UV detektor za detekciju razdvojenih jedinjenja rastvarači bi trebalo da budu što je više UV transparentniji, mada ni značajnija

apsorpcija mobilne faze ne bi trebala da značajnije utiče na kvalitet razdvajanja. Mnogo je bitnije da se odredi optimalan protok mobilne faze. Protok mobilne faze se kreće u opsegu od 0,1-2,0 cm³/min.

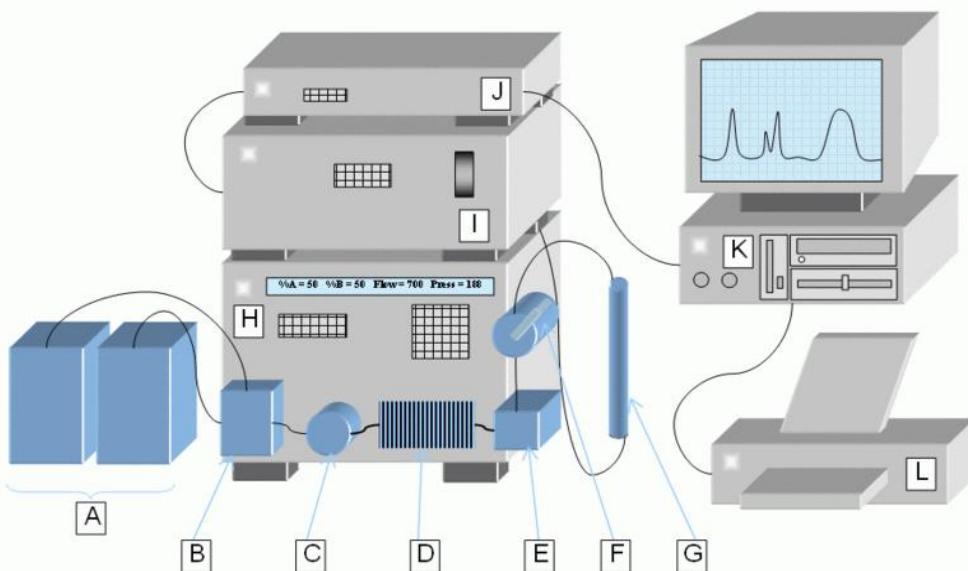
Prvenstveno se koristi kao vrlo moćna metoda za analizu biološki važnih molekula (pokazuju visoku polarnost, velika molekulska masa, prisustvo jonskih grupa i termolabilnost) u odnosu na šta je upotreba drugih hromatografija pokazala puno nedostataka.

HPLC metoda se izvodi tako što se analizirana smeša jedinjenja u odgovarajućem rastvaraču (mobilna faza) propušta kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna faza. Raspodela komponenti uzorka između faza je uzrokovana fizičko-hemijskim procesima: adsorpcijom, raspodelom između dve faze, jonskom izmenom, gel filtracijom, stvaranjem jonskih parova. Posledica toga je da se komponente smeše različito raspodeljuju između faza i pod uticajem mobilne faze kreću se kroz stacionarnu fazu različitim brzinama.

Mobilna faza je tečnog agregatnog stanja, najčešće voda ili neki organski rastvarač, dok je *stacionarna faza* granulovana čvrsta faza ili tečnost nanesena na granule čvrstog nosača i nerastvorna je u tečnosti koja predstavlja mobilnu fazu.

Uređaj za HPLC se sastoji od sledećih komponenata (slika 1.25.):

- Rezervoar mobilne faze
- Pumpa
- Injektor
- Kolona
- Detektor



Slika 1.25. Šema uređaja za tečnu hromatografiju visokih performansi: A-rezervoar mobilne faze; B-ventil za mešanje i pumpa; C- ventil; D-uređaj za kontrolu pritiska; E-komora za mešanje (mikser); F-injektor; G-kolona; H-HPLC komponenta; I-detektor; J-kontroler; K-kompjuter; L-štampač.

Na ulasku u hromatografsku kolonu nalazi se injekcioni blok preko koga se uz pomoć mikro-špriceva ubacuju tečni uzorci u sistem.

Kolona predstavlja "srce" HPLC sistema. One se najčešće prave od nerđajućeg čelika raznih dužina i prečnika. Čvrstu fazu u koloni čine veoma sitne staklene kuglice presvučene tankim poroznim slojem adsorbensa, izmenjivača ili tečnom fazom. Između prečnika čestica, dužine kolone i pritiska postoji direktna zavisnost. Tehnika punjenja kolone je od izuzetnog značaja. Nehomogena kolona daje loše rezultate u pogledu efikasnosti. Što se tiče dimenzija kolone, one su standardne (3-4 mm x 30 cm), ali i specifične (8 mm x 10 cm). Ove poslednje su naročito pogodne za visoke pritiske mobilnih faza.

Nakon razdvajanja na koloni, razdvojene komponente smeše se detektuju. Pricip rada detektora zasniva se na merenju neke fizičko-hemiske osobine rastvorene komponente u razvijaču.

U praksi se najčešće koriste ultraljubičasti detektori, koji kao izvor zračenja najčešće koriste deuterijumsku lampu, sa vrlo širokim emisionim spektrom zračenja, od 200-700 nm. Ovo

zračenje pošto prođe kroz mernu ćeliju sa mobilnom fazom, na drugom kraju pada na fotoćeliju i nagrađuje homogen šum, odnosno ravnu liniju (osim ako je, naglom promenom protoka, narušena ravnoteža koja postoji između stacionarne i mobilne faze). Čak i ako apsorpcija mobilne faze nije neznatna (mobilna faza se najčešće bira tako da ima zanemarljivu apsorpciju u mernom opsegu), ali je konstantna, fotoćelija opet registruje konstantan signal propuštenog zračenja (oslabljenog u odnosu na upadno zračenje), i opet bi trebala da se dobije ravna linija. Kada kroz mernu ćeliju nađe komponenta smeše, ona vrši apsorpciju, pa se intenzitet zračenja koje emizuje lampa dodatno smanjuje pre nego što padne na fotoćeliju, što se onda registruje kao otklon od ravne linije, tj. pik na hromatogramu (*Milenović, 2010; Green, 1996*).

Veoma je osjetljiv i fluorescentni detektor koji može da se koristi za detekciju svih supstanci koje mogu da fluoresciraju.

U poslednje vreme koriste se i veoma osjetljivi fotodiodni detektori (Photodiode array LC detector).

Električni signal koji se dobija na detektoru suviše je slab da bi se direktno mogao koristiti za pokretanje pisača. Zbog toga posebnu jedinicu čini elektronski pojačivač.

Novije generacije tečnih hromatograma poseduju funkciju vođenja cele hromatografske analize primenom kompjutera. Naime, kompjuter omogućava da se na uređaju za registraciju hromatograma dobijaju ispisani podaci za čitav niz podataka karakterističnih za tečnu hromatografiju, s tim što istovremeno kontroliše sve zadate parametre vezane za tok analize. Na taj način se svaka moguća greška odmah registruje i lako otklanja (*Hancock i sar., 1994*).

U zavisnosti od polarnosti uzorka i rastvarača (mobilne faze) HPLC metoda se deli na:

- HPLC na normalnim fazama i
- HPLC na obrnutim fazama

HPLC na normalnim fazama koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu, a koristi se kada je supstanca koja se analizira polarna. Polarna supstanca se adsorbuje i zadržava na česticama stacionarne faze. Jačina adsorpcije je veća što je veća polarnost supstance, a samim tim veće i vreme zadržavanja. Korišćenje polarnijih rastvarača u mobilnoj fazi smanjuje

retenciono vreme. Ovaj tip hromatografije je napušten sedamdesetih sa razvojem HPLC-a na obrnutim fazama, zbog slabe reproduktivnosti, usled promena na česticama stacionarne faze pod uticajem rastvarača.

HPLC na obrnutim fazama (RP-HPLC) koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Najčešća stacionarna faza je silikatna, tretirana sa RMe₂SiCl, gde je R alkilna grupa ravnog lanca kao C₁₈H₃₇ ili C₈H₁₇. Vreme zadržavanja je duže za manje polarne supstance. Vreme zadržavanja se povećava dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu a smanjuje se dodatkom hidrofobnih rastvarača. RP-HPLC funkcioniše na principu hidrofobnih interakcija, koje su rezultat odbijajućih sila između polarnog rastvarača i relativno nepolarne supstance koja se analizira i nepolarne stacionarne faze.

Na brzinu eluiranja utiče pH, zbog mogućnosti promene polarnosti supstance. Zbog toga se često u mobilnu fazu dodaju puferi. Kolone za RP-HPLC ne bi trebalo koristiti sa jakim bazama, zbog mogućnosti razgradnje silikatnih čestica.

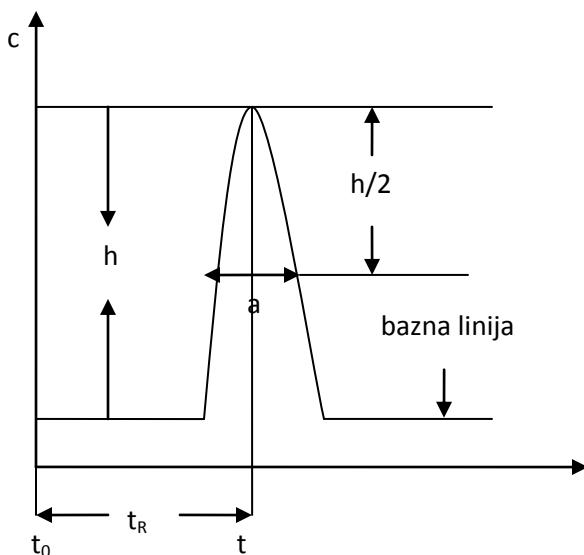
1.8.1. Kvalitativna HPLC analiza

Dobijen hromatogram sa pikovima koji predstavljaju izdvojene komponente ukazuje samo na broj komponenti u nekom uzorku, odnosno smeši, ali ništa ne kazuje o vrsti supstance. Kod kvalitativne analize identifikacija se vrši poređenjem standarda sa nepoznatom komponentom ispitivanog uzorka. Upoređuju se vreme zadržavanja standarda i izdvijene komponente u hromatografskoj koloni. To jedino i ima fizički smisao jer se vrši merenje vremena od ulaska uzorka u kolonu do dostizanja maksimuma pika izdvojene komponente. Vreme zadržavanja ili kako se u literaturi naziva *retenciono vreme* (lat. *retentio* – zadržavanje) meri se od trenutka kada se uzorak ubaci u kolonu do izlaska, jedne ili više komponenti iz kolone.

Kada se identificiše komponenta tada se metodom standardnog dodatka, odnosno dodatkom određene količine standarda u ispitivanom uzorku, sa absolutnom sigurnošću identificiće određena komponenta pod uslovom da se standardni dodatak i izdvojena komponenta po retencionom vremenu potpuno poklapaju. To se utvrđuje na osnovu povećanja visine pika izdvojene komponente.

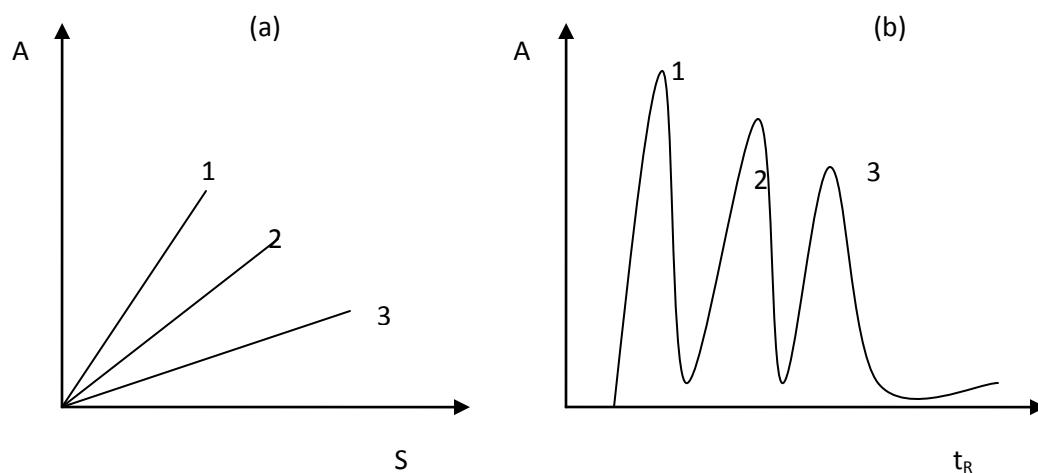
1.8.2. Kvantitativna HPLC analiza

Visina pika, ili tačnije površina ispod pika, izdvojene komponente direktno je proporcionalna koncentraciji. Kada se radi o simetričnom piku tada se najčešće koristi metoda poluvisine. Naime, kada se visina pika h pomnoži sa njegovom širinom a na poluvisini $h/2$ dobija se vrednost koja približno predstavlja 94% površine ispod pika. Ako se ista metoda koristi i za standard i za uzorak greška od 6% se poništava, a dobijeni rezultati potpuno zadovoljavaju (slika 1.26.).



Slika 1.26. Kvantitativna HPLC analiza.

Treba voditi računa da izračunate površine pikova predstavljaju meru relativnih koncentracija komponenti u smeši. Ukoliko se žele absolutne koncentracije komponenata potrebno je napraviti kalibracioni dijagram koji će povezati površine pikova sa apsorbancijama odgovarajućih komponenti. Osnov za povezivanje je kalibracioni dijagram $A = f(S)$, prikazan na slici 9, gde je A – apsorbancija, a S – integrisana površina pikova. Apsorbance A su određene za niz standardnih koncentracija rastvora supstanci, koje se analiziraju HPLC-om. Kada se nakon izvršene HPLC analize odredi integrisana površina za dati pik, sa kalibracionog dijagrama pročita se odgovarajuća vrednost apsorbancije A na ordinati, a odatle se preko Beer-ovog zakona ($A = abc$) izračuna i tačna koncentracija (slika 1.27.).



Slika 1.27. Kalibracioni dijagram (a) i hromatogram (b) za tri komponente date smeši, gde je A – apsorbancija, S – površina pika, t_R – retenciono vreme.

Nekada je potrebno da pored određivanja tačne koncentracije komponenti u uzorku i njihova kvantitativna kolekcija (skupljanje). Tada se koriste preparativne kolone, znatno šireg prečnika (i do 1cm) posebno konstruisane za visoki pritisak. Kolekcije se vrši prostim skupljanjem odgovarajućih vrakcija mobilne faze koje sadrže datu komponentu. Početak i kraj kolekcije se vezuje za momente pojavljivanja i nestajanja odgovarajućeg pika na hromatogramu.

1.9. MIKROORGANIZMI I ANTIMIKROBNA SVOJSTVA

Mikroorganizmi dovode do čestog kvarenja hrane tako da je njihovo prisustvo jedan od najvećih problema sa kojim se susrećemo. Mnogi mikroorganizmi kao što su *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* su uzročnici kvarenja hrane i bolesti prenesenih konzumiranjem inficiranih namirnica (Stark, 1969). Kao značajni prirodni antimikrobni agensi ističu se ekstrakti voća, kao što je plod duda.

Antimikrobna aktivnost se ogleda u sposobnosti da nakon apsorpcije u organizmu ljudi ili životinja uništavaju bakterije i druge štetne mikroorganizme, a da pri tom ne deluju toksično na organizam domaćina.

Bakterije su jednoćelijski organizmi prokariotske građe koji se mogu videti samo elektronskim mikroskopom. Mogu živeti u različitim uslovima, ali najpogodniji za njihov rast jeste zdrav organizam (Duraković, 1996). Prema bojenju po Gramu dele se na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Gram-negativne bakterije imaju jedan sloj lipopolisaharida koji pokriva njihov ćelijski zid i boje se crveno, dok Gram-pozitivne bakterije nemaju taj sloj i boje se ljubičasto.

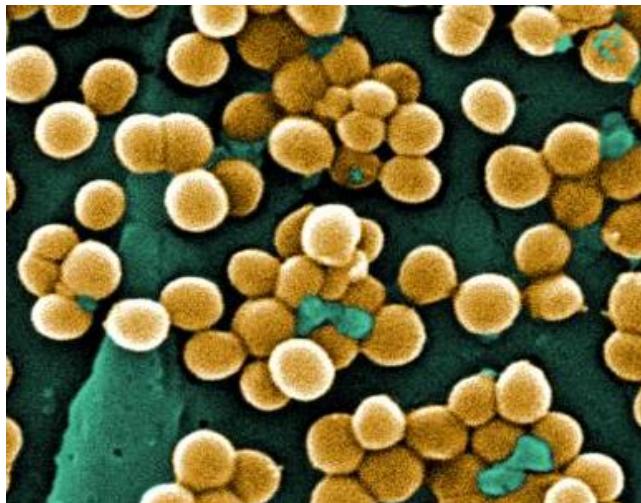
Antimikrobna aktivnost ekstrakata duda ispitana je na bakterijskim patogenima koji su u hrani prisutni najčešće:

Escherichia coli (slika 1.28.) je Gram-negativna bakterija štapićastog oblika koja naseljava creva čoveka i životinja. Pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Predstavlja deo crevne flore i neophodna je za varenje i sintezu nekih supstanci (kao što je vitamin K). *Escherichia coli* je indicator zagađenosti voda fekalijama i jedan je od glavnih uzročnika bakterijskih infekcija čoveka. Može izazvati infekcije gastrointestinalnog, urogenitalnog trakta, sepsu, meningitis, zapaljenje pluća (Duraković, 1996).

Staphylococcus aureus (slika 1.29.) ili zlatni stafilocok je Gram-pozitivna bakterija iz grupe stafilocoka. Pripada porodici *Micrococcaceae*. Loptastog je oblika i gradi jata ili grozdove. Ime je dobila po žuto-zelenim kolonijama koje gradi. Ova bakterija spada u fakultativno anaerobne bakterije, potreban joj je kiseonik za dobijanje energije, ali može opstati i bez njega. Sintetiše veliki broj toksina koji doprinose patogenosti. *Staphylococcus aureus* često naseljava kožu i sluzokožu i može dovesti do teških bolesti kao što su sepsa, zapaljenje pluća, sindrom toksičnog šoka (Duraković, 1996).



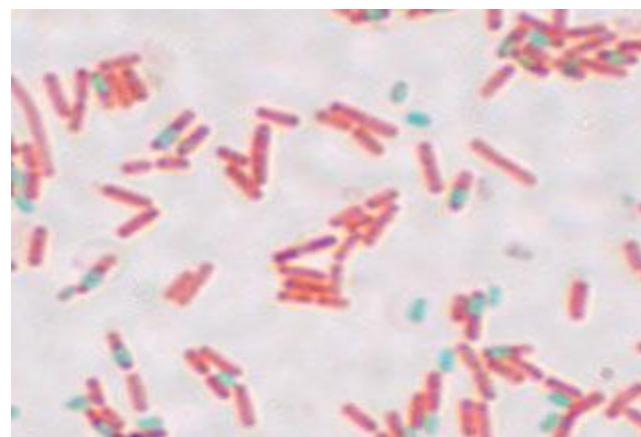
Slika 1.28. Bakterija *Escherichia coli*.



Slika 1.29. Bakterija *Staphylococcus aureus*.

Bacillus subtilis (slika 1.30.) je Gram-pozitivna bakterija i katalaza-pozitivna bakterija štapićastog oblika. Pripada porodici *Bacillaceae*. Ova bakterija može da formira debelozidne endospore pa je tako otporna na ekstremne uslove spoljašnje sredine.

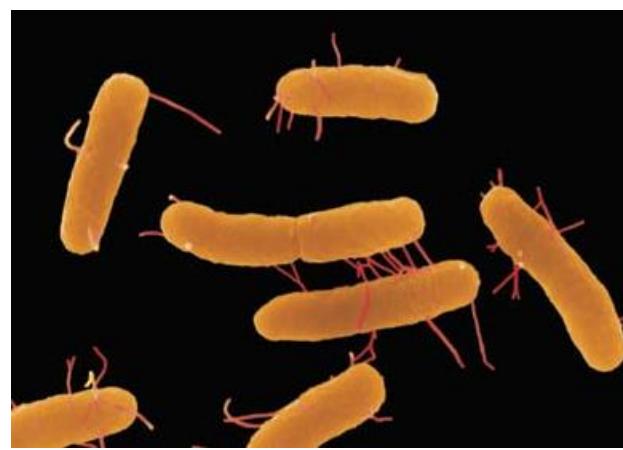
Pseudomonas aeruginosa (slika 1.31.) je Gram-negativna bakterija štapićastog oblika. Nalazi se u zemljištu, vodi i namirnicama. Pripada porodici *Pseudomonadaceae*. Ova bakterija koristi širok spektar organskih materija za hranu, lako može da zarazi oštećena tkiva što dovodi do upale, infekcije rana, pluća, kože i sepse (Duraković, 1996).



Slika 1.30. Bakterija *Bacillus subtilis*.



Slika 1.31. Bakterija *Pseudomonas aeruginosa*.



Slika 1.32. Bakterija *Salmonella typhimurium*.

Bakterije roda *Salmonella*, kao što je *Salmonella typhimurium* (slika 1.32.), predstavljaju tipične patogene crevne bakterije. Pripada porodici *Enterobacteriaceae*. *Salmonella typhimurium* je Gram-negativna, pokretna bakterija sa flagelama. Ove bakterije nisu probirači već rastu na svim hranljivim podlogama a prema potrebama za kiseonikom mogu biti aerobne i fakultativno anaerobne. Prirodni rezervoar i izvor zaraze su domaće životinje i ptice, pri čemu životinje imaju klinički manifestni oblik bolesti ili su kliconoše. Pored životinja značajni izvor su i ljudi oboleli ili kliconoše. Za *S. typhimurium* je jedino čovek izvor zaraze. Osnovni put prenošenja infekcije je alimentaran (meso, mesni produkti, jaja, mleko, mlečni proizvodi, riba). Mehanizam širenja infekcije je fekalno - oralni.

Antimikrobnna aktivnost fenolnih jedinjenja je posledica različitih mehanizama delovanja, a vrsta mikroorganizma i njegova građa takođe imaju važnu ulogu (*Shan i sar.*, 2007). Polifenoli mogu ući kroz ćelijski zid u mikroorganizam što dovodi do narušavanja strukture i funkcije njihove ćelijske membrane (*Hugo i Bloomfield*, 1971).

1.9.1. Difuzioni metod

Za određivanje antimikrobnne aktivnosti supstanci koristi se difuzioni metod. Ovaj metod zasniva se na tome da se na odabranu podlogu koja je zasejana odgovarajućim test-mikroorganizmom nanese ispitivani uzorak koji sa tog mesta radijalno difunduje u svim pravcima sprečavajući rast mikroorganizma, ukoliko je taj mikroorganizam osetljiv na dejstvo ispitivanog uzorka. Širina zone inhibicije je srazmerna stepenu osetljivosti mikroorganizma na ispitivani uzorak, odnosno antimikrobnom svojstvu uzorka. Nakon dodatka inokulum, hranljiva podloga se homogenizuje i razlige u Petrijeve šolje. Na određena mesta se posredstvom celuloznih diskova dozira ispitivani uzorak i inkubira u termostatu na 37°C u toku 24-48 h. Zatim se meri prečnik zone inhibicije rasta mikroorganizma u mm ili cm (*Gudžić*, 2003). Prečnik zone inhibicije je proporcionalan logaritmu koncentracije ispitivane supstance. Eksperiment je neophodno izvoditi u replikatu. Takođe, neophodno je koristiti dve vrste kontrole: pozitivnu i negativnu. Negativna kontrola podrazumeva da se na disk umesto ispitivanog uzorka nanosi rastvarač (u kojem je uzorak rastvoren), dok pozitivna kontrola uključuje primenu standardnih antibiotika. Mikroorganizam je otporan na dejstvo ispitivanog uzorka ukoliko nema zone inhibicije.

1.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi eksperimenti su izvršeni u najmanje tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost. Određena je standardna devijacija. Za pojedine parametre je urađena analiza varijanse (ANOVA), kao i koeficijent korelacije između parametara.

Analize korelacija među određivanim parametrima. Korišćeni statistički alat je bila PCA. PCA omogućuje određivanje grupe podataka, smanjujući njenu veličinu, i čuvajući većinu korisnih statističkih informacija koje su prisutne u polaznim podacima. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) za trostruka određivanja.

Analiza glavne komponente (PCA) se koristi kao statističko oruđe. Koristi se sa ciljem da evaluira set podataka, smanjujući njegovu dimenziju i čuvajući najveći deo statističke informacije. PCA dozvoljava utvrđivanje veze između varijabli. Analiza je izvedena korišćenjem analize podataka i statističke aplikacije dostupne za Microsoft Excel® (XLSTAT 2013.6.03, Addinsoft SARL, Pariz, Francuska).

2. EKSPERIMENTALNI DEO

2.1. MATERIJAL

Materijal koji je korišćen u radu dat je tabeli 2.1..

Tabela 2.1. Ispitivani materijal u radu.

Biljka	Vrsta	Deo biljke	Lokalitet	Vreme branja
Beli dud	<i>Morus alba</i> L.	Plod	Bela Palanka	Jul 2011
Crveni dud	<i>Morus rubra</i> L.	Plod	Bela Palanka	Jul 2011
Crni dud	<i>Morus nigra</i> L.	Plod	Bela Palanka	Jul 2011

2.2. APARATI

Za ispitivanje sadržaja fenolnih komponenti, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, kao i metalnih jona u plodovima dudova korišćena je sledeća oprema:

1. Blender za homogenizovanje materijala;
2. Analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S za odmeravanje uzoraka i čvrstih supstanci;
3. Ultrazvučna kada;
4. MicroMed high purity water system, TKA WasseraufbereitungsszsteGmbH za dobijanje demineralizovane vode;
5. Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations za termostatiranje rastvora;
6. pH metar Hanna Instruments za merenje pH vrednosti rastvora;
7. Varijabilne automatske pipette Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora;
8. Hronometar za merenje vremena;
9. UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 sa kivetom dužine optičkog puta 1 cm za određivanje sadržaja i ispitivanje kinetike fenolnih jedinjenja;
10. HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series koji se sastoji od kvaternarne pumpe G1354A, automatskog injektoru G1329A, termostatiranog kolonskog dela G1316A i
11. Varian SpectraAA 10 sa pozadinskom korekcijom i šupljom katodnom lampom.

2.3. REAGENSI

U radu su korišćeni sledeći reagensi:

- *Rastvor Folin-Ciocalteu reagensa* sadrži smešu fosfovolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolibdenove kiseline ($H_3PMo_{12}O_{40}$) (komercijalni proizvod).
- *Rastvor Na-karbonata (20%)* pripremljen rastvaranjem 200 g anhidrovanog Na_2CO_3 u 800 ml vode. Rastvor se zagreva dok se celokupna količina soli ne rastvori. Nakon hlađenja doda se par kristalića Na_2CO_3 . Nakon inkubacije od 24 h rastvor se filtrira i dopuni dejonizvanom vodom do 1 dm^3 .
- *Standardni rastvor galne kiseline* je pripremljen na sledeći način: 50 mg galne kiseline se rastvori u 10 cm^3 metanola, prenese u normalni sud od 100 cm^3 i dopuni dejonizovanom vodom do crte. Dobijena koncentracija iznosi 5 mg/cm^3 . Da bi se dobila koncentracija od $0,05\text{ mg/cm}^3$, 1 cm^3 prethodno pripremljenog rastvora prenese se u normalni sud od 100 cm^3 i dopuni dejonizovanom vodom do crte.
- *Radni rastvor $NaNO_2$ (5%)*, pripremljen je odmeravanjem određene mase $NaNO_2$ i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.
- *Radni rastvor $AlCl_3$ (2%)* pripremljen je odmeravanjem određene mase $AlCl_3$ i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.
- *Standardni rastvor katehina*: 5 mg katehina rastvoreno je u 5 cm^3 etanola, preneto u odmerni sud od 10 cm^3 koji je dopunjen do crte dejonizovanom vodom. Rastvor je koncentracije $0,5\text{ mg/cm}^3$. 1 cm^3 ovog rastvora je prenet u normalni sud od 10 cm^3 i dopunjen vodom do crte, tako da je dobijen rastvor koncentracije $0,05\text{ mg/cm}^3$. Iz ovog rastvora je pripremljena serija razblaženja pomoću koga je konstruisana kalibraciona kriva.
- *Radni rastvor Na-hidroksida, $c=1\text{ mol/dm}^3$* , pripremljen je odmeravanjem određene mase $NaOH$ i rastvaranjem u dejonizovanoj vodi.

- *Osnovni rastvor DPPH*, $c=1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, pripremljen je odmeravanjem 0,0394 g DPPH i rastvaranjem u metanolu u normalnom sudu od 100 cm³. Radni rastvor, $c=1,0 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, pravljen je pre početka rada razblaživanjem osnovnog.
- *Osnovni rastvor troloksa* ($c=1,0 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³), pripremljen je odmeravanjem određene mase troloksa i rastvaranjem u metanolu.
- *Rastvor kalijum-hloridnog pufera pH=1,0* pripremljen je rastvaranjem 1,86 g KCl u 980cm³ dejonizovane vode podešavanjem do pH=1,0 koncentrovanom HCl i zapremine do 1 dm³ dejonizovanom vodom.
- *Rastvor natrijum-acetatnog pufera pH=4,5* pripremljen je rastvaranjem 54,43 g CH₃COONa·3H₂O u 980 cm³ dejonizovane vode podešavanjem do pH=4,5 koncentrovanom HCl i zapremine do 1 dm³ dejonizovanom vodom.
- Korišćeni su sertifikovani standardi za HPLC analizu.

Sve hemikalije i rastvarači koji su korišćeni bili su p.a. i HPLC čistoće nabavljeni od Merck (Darmstadt, Germany) i Sigma-Aldrich (GmbH, Sterbeim, Germany).

Svi rastvori, koji se nisu mogli pripremiti kao primarni standardni rastvori, standardizovani su poznatim metodama u cilju određivanja tačne koncentracije.

Sudovi koji su korišćeni prani su etanolnim rastvorom KOH, zatim rastvorom HCl (1:1), isprani česmenskom, destilovanom i dejonizovanom vodom. Vodeni rastvori su pripremani dejonizovanom vodom specifične provodljivosti 0,05 µS/cm.

2.4. METODE

2.4.1. Priprema uzoraka

Plodovi belog, crvenog i crnog duda prikupljeni su početkom jula 2011. godine u jugoistočnoj Srbiji, na području Bele Palanke. Voće je spakovano u plastične kese i čuvano u zamrzivaču do korišćenja i pravljenja ekstrakata. Uzoreci za analizu predhodno su pripremani postupkom ekstrakcije ili postupkom mineralizacije u zavisnosti da li se u njima određuje sadržaj fenolnih komponenti ili sadržaj metalnih jona.

2.4.2. Postupak ekstrakcije

Odmjerena je masa (10 g) prethodno blenderom homogenizovanog ploda duda. Ekstrakcija je vršena na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta sa po 100 cm³ sledećih rastvarača: voda, etanol 50%, etanol, aceton 50%, aceton, metanol 50% i metanol. Suspenzija je filtrovana kroz Bihnerov levak i Whatman No.1 filter papir. Ekstrakti su smešteni u frižideru i na tamnom mestu do njihovog korišćenja (*Jacopini i sar.*, 2008; *Borowska i sar.*, 2009; *Katalinić i sar.*, 2010).

Ekstrakti za HPLC analizu su pravljeni tako što je izmereno 10g blenderom homogenizovanog ploda duda, a zatim vršena ekstrakcija sa 50 cm³ rastvarača na magnetnoj mešalici tri puta po pola sata.

2.4.3. Postupak mineralizacije

Standardna procedura za pripremu uzorka za određivanje metala opisana je od strane Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). Uzorci težine 10 g, prethodno homogenizovanog ploda belog, crvenog i crnog duda, prebacuje se u porculansku teglicu i zagrevaju 2 h na 50°C. Izmeri se po 1 g osušenog voća i prebaci u peć za žarenje i temperatura postepeno povećava za po 50°C. Kada se dostigne temperatura od 450°C, zagrevanje se nastavlja na toj temperaturi narednih 3 h. Ohlađeni uzorak se tretira sa 5 cm³ HCl (1:1), prenese u normalni sud od 50 ml i dopuni do crte sa HNO₃ (0,1 M). Kada se uzorak prohladi vrši se cedenje.

2.5. UV/Vis SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

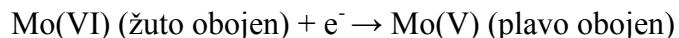
UV/Vis spektrofotometrija je primenjena za određivanje ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i antioksidativne aktivnosti primenom DPPH i ABTS metode.

2.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola u pripremljenim uzorcima korišćena je modifikovana metoda po Folin-Ciocalteu (*Singleton i Rossi*, 1965). Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih jedinjenja pomoću reagensa, odnosno rastvora Folin-Ciocalteu. Rastvor Folin-Ciocalteu sadrži smešu fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Ovaj reagens oksiduje fenolna jedinjenja, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida i molibden-oksida.



2.1.



Ratvor postaje intenzivno plave boje, čiji je intenzitet srazmeran količini fenolnih jedinjenja. Plava boja oksida je stabilna. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini $\lambda = 760 \text{ nm}$.

Rastvori i reagensi:

1. 20% Na_2CO_3 ,
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. Standardni rastvor galne kiseline

Postupak:

U normalni sud od 10 cm^3 unosi se zapremina uzorka od 1 cm^3 . Nakon toga, dodaje se $2,5 \text{ cm}^3$ dejonizovane vode, $0,5 \text{ cm}^3$ rastvora Folin-Ciocalteu i 2 cm^3 rastvora natrijum karbonata (20%). Sud se dopuni do crte vodom i nakon 2 h se meri apsorbanca na talasnoj dužini $\lambda = 760 \text{ nm}$, u odnosu na vodu kao slepu probu.

Kao standard korišćena je galna kiselina i dobijeni rezultati su izrađeni kao ekvivalenti galne kiseline ($\text{mgGAE}/100\text{g}$) korišćenjem jednačine iz kalibracione krive.

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline određuje se masena koncentracija ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) polifenolnih jedinjenja korišćenjem jednačine prave:

$$A = (0,0297 \pm 0,0012) \cdot c + 0,008 \pm 0,0006, n=5, R^2 = 0,998 \quad 2.2.$$

2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Flavonoidi imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalne komplekse (*Jia i sar., 1999*). Naročito je važan kompleks sa Al^{3+} . Sadržaj ukupnih flavonoida određivan je korišćenjem spektrofotometrijske metode koja je zasnovana na formiranju kompleksa između flavonoida i aluminijuma (*Ordom i sar., 2006*).

Rastvori i reagensi:

1. 5% NaNO₂
2. 2% AlCl₃
3. 1mol/dm³ NaOH
4. Standardni rastvor katehina (0,5 mg/dm³)

Postupak:

Reakcionalna smeša je pripremljena mešanjem zapremine uzorka od 1 cm³, 3 cm³ deionizovane vode i 0,3 cm³ 5% NaNO₂. Nakon 5min stajanja na sobnoj temperaturi dodato je 3 cm³ 1% AlCl₃, nakon 5 minuta još 2 cm³ 1mol/dm³ NaOH i deionizovana voda do 10 cm³. Apsorbanca je merena na $\lambda = 510$ nm, u odnosu na deionizovanu vodu kao slepu probu.

Ukupni sadržaj flavonoida izražen je kao katehin ekvivalent (mgCE/100g) korišćenjem jednačine iz kalibracione krive.

$$A = (0,0233 \pm 0,0008) \cdot c + 0,009 \pm 0,0002, n=5, R^2 = 0,997 \quad 2.3.$$

2.5.3. Određivanje sadržaja monomernih antocijana (pH diferencijalna metoda)

Sa vremenom, kao i pod uticajem različitih faktora (temperatura, kiseonik i dr.) dolazi do degradacije monomernih antocijana, ili se povezuju međusobno ili sa drugim prisutnim jedinjenjima, formirajući na taj način proizvode razgradnje. Iako količina monomernih antocijana opada, intenzitet boje se ne menja, jer u reakcijama kondenzacije nastaju obojeni kondenzovani proizvodi koji su čak i stabilniji nego monomeri (slobodni) antocijani. Zbog toga se kvantitativno određivanje ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva na osobini antocijana, da pri promeni pH sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi do promena apsorpcionog spektra. Određivanje sadržaja monomernih antocijana izvodi se pH diferencijalnom metodom, koja se zasniva na osobini monomernih antocijana da su pri pH 1.0 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalnom obliku (bezbojni) (Guisti i Wrolstad, 2003).

Antocijani daju maksimum apsorbance na 520 nm pri pH 1. Zbog toga se kvantitativno određivanje ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva na osobini antocijana, da pri promeni pH sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi do promena apsorpcionog spektra.

Reagensi:

1. 0,025 mol/dm³ kalijum-hloridni pufer, pH = 1,0,
2. 0,4 mol/dm³ natrijum-acetatni pufer, pH = 4,5.

Postupak:

Odmeri se zapremina uzorka od 1 cm³ i prenese u dva odmerna suda od 10 cm³, koja su zatim dopunjena puferom pH 1,0, odnosno pH 4,5. Nakon 15 minuta izmeri se apsorbancija na 520 nm i 700 nm (zbog korekcije zamućenja).

Apsorbance ispitivanih ekstrakata izračunavaju se jednačinom:

$$A = (A_{\lambda \text{vis}-\max} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\lambda \text{vis}-\max} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad 2.4.$$

Sadržaj monomernih antocijana izračunava se jednačinom:

$$\text{MA}(\text{mg}/\text{dm}^3) = (A \cdot M \cdot DF \cdot 1000) / (\varepsilon \cdot l) \quad 2.5.$$

ε - molarna aporptivnost (26900 dm³/mol·cm)

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

DF- faktor razblaženja ($V_{\text{ekstrakta}}/V_{\text{rastvora}}$)

l- debljina kivete (1 cm).

2.5.4. Određivanje radikal „skevindžer“ kapaciteta

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala ispitivanih uzoraka određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališe DPPH- radikale (DPPH test) (Brand-Williams i sar., 1995). Metoda se zasniva na praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot-centriranog DPPH- radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) u redukovanoj žuto obojenoj formi DPPH-H (Hayder i sar., 2004, Fuhram i sar., 2001; Lacham i sar., 2007; Sanchez-Moreno i sar., 1999; Turkoglu i sar., 2007; Villano i sar., 2006).

Postupak:

Potreбно је припремити sledeће rastvore:

- *DPPH rastvor:* 6 mg DPPH je rastvoreno u 250 cm³ metanola.
- *Radni rastvor :* U normalni sud od 10 cm³, odmeri se zapremina uzorka od 1 cm³, doda 5 cm³ sveže napravljenog DPPH i dopini do crte metanolom.

- *Kontrolni rastvor* (rastvor slepe probe): U normalni sud od 10 cm^3 , odmeri se zapremina od 5 cm^3 sveže napravljenog DPPH i dopuni do crte metanolom.

Apsorbance dobijenih rastvora određene su spektrofotometrijski na 515 nm nakon 30 minuta stajanja na sobnoj temperaturi, uz MeOH kao referentni rastvor. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (Radical Scavenging Capacity-RSC) računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{RSC (\%)} = (1 - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{blank}}) \cdot 100 \quad 2.6.$$

A_{blank} – apsorbanca kontrolnog rastvora ($1 \cdot 10^{-4}\text{ mol/dm}^3$ DPPH u metanolu)

A_{uzorak} – apsorbanca uzorka.

Ukupna antioksidativna aktivnost u polaznom uzorku izražena je kao ekvivalent troloksa na 100 g svežeg voća (mgTE/100g). Troloks je komercijalni sintetički antioksidans.

2.5.5. TEAC metoda

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćenjem ABTS testa (*Total Equivalent Capacity assay*) korišćena je modifikovana metoda (Re, 1999).

Postupak:

Potrebno je pripremiti sledeće rastvore:

- *Osnovni ABTS rastvor*: $0,036\text{ g}$ ABTS je rastvoren u 10 cm^3 metanola ($7 \cdot 10^{-3}\text{ M}$).
- *Razblaženi rastvor ABTS*: osnovni ABTS rastvor razblažiti tako da apsorbanca na 734 nm iznosi $0,70 \pm 0,02$.
- *Radni rastvor* : U normalni sud od 10 cm^3 , odmeri se zapremina uzorka od $0,1\text{ cm}^3$, doda $3,9\text{ cm}^3$ sveže napravljenog ABTS.
- *Kontrolni rastvor* (rastvor slepe probe): U normalni sud od 10 cm^3 , odmeri se zapremina od $0,1\text{ cm}^3$ metanola, doda $3,9\text{ cm}^3$ sveže napravljenog ABTS.

ABTS radikal katjon se dobija u reakciji između ABTS i rastvora kalijum-persulfata ($2,4 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$). Ova smeša stoji u mraku na sobnoj temperaturi $12\text{-}16$ sati pre upotrebe.

$0,1\text{ cm}^3$ ekstrakta se pomeša sa $3,9\text{ cm}^3$ razblaženog rastvora ABTS. Nakon odvijanja reakcije na sobnoj temperature, posle 6 minuta meri se apsorbanca na 734 nm .

$$\Delta A = A_{\text{blank}} - A$$

Rezultati se izražavaju kao miligrami troloks ekvivalenta na 100g svežeg voća (mgTE/100g).

2.6. HPLC METODA

Tečna hromatografija sa UV/Vis i fluorescentnim detektorom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) primenjena je za razdvajanje i kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u pripremljenim uzorcima. Izvršen je razvoj HPLC metode pri čemu su sledeći parametri pokazali najbolje rezultate. Hromatografsko razdvajanje izvršeno je na Eclipse XDB-C18 koloni (4,6mm x 150 mm) uz sistem rastvarača: A – ($H_2O+5\%HCOOH$) i B - (80%ACN+5%HCOOH+ H_2O). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-28 min, 0.0%B; 28-35 min, 25%B; 35-40 min, 50%B; 40-45 min, 80%B, i na kraju poslednjih 10 min ponovo 0%B. Protok mobilne faze je iznosio 0,8 cm³/min. Injektovano je 5 µl rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosamplera. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30°C.

Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi: malvidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, halogenske kiseline, p-kumarne, kafene i ferulne kiseline, katehina, epikatehina, kvercetina i kempferola. Kvantitativno određivanje komponenata je izvršeno metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen osnovni rastvor standarda masene koncentracije 1,0 mg/cm³, rastvaranjem u 10% rastvoru metanola. Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina u zavisnosti od masene koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije komponenti u uzorcima. Za komponente u uzorcima za koje nije bio dostupan standard, kvantifikacija je izvršena na osnovu kalibracione krive, po strukturi odgovarajućeg standarda.

Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

2.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA AAS METODOM

AAS metoda je korišćena za kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja metala u biljnom materijalu i ekstraktima tri vrste duda. Korišćen je aparat Varian SpectraAA 10 sa šupljom katodnom lampom i pozadinskom korekcijom. Smeša vazduha i acetilena korišćena je za određivanje svih elemenata. Kalibracioni interval, talasna dužina, detekcioni limit dati su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Analitičke karakteristike određivanja metala AAS metodom.

Element	Opseg linearnosti (mg/dm ³)	LOD (mg/dm ³)	Talasna dužina (nm)	Slit	Korelacioni koeficijent
Fe	0,00-10,00	0,015	248,3	0,2	0,9987
Cu	0,00-1,00	0,007	213,9	1,0	0,9999
Zn	0,00-5,00	0,021	324,8	0,5	0,9990
Pb	0,00-1,00	0,002	217,0	1,0	0,9993
Cd	0,00-1,00	0,003	228,8	0,5	0,9991
Mn	0,00-2,00	0,005	279,5	0,2	0,9987
Ni	0,00-1,00	0,002	232,0	0,2	0,9994

Rastvori i reagensi:

- Multi standard – ACCUSTANDARD ultra pure
- acetilen (99,999% čistoće)
- Protok gasa za hlađenje – 0,2 dm³/min
- Protok raspršivača gasa – 0,4 dm³/min

Za svaki element čiji sadržaj je bilo potrebno odrediti, formirana je metoda tako što je izvršen izbor odgovarajućih parametara metode i odabirom više talasnih dužina. U cilju konstruisanja kalibracione prave koja daje zavisnost relativnog intenziteta signala na odgovarajućoj talasnoj dužini u funkciji od koncentracije analita, snimana je slepa proba (dejonizovana voda) i dva rastvora standarda različitih koncentracija dobijenih razblaživanjem osnovnog, referentnog standarda. Za svako merenje rađene su po tri probe. Izbor najbolje, pa samim tim i radne talasne dužine, vršen je na osnovu relativnog intenziteta signala kao mere osetljivosti metode, grešaka na odzivu standarda kao i na osnovu veličine interferiranja prisutnih elemenata u ovakovom realnom uzorku.

2.8. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

In vitro antimikrobna aktivnost ekstrakata je ispitana na panelu laboratorijskih kontrolnih sojeva koji pripadaju kolekciji American Type Culture Collection Maryland, USA (osim jednog, koji pripada kulturama National Collection Type Cultures). Antibakterijska aktivnost je ocenjena u odnosu na dve gram-pozitivne i tri gram-negativne bakterije. Gram-pozitivne bakterije koje su korišćene bile su: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Gram-negativne bakterije korišćene u eksperimentu bile su: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella typhimurium* NCTC 6017. Za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata korišćena je disk-difuziona metoda, prema (NCCLS 1997). Inokulirani bakterijski sojevi pripremljeni su od bujona kulture koja je stajala preko noći i suspenzije su podešene na standardu zamućenost od 0,5 McFarland. 100 µl suspenzije koja sadrži $1,0 \times 10^8$ CFU/cm³ bakterija spora zasejane su na Mueller-Hinton agaru (MHA, Torlak) i Sabouraud dekstroznom agaru (SDA, Torlak), respektivno, u sterilizovanim petri šoljama (prečnika 90 mm). Diskovi (prečnika 9 mm, Macherey-Nagel, Düren) (Nemačka) impregnirani su sa 20 µl i 50 µl ekstrakata (konc. 30 mg/ml) i stavljeni na inokulirani agar. Negativni kontrolni uzorci su pripremljeni korišćenjem istog rastvarača (etanol). Tertaciklin (30 µg, Torlak) i nistatin (30 µg, Torlak) korišćeni su kao pozitivni referentni standardi za određivanje osetljivosti sojeva svake ispitivane vrste mikroorganizma. Inokulirane ploče čuvane su 2 h na 4°C i inkubirane na 37°C (24 h) za bakterijske sojeve. Antimikrobna aktivnost je ocenjena merenjem zone inhibicije za ispitivane mikroorganizme. Svaka proba ovog eksperimenta ponovljena je tri puta.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA PLODA BELOG DUDA (*Morus alba L.*)

Polifenolna jedinjenja se iz biljaka izoliju postupkom ekstrakcije. Postupak ekstrakcije je detaljno opisan u eksperimentalnom delu. Količina polifenolnih jedinjenja u ekstraktima u velikoj meri zavisi od načina ekstrakcije i polarnosti rastvarača (Moller i sar., 1999).

Pripremljeno je i analizirano sedam različitih ekstrakata ploda belog duda u sledećim rastvaračima: voda, etanol 50%, etanol, metanol 50%, metanol, aceton 50% i aceton, sa ciljem da se odredi uticaj polarnosti rastvarača na količinu ekstrahovanih fenolnih jedinjenja i da se odredi njihov sadržaj u ispitivanim ekstraktima kao i njihova antioksidativna aktivnost.

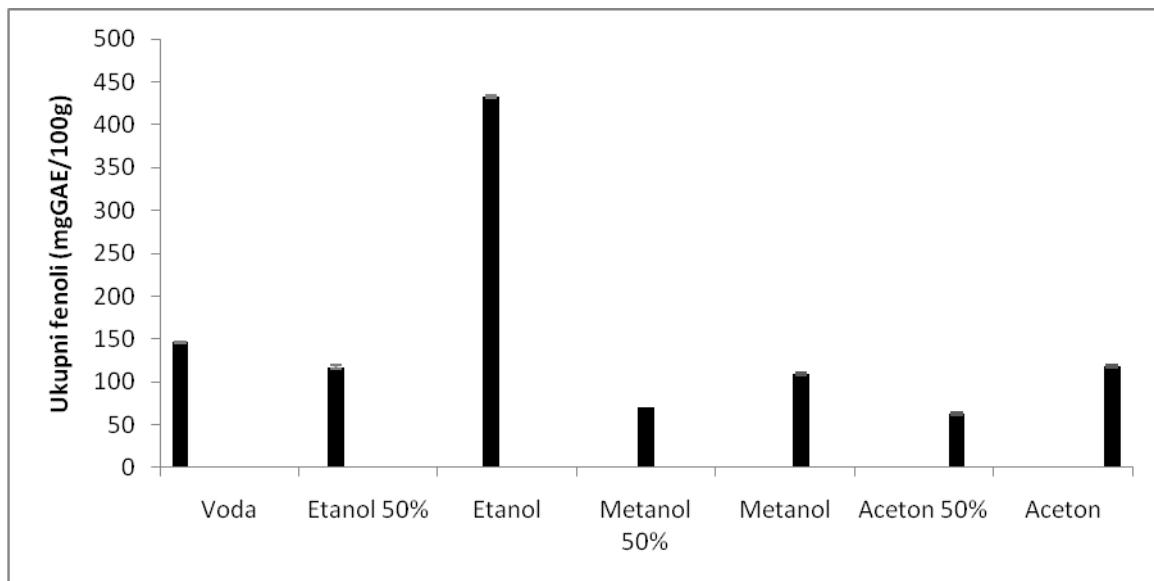
3.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda belog duda (*Morus alba L.*)

Za kvantitativno određivanje ukupnih fenola u ekstraktima ploda belog duda primenjena je Folinova metoda, a kao standard korišćena je galna kiselina (Singleton i Rossi, 1965). Na osnovu linearne zavisnosti između apsorbance rastvora i koncentracije ukupnih fenola određen je sadržaj ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima, a dobijeni rezultati, izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na 100 grama svežeg ploda, prikazani su u Tabeli 3.1.

*Tabela 3.1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda belog duda (*Morus alba L.*).*

BELI DUD						
Rastvarač	Ukupni fenoli (mgGAE/100g)	Flavonoidi (mgCE/100g)	DPPH (mgTE/100g)	RSC (%)	ABTS (mgTE/100g)	ABTS (%)
Voda	146,24±1,13	53,20±3,60	104,36±1,28	44,46±0,11	69,12±1,62	51,16±0,22
Etanol 50%	117,39±2,24	59,59±1,53	149,33±0,20	65,39±1,53	99,35±0,91	62,71±0,03
Etanol	432,48±1,16	103,09±2,48	167,14±1,89	72,82±0,07	139,01±0,01	83,22±1,00
Metanol 50%	70,86±0,11	29,00±0,50	33,86±0,87	76,73±0,16	140,05±1,53	70,94±0,11
Metanol	109,66±1,62	137,78±0,29	54,21±1,30	87,34±2,07	131,73±2,22	81,03±0,03
Aceton 50%	62,50±1,48	87,49±0,40	59,64±0,15	88,12±0,07	148,81±1,01	88,01±0,19
Aceton	118,58±1,51	100,83±0,18	65,60±2,45	83,00±0,50	157,66±0,24	85,23±0,05

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima belog duda prikazan je na Histogramu 3.1.



Histogram 3.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda belog duda.

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda belog duda se kreće od 62,50 mgGAE/100g u ekstraktu acetona 50% do 432,48 mgGAE/100g svežeg ploda u etanolnom ekstraktu. Ostali ekstrakti pokazali su približno iste količine polifenolnih jedinjenja. Dobijene vrednosti sadržaja ukupnih fenola su uporedive sa literaturnim podacima koji su prikazani u tabeli 3.2.

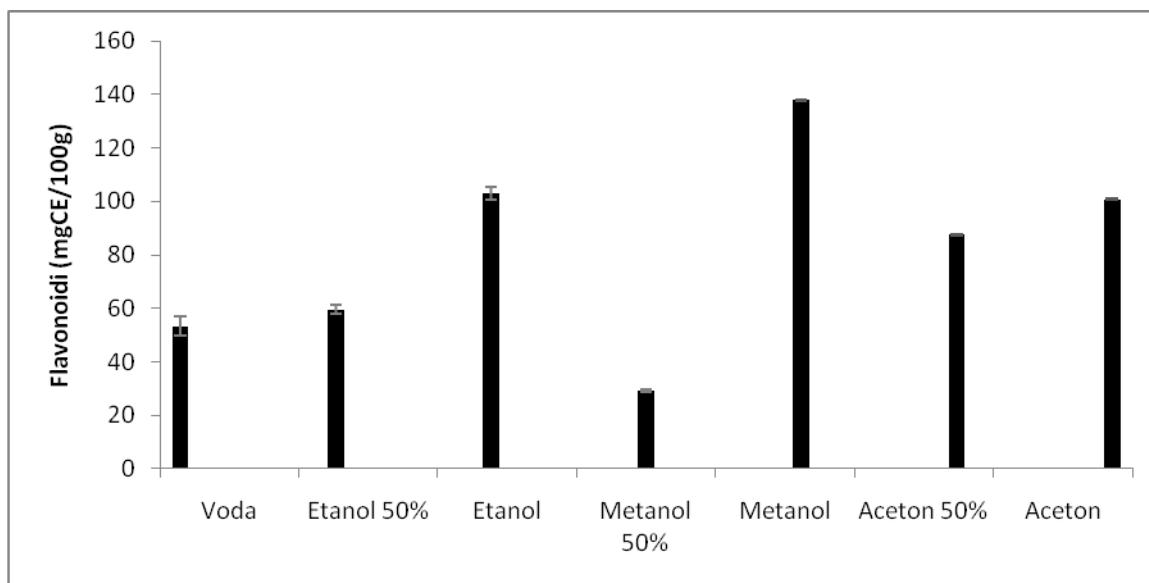
Tabela 3.2. Literaturni pregled sadržaja fenola u plodu belog duda.

Zemlja	Rastvarač	Sadržaj fenola (mgGAE/100 g)	Literatura
Koreja	Etanol	96-257	<i>Bae i Suh, 2007</i>
Turska	Metanol	181	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>
Pakistan	Metanol	775	<i>Memon, 2010</i>
Tajvan	Voćni Sok	1515	<i>Lin i Tang, 2007</i>

Na različit sadržaj fenolnih jedinjenja, pored polarnosti rastvarača, utiče i različit način ekstrakcije, zemljишte na kome je uzgajano drvo, način gajenja, geografski položaj, stepen zrelosti biljke, temperatura, svetlost, nadmorska visina (*Orhan i sar., 2007*). Autori iz Koreje (*Bae i Suh, 2007*) koristili su 70% etanol kao rastvarač. Ekstrakcija je vršena 4 sata na sobnoj temperaturi. Dobijeni rezultati su niži u odnosu na vrednosti koje su dobijene u ovom radu. Memon i

saradnici (*Memon, 2010*) dobili su veće vrednosti sadržaja fenola u metanolnom ekstraktu ploda belog duda. Ekstrakcija je vršena u ultrazvučnom kupatilu 10 minuta na sobnoj temperaturi. Od ploda belog duda sa Tajvana (*Lin i Tang, 2007*) napravljen je sok koji je centrifugiran 30 minuta na 10000 obrtaja/min. Sadržaj fenola bio je znatno veći u odnosu na naše vrednosti.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja flavonoida u različitim ekstraktima ploda belog duda, takođe je prikazan u tabeli 3.1.1. Sadžaj flavonoida izražen je kao ekvivalent katehina (CE). Najmanji sadžaj flavonoida pokazao je metanol 50% ekstrakt (29 mgCE/100g), dok je najveći sadžaj flavonoida bio u metanolnom ekstraktu (137,78 mgCE/100g). Sadržaj flavonoida prikazan je na Histogramu 3.2.



Histogram 3.2. Sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda belog duda.

Naši rezultati bili su znatno veći u odnosu sadržaj flavonoida u plodu belog duda iz Koreje koji je pokazao da u 70% etanolnom ekstraktu ima od 0,56 do 6,54 mgCE/100g (*Bae i Suh, 2007*).

Metanolni ekstrakt ploda duda sa područja Turske sadržao je 29 mgCE/100g ploda (*Ercisli i Orhan, 2007*), etanolno-vodeni rastvor ploda duda sa područja Vojvodine je sadržao 8,9 mgRE /100g (*Radojković i sar., 2010*). Voćni sok ploda belog duda sa područja Tajvana sadržao je 250,1 mgQE/100g (*Lin i Tang, 2007*).

Razlike u rezultatima su posledica samih karakteristika ploda, načina ekstrakcije, dužine njenog trajanja, vrste rastvarača i ekvivalenta u kojima je sadržaj flavonoida izražen. Literaturni pregled sadržaja flavonoida prikazan je u tabeli 3.3.

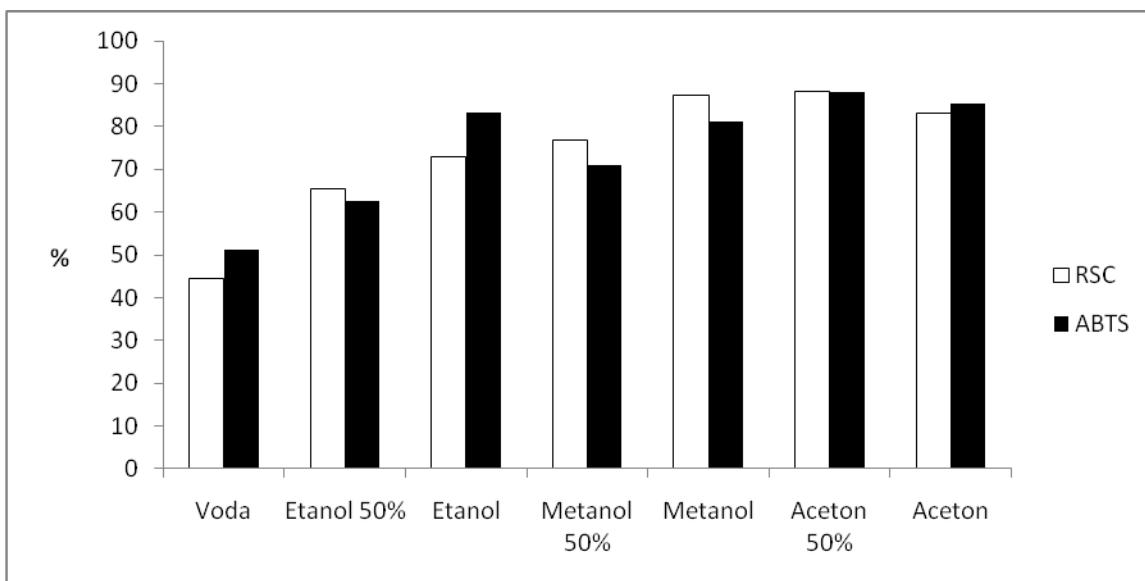
Tabela 3.3. Literaturni pregled sadržaja flavonoida u plodu belog duda.

Zemlja	Rastvarač	Sadržaj flavonoida	Literatura
Turska	Metanol	29 ^a	Ercisli i Orhan, 2007
Koreja	Etanol	0,56-65,4 ^b	Bae i Suh, 2007
Srbija	Etanol-voda	89 ^c	Radojković i sar., 2010
Tajvan	Voćni dok	250,1 ^a	Lin i Tang, 2007

^aizraženo kao mg kvercetin ekvivalenta na 100g svežeg ploda (mgQE/100g), ^bizraženo kao mg katehin ekvivalenta na 100g svežeg ploda (mgCE/100g), ^cizraženo kao mg rutin ekvivalenta na 100g svežeg ploda (mgRE/100g).

Ispitivanjam ekstrakata na sadžaj antocijana pH diferencijalnom metodom, utvrđeno je da ekstrakti ploda belog duda ne sadrže antocijane.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda belog duda korišćenjem DPPH i ABTS metode, prikazana je na Histogramu 3.3.



Histogram 3.3. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda belog duda primenom DPPH metode i ABTS testa.

Metoda na DPPH[·] radikale se primenjuje pri određivanje “skevindžer” kapaciteta. Antioksidansi reaguju sa stabilnim DPPH[·] radikalima i transformišu ih. Nivo dekolorizacije rastvora DPPH radikala ukazuje na “skevindžer” potencijal antioksidativnih jedinjenja. Ova metoda je primenjena za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata ploda duda. Kao referentni antioksidans u ovom testu korišćen je metanolni rastvor troloksa (TE). Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.1. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazali su aceton 50% i metanolni ekstrakt (88,12 i 87,34 %, respektivno) dok je najmanju antioksidativnu aktivnost pokazao voden ekstrakt ploda belog duda (44,46 %).

Koristeći ABTS test za određivanje antioksidativne aktivnosti, utvrđeno je da najveću antioksidativnu aktivnost ima aceton 50% ekstrakt (88,01%), zatim sledi acetonski ekstrakt (85,23%), dok je najmanju antioksidativnu aktivnost pokazao voden ekstrakt (51,16%). Ostali ekstrakti imaju približno jednake antioksidativne aktivnosti.

Autori sa područja Koreje (metanolni ekstrakt) (*Bae i Suh, 2007*) i Pakistana (etanolni ekstrakt) (*Memon i sar., 2010*) odredili su da je antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata veća od 90%.

Koeficijent korelacijske rezultata koji su dobijeni primenom DPPH i ABTS metode je veoma visok i iznosi 0.913. Takođe je urađen t-test. Dobijena je eksperimentalna vrednost $t_{exp.} = 0.798$, što je manje od t_{crit} koji za 5 merenja i stepen poverenja 95% ($p=0,05$) iznosi 2,776. To potvrđuje da su rezultati dobijeni primenom ovih metoda saglasni. A eksperimentalno dobijena vrednost za $F_{exp.} = 0,78$, što je manje od $F_{crit}=6,4$, za isti stepen povrjenja 95%, što potvrđuje saglasnost dobijenih rezultata.

U tabeli 3.4. date su vrednosti korelacionih koeficijenata i stepena korelacijske.

Tabela 3.4. Vrednosti korelacionih koeficijenata i stepen korelacije.

r-vrednosti	Stepen korelacije
0	Ne postoji linearne korelacija
-1	Negativna linearne korelacija
+1	Pozitivna linearne korelacija
0 do -0,3	Slabo negativna linearne korelacija
0 do 0,3	Slabo pozitivna linearne korelacija
0,3 do 0,7	Srednje pozitivna linearne korelacija
-0,3 do -0,7	Srednje negativna linearne korelacija
Veće od 0,7	Jako pozitivna linearne korelacija
Manje od -0,7	Jako negativna linearne korelacija

Analizirana je korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Rezultati su prikazani u Tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Koeficijenti korelacija fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima belog duda.

	Ukupni fenoli	Flavonoidi	RSC(%)
Ukupni fenoli	1	0,274	-0,19
Flavonoidi		1	-0,55
RSC(%)			1

Između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida postoji slabo pozitivna korelacija, dok između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti postoji slabo linearne negativna korelacija. Flavonoidi pokazuju srednje linearne negativnu korelaciju sa antioksidativnom aktivnošću ekstrakata.

3.1.2. HPLC analiza ekstrakata ploda belog duda

U odnosu na Folin-Ciocalteu metodu za određivanje fenolnih jedinjenja, HPLC metoda je bolja za njihovo kvalifikovanje i kvantifikovanje. HPLC metoda se temelji na merenju apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog zračenja pomoću UV detektora zato što polifenolna jedinjenja apsorbuju u ovoj oblasti. U ekstraktima ploda belog duda identifikovane su fenolne kiseline i flavonoidi. U tabelama 3.6. i 3.7. prikazana su jedinjenja koja su identifikovana u ekstraktima ploda belog duda.

Tabela 3.6. Identifikovane fenolne kiseline u ekstaktima ploda belog duda.

Fenolne kiseline (320 nm, mg/kg)	BELI DUD	
	Metanol	Aceton
Hlorogenska kiselina	7,36	-
Kafena kiselina	3,80	-
Neohlorogenska kiselina	25,21	22,99
Kriptohlorogenska kiselina	24,15	8,92

U metanolnom ekstraktu ploda belog duda identifikovane su i kvantifikovane 4 fenolne kiseline: hlorogenska, kafena kiselina, kriptohlorogenska i neohlorogenska kiselina. Neohlorogenska i kriptohlorogenska kiselina su prisutne u većim količinama u odnosu na preostale dve identifikovane kiseline. Ove dve kiseline su prisutne u acetonskom ekstraktu ploda belog duda.

Tabela 3.7. Identifikovani flavonoidi u ekstaktima ploda belog duda.

Flavonoidi (360 nm, mg/kg)	BELI DUD	
	Metanol	Aceton
Kvercetin-3-O-rutinozid	16,91	26,58
Kvercetin-3-O-glukozid	26,04	5,02
Kvercetin-3-O-ramnozid	-	24,91
Kempferol-3-O-rutinozid	8,12	5,13

HPLC analizom kvalifikovani su i kvantifikovani sledeći flavonoidi: kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, kempferol-3-*O*-rutinozid. Iz tabele 3.4. se vidi da metanolni ekstrakt belog duda ne sadrži kvercetin-3-*O*-ramnozid. U metanolnom ekstraktu ima najviše kvercetin-3-*O*-glukozida, a najmanje kempferol-3-*O*-rutinozida. Acetonski ekstrakt ploda belog duda sadrži najviše kvercetin-3-*O*-rutinozida, a najmanje kvercetin-3-*O*-glukozida. U metanolnom ekstraktu nije identifikovan kvercetin-3-*O*-ramnozid.

Thabti i sar. (2012) su izolovali iz ploda belog duda neohlorogensku, kriptohlorogensku i ferulnu kiselinu. Oni su pored toga identifikovali flavonoide: rutin, kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid i kempferol-7-*O*-glukozid, što se u velikoj meri slaže sa našim rezultatima.

HPLC analizom, kao ni Folin-Ciocalteu metodom nije potvrđeno prisustvo antocijana u ekstraktima ploda belog duda.

3.1.3. Određivanje sadržaja metala u plodu i ekstraktima ploda belog duda

U ovom radu ispitivan je sadržaj teških metala kao što su gvožđe, cink, bakar, mangan, nikal, olovo i kadmijum u plodu i ekstraktima ploda belog duda. Prisustvo svih metala je potvrđeno. Rezultati su prikazani u tabeli 3.8.

Tabela 3.8. Sadržaj teških metala u plodu i ekstraktima ploda belog duda.

BELI DUD							
Rastvarač	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Mn (mg/100g)	Cd (µg/100g)	Ni (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Pb (mg/100g)
Plod	23,06±1,02	0,86±0,05	2,32±0,31	2,45±0,23	0,36±0,01	2,23±0,17	0,09±0,01
Voda	0,32±0,01	0,08±0,02	0,28±0,02	-	0,10±0,01	0,73±0,05	-
Etanol 50%	0,15±0,14	0,04±0,02	0,27±0,01	-	0,05±0,01	0,59±0,04	-
Etanol	0,71±0,14	0,08±0,12	0,44±0,02	0,33±0,02	0,04±0,01	0,86±0,06	-
Aceton 50%	1,44±0,03	0,08±0,01	0,42±0,04	0,42±0,03	0,05±0,01	1,05±0,04	-
Aceton	5,38±0,15	0,26±0,07	0,59±0,04	0,25±0,02	0,03±0,01	1,63±0,20	-
Metanol 50%	0,35±0,08	0,04±0,02	0,15±0,01	-	0,14±0,03	0,91±0,10	-
Metanol	0,23±0,07	0,11±0,03	0,46±0,01	-	0,10±0,01	1,12±0,05	-

Plod belog duda sadrži najveću količinu gvožđa (23,06 mg/100g), dok je sadržaj kadmijuma bio najmanji (2,45 µg/100g). Sadržaj akumuliranog gvožđa u plodu duda je veći u odnosu na limit koji je predložio FAO/WHO u jestivim biljkama (2 mg/100g) (*FAO/WHO, 1989*). Sadržaj metala u plodu belog duda raste po sledećem redosledu: gvožđe > mangan > cink > bakar > nikal > olovo > kadmijum.

Plod belog duda iz Turske sadrži znatno manju količinu gvožđa (4,2 mg/100g) u odnosu na naše rezultate. Sadržaj bakra, mangana i cinika je približno jednak vrednostima koje sadži plod belog duda iz jugoistočne Srbije (0,5, 3,8 i 2,8 mg/100g, respektivno) (*Ercisli i Orhan, 2007*). Autori iz Pakistana publikovali su veće vrednosti o sadržaju gvožđa, cinka i nikla (73, 50,2, 2,2 mg/100g, respektivno) (*Imran i sar., 2011*).

Najveći sadržaj gvožđa pokazao je acetonski ekstrakt ploda belog duda (5,38 mg/100g), dok je najmanji sadržaj gvožđa bio u etanol 50% ekstraktu (0,15 mg/100g). Sadržaj bakra kretao se od 0,04 u metanol 50% i etanol 50% ekstraktu do 0,26 mg/100g u acetonskom ekstraktu. Metanol 50% ekstrakt pokazao je najmanji sadržaj mangana (0,15 mg/100g) dok je najveći sadržaj mangana pokazao acetonski ekstrakt (0,59 mg/100g). Prisustvo kadmijuma potvrđeno je samo u tri ekstrakta: aceton 50% (0,42 µg/100g), aceton (0,25 µg/100g) i etanol (0,33 µg/100g). Ostali ekstrakti ne sadrže kadmijum. Sadržaj nikla se kreće od 0,03 do 0,14 µg/100g u acetonskom i metanol 50% ekstraktu, respektivno. Acetonski ekstrakt ploda belog duda pokazao je najveći sadržaj cinka (1,63 mg/100g), dok je najmanji sadržaj cinka bio u etanol 50% ekstraktu (0,59 mg/100g). Sadržaj olova nije potvrđen ni u jednom ekstraktu.

Određivan je koeficijent ekstrakcije na osnovu jednačine koja je opisana u eksperimentlnom delu. Koeficijenti ekstrakcije prikazani su u tabeli 3.9.

Tabela 3.9. Koeficijenti ekstrakcije u ekstraktima ploda belog duda.

Rastvarač	Fe	Cu	Mn	Cd	Ni	Zn
EC (%)						
Voda	1,38	9,30	12,02	-	27,78	32,74
Etanol 50%	0,65	4,65	11,59	-	13,89	26,46
Etanol	3,08	9,30	18,88	13,41	11,11	38,57
Aceton 50%	6,24	9,30	18,03	17,07	13,89	47,09
Aceton	23,33	30,23	25,32	10,16	8,33	73,09
Metanol 50%	1,52	4,65	6,44	-	38,89	40,81
Metanol	1,00	12,80	19,74	-	27,78	50,22

Na osnovu koeficijenata ekstrakcije analiziranih elemenata, elementi se mogu klasifikovati u tri grupe: elementi sa niskim koeficijentom ekstrakcije (manje od 10%), elementi sa srednjim koeficijentom ekstrakcije (10%-30%) i elementi sa visokim koeficijentom ekstrakcije (više od 30%).

Koeficijent ekstrakcije u ekstraktima ploda belog duda se kreće od 0,65% u etanol 50% ekstraktu za ekstrakciju gvožđa do 73,09% u acetonskom ekstraktu za ekstrakciju cinka.

Gvožđe i bakar imaju niske koeficijente ekstrakcije u svim rastvaračima, osim u acetonu. Mangan, kadmijum i nikal imaju srednje koeficijente ekstrakcije, a Zn ima visoke koeficijente ekstrakcije u svim rastvaračima. Koeficijent ekstrakcije uglavnom zavisi od rastvarača u kome je vršena ekstrakcija. Aceton i aceton 50% kao rastvarači pokazuje najveću efikasnost ekstrakcije metala iz ploda duda.

3.1.4. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda belog duda

U tabeli 3.10. prikazani su rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata ploda belog duda.

Tabela 3.10. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda belog duda (*Morus alba L.*).

Test mikroorganizmi	Voda		Metanol 50%		Metanol		DMSO		Tetraciklin
	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	30µg
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	15 mm	-	16 mm	12 mm	17 mm	-	-	28 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-	-	-	-	-	-	19 mm
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	11 mm	16 mm	-	-	36 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	16 mm	-	-	12 mm	17 mm	-	-	34 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	14 mm	-	-	30 mm

Kontrolna proba (DMSO) nije imala inhibitorni efekat na bilo koji testiranu bakteriju. Za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata korišćena je disk-difuziona metoda, prema (NCCLS, 1997). Tetraciklin je korišćen kao pozitivni referentni standard za određivanje osetljivosti sojeva svake ispitivane vrste mikroorganizma. Antimikrobna aktivnost je ocenjena merenjem zone inhibicije za ispitivane mikroorganizme.

Rezultati mikrobioloških ispitivanja pokazuju da metanolni ekstrakt belog duda pokazuje antibakterijsko dejstvo na sve ispitivane bakterije sa izuzetkom bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Vodeni ekstrakt belog duda pokazuje antibakterijsko dejstvo na *Staphylococcus aureus* i *S. typhimurium*, dok metanol 50% ekstrakt pokazuje antibakterijsku aktivnost na *S. typhimurium*.

3.2. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA PLODA CRVENOG DUDA (*Morus rubra L.*)

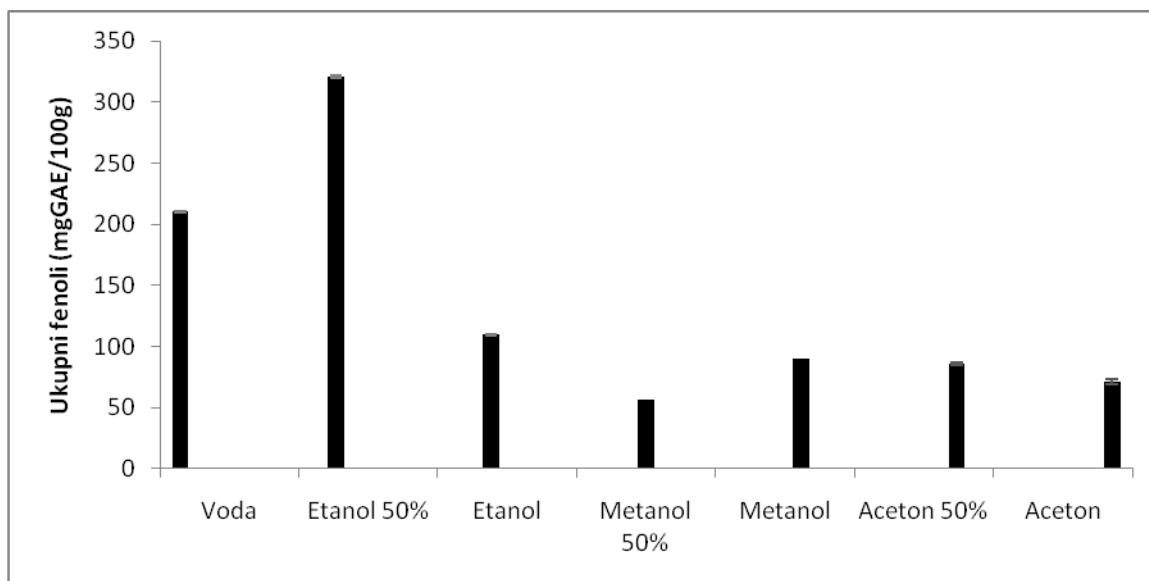
3.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*)

Rezultati određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida, antocijana i antioksidativne aktivnosti u različitim ekstraktima ploda crvenog duda su u tabeli 3.11.

Tabela 3.11. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*).

Rastvarač	Ukupni fenoli (mgGAE/100g)	Favonoidi (mgCE/100g)	Monomerni antocijani (mgCy-3-O-Glu/100g)	DPPH (mgTE/100g)	RSC (%)	ABTS (mgTE/100g)	ABTS (%)
Voda	210,39±0,46	192,07±1,51	2,59±0,17	118,22±1,36	54,11±0,09	84,53±0,91	59,01±0,01
Etanol 50%	320,78±0,77	99,83±0,09	5,34±0,10	183,39±1,13	78,45±0,69	122,27±0,11	74,42±0,46
Etanol	109,75±0,39	112,43±0,06	-	175,40±3,30	79,60±0,36	139,61±1,04	84,72±0,79
Metanol 50%	56,40±0,05	38,39±1,48	-	43,70±0,44	85,64±2,44	147,62±0,11	79,24±0,09
Metanol	90,26±0,21	142,70±2,04	-	55,42±0,60	87,56±0,03	139,98±0,27	82,72±0,06
Aceton 50%	85,91±0,69	49,77±0,14	1,70±0,31	60,00±0,00	89,41±0,35	157,06±0,01	88,68±0,06
Aceton	71,40±2,39	44,95±0,67	5,28±0,62	62,21±0,11	86,80±0,09	160,70±0,32	89,69±0,03

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda crvenog duda prikazan je na Histogramu 3.4.

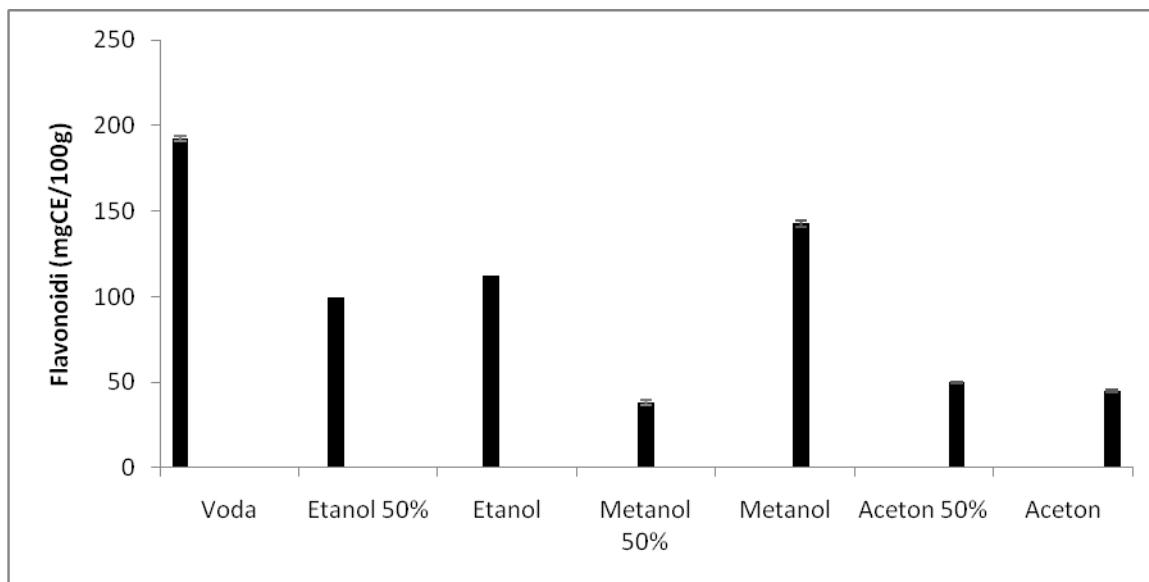


Histogram 3.4. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*)

Rezultati ispitivanja pokazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenola prisutan u etanol 50% ekstraktu ploda crvenog duda (320,78 mgGAE/100g) dok je najmanji sadržaj ukupnih fenola bio u metanol 50% ekstraktu (56,40 mgGAE/100g).

Upoređujući rezultate o sadržaju ukupnih fenola u plodu crvenog duda iz Jugoistočne Srbije sa rezultatima koje su publikovali autori iz drugih zemalja, zaključili smo da su naši rezultati niži u odnosu na njihove. Metanolni ekstrakt ploda crvenog duda iz Turske sadrži 1035 mgGAE/100g (*Ercisli i Orhan, 2007*), dok je etanolni ekstrakt sadržao 169 mgGAE/100g (*Ercisli, 2010*). Ekstrakt acetona 50% pokazao je nešto više vrednosti sadržaja fenola u odnosu na naše rezultate (160 mgGAE/100g) (*Ozgen, 2009*). Razlike koje postoje u sadržaju ukupnih fenola, najverovatnije su posledica različitog načina ekstrakcije, klimatskog područja na kojem drvo raste i tipa zemljišta na kome se uzgaja drvo.

Sadržaj flavonoida u plodu crvenog duda prikazan je na Histogramu 3.5.

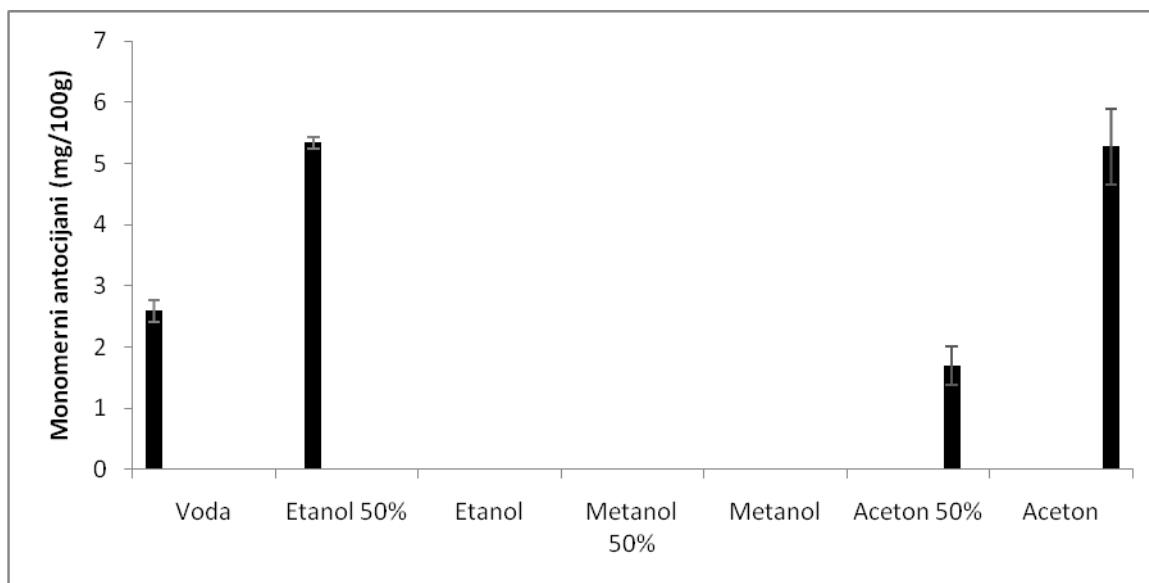


*Histogram 3.5. Sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*)*

Sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda crvenog duda kreće se od 38,39 do 192,07 mgCE/100g u metanol 50% i vodenom ekstraktu, respektivno.

S obzirom da je plod crvenog duda obojen, za razliku od belog duda, sadrži male količine antocijana. Za određivanje sadržaja monomernih antocijana primenjena je pH-diferencijalna metoda (*Guisti i Wrolstad, 2001*). Rezultati su izraženi u mg cijanidin-3-*O*-glukozida kao

ekvivalenta na 100 g svežeg uzorka. Sadržaj antocijana u ekstraktima ploda crvenog duda prikazan je na Histogramu 3.6.

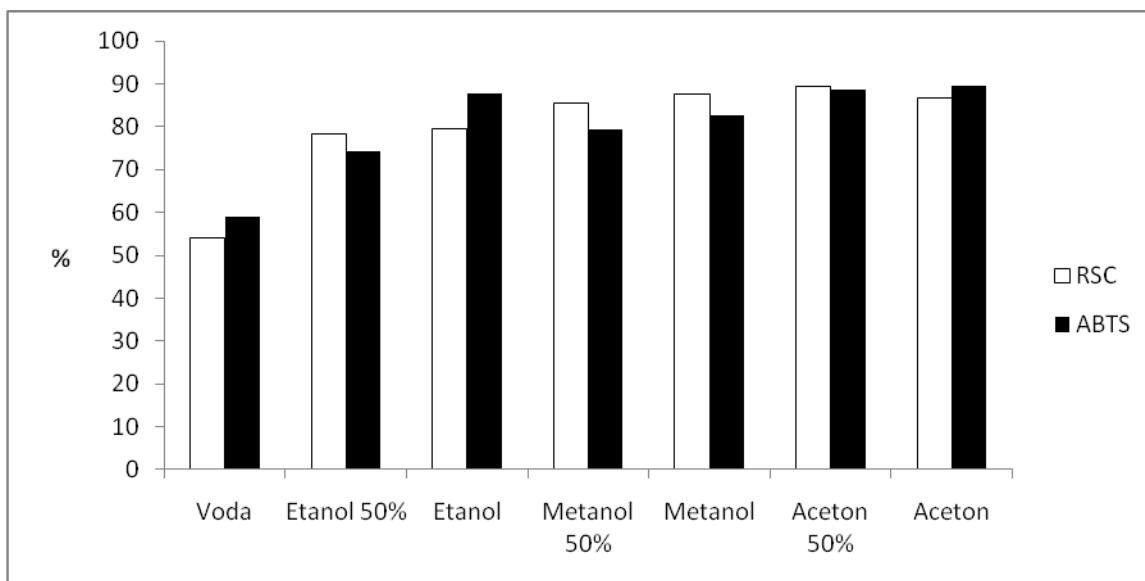


*Histogram 3.6. Sadržaj monomernih antocijana u ekstraktima ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*)*

Sa histograma 3.6. se vidi da u etanolnom, metanol 50% i metanolnom ekstraktu nije zabeleženo prisustvo antocijana. Etanol 50% i acetonski ekstrakt imaju približno jednaku količinu antocijana (5,34 i 5,28 mgCy-3-O-Glu/100g, respektivno). Voden ekstrakt sadrži 2,59 dok aceton 50% ekstrakt sadrži 1,70 mg cijanidin-3-glukozida na 100 g svežeg ploda. Aceton 50% ekstrakt ploda crvenog duda iz Turske sadrži 9,88 mgCy-3-O-Glu/100g (Ozgen, 2009). Za razliku od etanolnog ekstrakta iz ovog rada koji nije pokazao sadržaj antocijana, etanolni ekstrakt ploda crvenog duda iz Turske sadrži 10,9 mg mgCy-3-O-Glu/100g (Ercisli, 2010).

Antioksidativna aktivnost primenom DPPH i ABTS metode izražena je u procentima i u mg troloks ekvivalenta na 100 g svežeg ploda (mgTE/100g).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda primenom DPPH i ABTS metode prikazana je na Histogramu 3.7



*Histogram 3.7. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*) primenom DPPH i ABTS metode.*

Antioksidativna aktivnost, primenom DPPH metode, je relativno visoka i kreće se od 54,11% u vodenom ekstraktu do 89,41% u aceton 50% ekstraktu ploda crvenog duda.

Etanolni ekstrakt crvenog duda iz Turske, pored sadržaja ukupnih fenola, pokazao je i veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na naše rezultate (442 mgTE/100g) (Ercisli, 2010).

Primenom ABTS metode za određivanje antioksidativne aktivnosti, ekstrakti ploda crvenog duda pokazali su približno jednake antioksidativne aktivnosti, kao i primenom DPPH metode, koja se kreće od 59,01% u vodenom ekstraktu do 89,69% u acetonskom ekstraktu.

Koeficijent korelacije rezultata koji su dobijeni primenom DPPH i ABTS metode je veoma visok i iznosi 0.92. Takođe je uradjen t-test. Dobijena je eksperimentalna vrednost $t_{exp} = 0.816$, što je manje od t_{crit} koji za 7 merenja i stepen poverenja 95% ($p=0,05$) iznosi 2,45. To potvrđuje da su rezulati dobijeni primenom ovih metoda saglasni. A eksperimentalno dobijena vrednost za $F_{exp} = 0,34$, što je manje od $F_{crit}=4,3$, za isti stepen poverenja 95%, što potvrđuje saglasnost dobijenih rezultata.

Analizirana je korelacija sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Rezultati korelace analize prikazani su u tabeli 3.12.

Tabela 3.12. Koeficijenti korelacije fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima crvenog duda.

	Ukupni fenoli	Flavonoidi	RSC(%)
Ukupni fenoli	1	+0,47	-0,56
Flavonoidi		1	-0,774
RSC(%)			1

Uzajamna korelacija ukupnih fenola i flavonoida je +0,47, što je srednje pozitivno linearna korelacija. Korelacija ukupnih fenola sa antioksidativnom aktivnjivošću iznosi -0,56, što je srednje negativno linearna korelacija. Korelacija flavonoida i antioksidativne aktivnosti je -0,774 - visoko negativna linearna korelacija. Sadžaj ukupnih fenola, flavonoida i antokisidativne aktivnosti u plodu crvenog duda pokazao je veći stepen korelacije u odnosu na beli dud.

3.2.2. HPLC analiza ekstrakata ploda crvenog duda

U tabelama 3.13. i 3.14. prikazane su fenolne kiseline i flavonoidi koji su identifikovani u metanolnom i acetonskom ekstraktu ploda crvenog duda.

Tabela 3.13. Identifikovane fenolne kiseline u ekstraktima ploda crvenog duda.

Fenolne kiseline (320 nm, mg/kg)	CRVENI DUD	
	Metanol	Aceton
Hlorogenska kiselina	9,22	-
Kafena kiselina	3,87	-
Neohlorogenska kiselina	6,76	15,18
Kriptohlorogenska kiselina	-	8,57

HPLC analizom je utvrđeno da metanolni ekstrakt sadrži najveću količinu hlorogenske kiseline, a najmanju količinu kafene kiseline. Kriptohlorogenska kiselina nije prisutna u metanolnom ekstraktu ploda crvenog duda. Acetonski ekstrakt ploda crvenog duda sadrži dve kiseline: neohlorogensku i kriptohlorogensku.

Tabela 3.14. Identifikovani flavonoidi u ekstraktima ploda crvenog duda.

Antocijani (520 nm, mg/kg)	CRVENI DUD	
	Metanol	Aceton
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	12,59	13,94
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	6,10	5,78
Kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid	-	22,85
Kempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	18,52	-

Metanolni ekstrakt ploda crvenog duda sadrži sledeće flavonoide: kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid i kempferol-3-*O*-rutinozid. Od ova tri flavonoida najviše ima kempferol-3-*O*-rutinozida a najmanje kvercetin-3-*O*-glukozida. Acetonski ekstrakt ne sadrži samo kempferol-3-*O*-rutinozid. Zabeležene su najveće količine kvercetin-3-*O*-ramnozida, a najmanje kvercetin-3-*O*-glukozida.

HPLC analizom ekstrakata ploda crvenog duda na sadržaj antocijana utvrđeno je da metanolni ekstrakt ploda crvenog duda sadrži cijanidin-3-*O*-glukozid (11,17 mg/kg).

Thabti i sar. (2012) su izolovali iz ploda crvenog duda neohlorogensku i, kriptohlorogensku i kafenu kiselinu. Oni su pored toga identifikovali flavonoide : kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid i kempferol-7-*O*-glukozid, što se u velikoj meri slaže sa našim rezultatima. Više autora je u ekstraktima ploda crvenog duda identifikovala cijanidin-3-*O*-glukozid.

3.2.3. Određivanje sadržaja metala u plodu i ekstraktima ploda crvenog duda

Sadržaj teških metala kao što su *gvožđe, cink, bakar, mangan, nikal, olovo i kadmijum* u plodu i ekstraktima ploda crvenog duda prikazan je u tabeli 3.15.

Tabela 3.15. Sadržaj teških metala u plodu i ekstraktima ploda crvenog duda.

CRVENI DUD							
Rastvarač	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Mn (mg/100g)	Cd (µg/100g)	Ni (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Pb (mg/100g)
Plod	57,38±5,89	1,51±0,16	1,98±0,20	1,84±0,18	0,37±0,03	5,04±0,08	0,20±0,02
Voda	1,05±0,24	0,01±0,00	0,09±0,01	-	0,05±0,01	0,43±0,03	-
Etanol 50%	0,70±0,01	0,02±0,00	0,15±0,01	-	0,04±0,00	0,43±0,03	-
Etanol	0,32±0,04	0,01±0,00	0,18±0,01	-	0,02±0,00	0,57±0,02	-
Aceton 50%	5,85±0,16	0,05±0,01	0,39±0,02	0,29±0,04	0,06±0,01	0,55±0,03	-
Aceton	5,69±0,36	0,28±0,01	0,59±0,07	0,27±0,06	0,05±0,01	1,04±0,02	-
Metanol 50%	0,31±0,04	0,09±0,01	0,09±0,01	-	0,04±0,00	0,08±0,01	-
Metanol	0,32±0,08	0,11±0,01	0,25±0,03	-	0,02±0,00	0,12±0,01	-

Iz tabele 3.15. može se videti da plod crvenog duda sadrži najveću količinu gvožđa (57,38 mg/100g) i najmanju količinu kadmijuma (1,84 µg/100g). Sadržaj teških metala u plodu crvenog duda opada u sledećem nizu: gvožđe>cink>mangan>bakar>nikal>olovo>kadmijum.

Ercisli (*Ercisli, 2010*) publikovao je znatno manji sadržaj gvožđa u plodu crvenog duda (5,00 mg/100g). Sadržaj mangana bio je 5,00 mg/100g što je više u odnosu na naše rezultate (1,98 mg/100g). Količina cinka koja je potvrđena u plodu crvenog duda bila je 3,00 mg/100g (*Ercisli, 2010*) što je nešto manje u odnosu na naše rezultate. Autori iz Turske publikovali su veće vrednosti gvožđa, cinka i bakra u plodu crvenog duda (4,5, 3,2 i 0,4 mg/100g , respektivno) (*Ercisli i Orhan, 2007*). Količina mangana bila je nešto viša u odnosu na naše vrednosti (4,00 mg/100g).

Količina gvožđa u ekstraktima se kreće od 0,31 do 5,85 mg/100g u metanol 50% i aceton 50% ekstraktu, respektivno. Vodeni i etanolni ekstrakt ploda crvenog duda sadže najmanju količinu bakra (0,01 mg/100g) dok acetonski ekstrakt sadrži 0,28 mg/100g. Sadržaj mangana se kreće od 0,09 u metanol 50% ekstraktu do 0,59 mg/100g u acetonskom ekstraktu. Prisustvo mangana detektovano je samo u acetonskom i aceton 50% ekstraktu (0,27 i 0,29 µg/100g,

respektivno). Količina nikla u ekstraktima ploda crvenog duda se kreće od 0,02 u metanolnom i etanolnom ekstraktu do 0,06 mg/100g u aceton 50% ekstraktu. Metanol 50% ekstrakt sadrži najjamnju količinu cinka (0,08 mg/100g) dok je acetonski ekstrakt pokazao najveću količinu cinka (1,04 mg/100g). Sadržaj olova nije detektovan ni u jednom ekstraktu sem u plodu (0,20 mg/100g).

Koeficijenti ekstrakcije prikazani su u tabeli 3.16.

Tabela 3.16. Koeficijenti ekstrakcije u ekstraktima ploda crvenog duda.

Rastvarač	Fe	Cu	Mn	Cd	Ni	Zn
Voda	1,83	0,66	4,55	-	13,51	8,53
Etanol 50%	1,22	1,32	7,58	-	10,81	8,53
Etanol	0,56	0,66	9,09	-	5,41	11,31
Aceton 50%	10,20	3,31	19,70	15,76	16,22	10,91
Aceton	9,92	18,54	29,80	14,67	13,51	20,63
Metanol 50%	0,54	5,96	4,55	-	10,81	1,59
Metanol	0,56	7,28	12,63	-	5,41	2,38

Koeficijent ekstrakcije u ekstraktima ploda crvenog duda se kreće od 0,54 % u metanol 50% za ekstrakciju gvožđa do 29,80% u acetonskom ekstraktu za ekstrakciju mangana. Acetonski ekstrakt i ekstrakt acetona 50% ima najveće koeficijente ekstrakcije skoro za sve ispitivane metale. Nikal, cink i mangan imaju znatno veće koeficijente ekstrakcije od gvožđa i bakra u skoro svim sistemima rastvarača.

3.2.4. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda

Korišćenjem disk-difuzione metode za određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata merena je zone inhibicije za ispitivane mikroorganizme.

Rezultati mikrobioloških ispitivanja pokazuju da metanol 50% ekstrakt crvenog duda pokazuje antibakterijsko dejstvo samo na bakteriju *S. typhimurium*. Metanolni ekstrakt crvenog duda pokazuje antibakterijsko dejstvo na sve ispitivane bakterije sem na bakteriju *Staphylococcus aureus*. Vodeni ekstrakti ploda crvenog duda pri datim koncentracijama nisu pokazali antimikrobno delovanje.

U tabeli 3.17. data je antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda.

Tabela 3.17. Antimikrobnna aktivnost ekstrakata ploda crvenog duda (*Morus rubra L.*)

Test mikroorganizmi	Voda		Metanol		Metanol 50%		DMSO	Tetraciklin
	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	50 µl	30µg
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	16 mm	16 mm	-	-	28 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	12 mm	16 mm	-	-	-	19 mm
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	17 mm	-	-	-	36 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-	-	-	34 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	12 mm	16 mm	-	-	-	30 mm

3.3. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA PLODA CRNOG DUDA (*Morus nigra L.*)

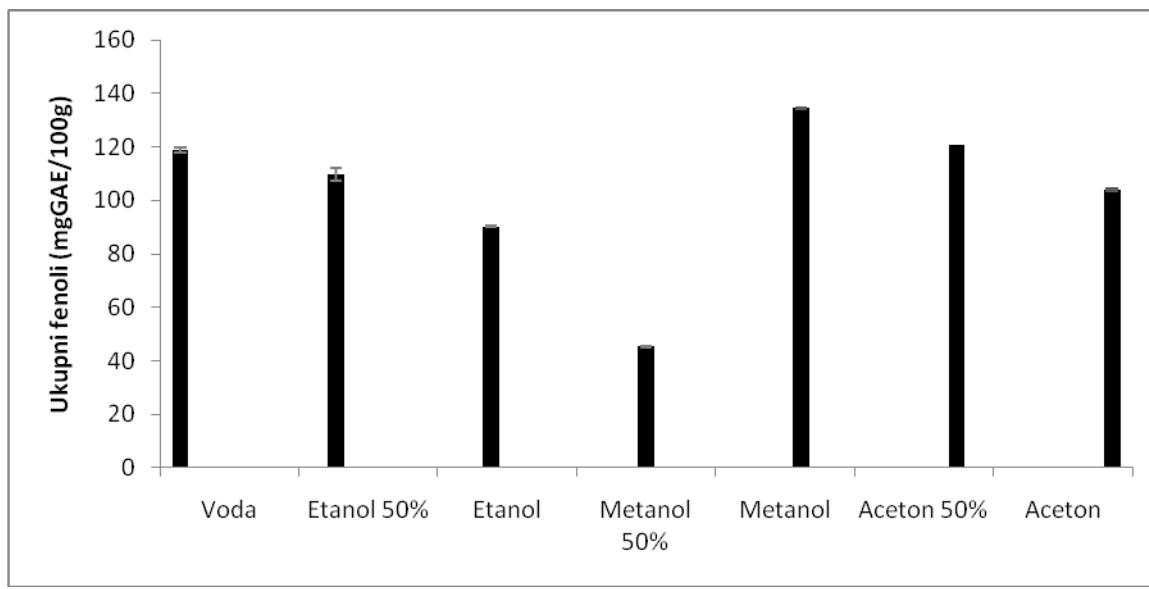
3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda crnog duda (*Morus nigra L.*)

U tabeli 3.18. prikazan je ukupni sadržaj fenola, flavonoida, antocijana i antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda.

Tabela 3.18. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda (*Morus nigra L.*).

Rastvarač	Ukupni fenoli (mgGAE/100g)	Flavonoidi (mgCE/100g)	Monomerni antocijani (mgCy-3-O-Glu/100g)	DPPH (mgTE/100g)	RSC (%)	ABTS (mgTE/100g)	ABTS (%)
Voda	118,84±0,77	141,70±5,66	114,83±2,25	197,50±10,06	52,05±3,08	156,35±10,58	55,43±4,51
Etanol 50%	109,80±2,25	144,90±6,99	128,68±1,20	283,10±2,95	71,41±1,45	169,43±7,00	64,80±0,56
Etanol	90,26±0,42	183,90±2,01	125,68±2,77	168,71±0,63	40,55±0,95	127,80±0,10	44,93±0,62
Metanol 50%	45,45±0,23	112,07±1,05	44,34±1,02	42,82±1,01	57,80±4,04	158,08±3,81	51,30±0,95
Metanol	134,42±0,19	210,77±0,06	87,18±0,98	55,98±0,34	47,85±0,94	141,37±2,70	43,32±0,46
Aceton 50%	120,78±0,21	191,91±0,93	84,31±0,67	55,53±0,42	50,82±0,28	150,60±0,47	49,35±1,92
Aceton	103,90±0,41	157,10±0,98	74,72±1,05	62,99±0,96	57,75±1,05	167,18±0,31	59,55±1,00

Sadržaj ukupnih fenola u različitim ekstraktima ploda crnog duda prikazan je na Histogramu 3.8.



Histogram 3.8. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ploda crnog duda (*Morus nigra L.*)

Najmanji sadržaj ukupnih fenola u plodu crnog duda ima methanol 50% ekstrakt (45,45 mgGAE/100g). U ostalim ekstraktima sadržaj fenola je približno jednak, dok je najviši u metanolnom ekstraktu (134,42 mgGAE/100g).

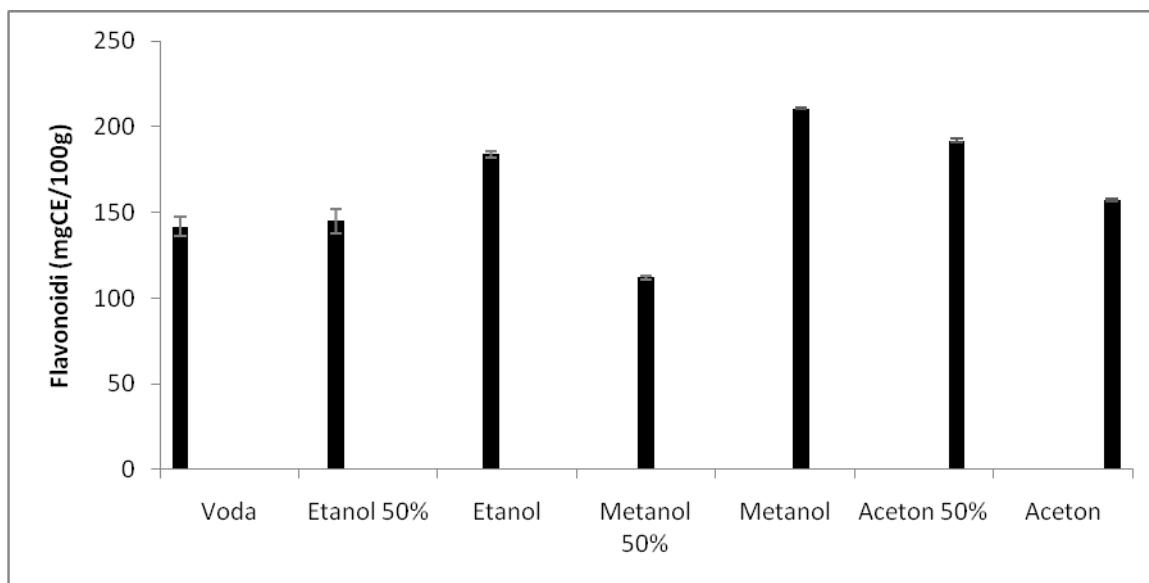
Literaturni podaci o sadržaju fenola u plodu crnog duda prikazani su u tabeli 3.19.

Tabela 3.19. Literaturni pregled sadržaja fenola u plodu crnog duda.

Zemlja	Rastvarač	Sadržaj fenola (mgGAE/100g)	Literatura
Turska	Metanol	1422	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>
Pakistan	Metanol	661	<i>Memon i sar., 2010</i>
Turska	Metanol	1943-2237	<i>Ercisli i Orhan, 2008</i>
Turska	Metanol	450	<i>Kutlu i sar., 2011</i>
Turska	Etanol	215	<i>Ercisli, 2010</i>
Koreja	Etanol	867	<i>Chun i sar., 2011</i>
Turska	Voda	330	<i>Kutlu i sar., 2011</i>
Turska	Metanol 50%	580	<i>Kutlu i sar., 2011</i>
Brazil	Metanol 50%	373	<i>Hassimotto i sar., 2007</i>
Turska	Aceton 50%	273	<i>Ozgen, 2009</i>

Iz tabele 3.19. vidi se da je sadržaj fenola u ekstraktima ploda crnog duda sa drugih područja veći u odnosu na naše rezultate. Na osnovu literaturnih podataka najveći sadržaj fenola ima metanolni ekstrakt ploda crnog duda koji je pravljen u Soxlet aparatu, 6 sati na 60°C i kreće se do 2237 mgGAE/100g (*Ercisli i Orhan, 2008*).

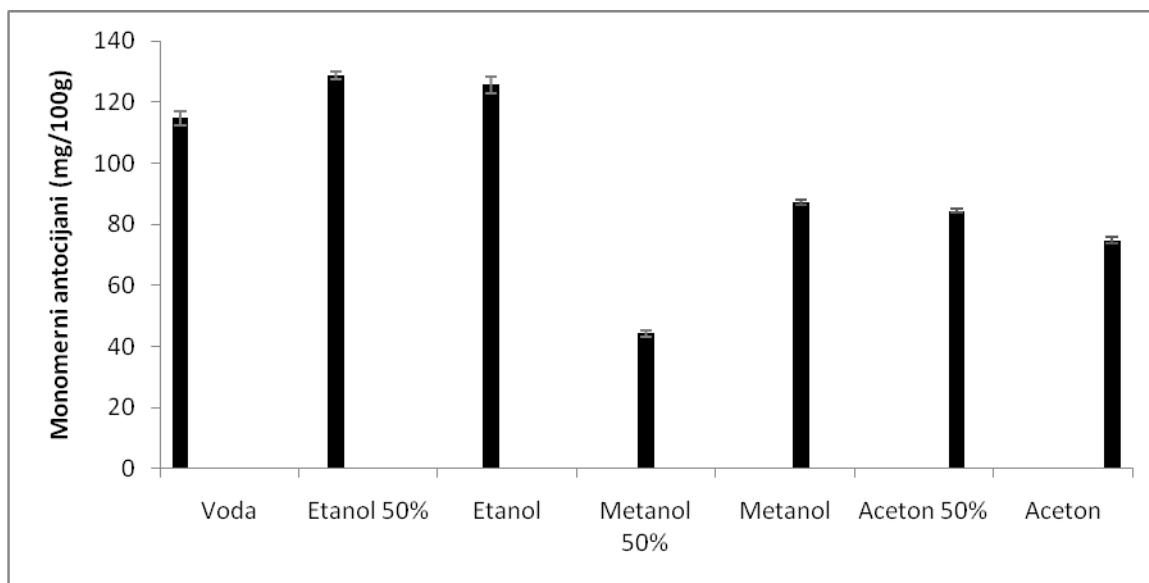
Sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda crnog duda prikazan je na Histogramu 3.9.



Histogram 3.9. Sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda crnog duda (*Morus nigra L.*).

Sa Histograma 3.9. može se videti da je sadržaj flavonoida u svim ekstraktima visok. Najveći sadržaj flavonoida pokazuje metanolni ekstrakt (210,77 mgCE/100g).

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja monomernih antocijana prikazana je na Histogramu 3.10..



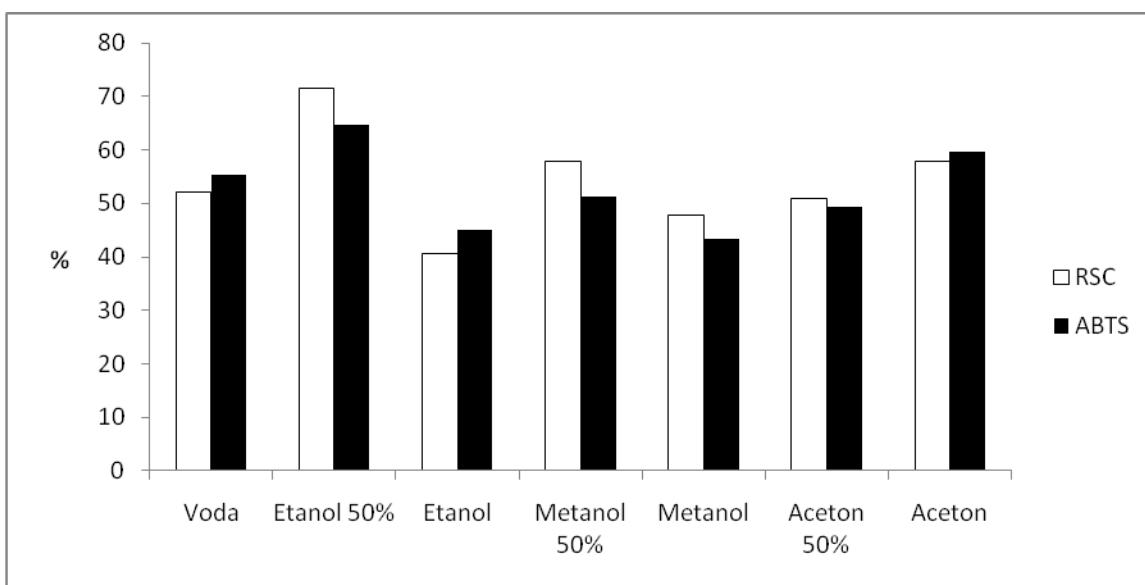
Histogram 3.10. Sadržaj antocijana u ekstraktima ploda crnog duda (*Morus nigra L.*).

S obzirom na boju ploda crnog duda u odnosu na plod belog i crvenog duda, očekivan je veliki sadržaj antocijana od kojih potiče boja ploda. Visok sadržaj antocijana pokazali su vodenii,

etanol 50% i etanolni ekstrakt. Najviši sadržaj je u etanol 50% ekstraktu (128,68 mgCy-3-O-Glu/100g), dok je najniži sadržaj antocijana pokazao metanol 50% ekstrakt (44,34 mgCy-3-O-Glu/100g).

Etanolni ekstrakt ploda crnog duda iz Turske pokazao je niže vrednosti u odnosu na naše rezultate (71,9 mgCy-3-O-Glu/100g) (Ercisli, 2010). Aceton 50% ekstrakt crnog duda iz literature sadrži 57,13 mgCy-3-O-Glu/100g (Ozgen, 2009) što je niže u odnosu na vrednosti dobijene u ovom radu (84,31 mgCy-3-O-Glu/100g).

Na Histogramu 3.11. prikazana je antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda primenom DPPH i ABTS metode.



*Histogram 3.11. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda (*Morus nigra L.*) primenom DPPH i ABTS metode.*

Antioksidativna aktivnost, primenom DPPH metode, se kreće od 40,55% u etanolnom ekstraktu do 71,41% (283,10 mgTE/100g) u etanol 50% ekstraktu. Etanolni ekstrakt ploda crnog duda iz Turske pokazao je znatno veću antioksidativnu aktivnost od naših rezultata (748 mgTE/100g) (Ercisli, 2010).

Primenom ABTS testa, antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda je približno jednaka i rezultatima koji su dobijeni DPPH metodom i kreće se od 44,93% u etanolu do 64,80% u etanolu 50%.

Koeficijent korelacijske rezultata koji su dobijeni primenom DPPH i ABTS metode je veoma visok i iznosi 0,88. Takođe je uradjen t-test. Dobijena je eksperimentalna vrednost $t_{\text{exp}} = 0,46$, što je manje od t_{crit} koji za 7 merenja i stepen poverenja 95% ($p=0,05$) iznosi 2,45. To potvrđuje da su rezulati dobijeni primenom ovih metoda saglasni. A eksperimentalno dobijena vrednost za $F_{\text{exp}} = 0,604$, što je manje od $F_{\text{crit}}=4,3$, za isti stepen povrjenja 95%, što potvrđuje saglasnost dobijenih rezultata.

Rezultati analize korelacije fenola, flavonoida i antocijana i antioksidativne aktivnosti (RSC) prikazana je u Tabeli 3.20.

Tabela 3.20. Koeficijenti korelacija fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima crnog duda.

	Ukupni fenoli	Flavonoidi	Antocijani	RSC(%)
Ukupni fenoli	1	0,71	0,49	-0,12
Flavonoidi		1	0,286	-0,583
Antocijani			1	-0,03
RSC(%)				1

Na osnovu rezultata iz tabele 3.20. može se videti da je korelacija fenola i antocijana i antioksidativne aktivnosti srednje pozitivno linearne. Dok je uzajamna korelacija sadržaja ukupnih fenola i flavonoida tako pozitivno linearna. Korelacija sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti je srednje negativno linearana. Antocijani i ukupni fenoli imaju slabo linearnu korelaciju sa antioksidativom aktivnošću.

3.3.2. HPLC analiza ekstrakata ploda crnog duda

HPLC analizom ekstrakata crnog duda kvalitativno i kvantitativno su određene: fenolne kiseline, flavonoidi i antocijani. Hromatogrami acetonskog ekstrakta crnog duda prikazani su u Prilogu 1, 2 i 3.

U tabeli 3.21. prikazan je sadržaj fenolnih kiselina u analiziranim ekstraktima ploda crnog duda (Prilog 1.).

Tabela 3.21. Identifikovane fenolne kiseline u ekstaktima ploda crnog duda.

Fenolne kiseline (320 nm, mg/kg)	CRNI DUD	
	Metanol	Aceton
Neohlorogenska kiselina	231,41	22,29
Kriptohlorogenska kiselina	143,28	18,34

Metanolni i acetonski ekstrakt ploda crnog duda sadrže dve fenolne kiseline: neohlorogensku i kriptohlorogensku. Metanolni ekstrakt sadrži znatno veće količine ovih kiselina u odnosu na acetonski ekstrakt.

U tabeli 3.22. prikazan je sadržaj flavonoida u analiziranim ekstraktima ploda crnog duda (Prilog 2.).

Tabela 3.22. Identifikovani flavonoidi u ekstaktima ploda crnog duda.

Flavonoidi (360 nm, mg/kg)	CRNI DUD	
	Metanol	Aceton
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	123,17	29,12
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	64,88	18,96
Kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozid	38,89	44,62
Kvercetin	4,21	-

HPLC analizom ekstrakata ploda crnog duda identifikovani su sledeći flavonoidi: kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid i kvercetin. Acetonski ekstrakt ne sadrži kvercetin. Metanolni ekstrakt ploda crnog duda sadrži veće količine kvalifikovanih flavonoida u odnosu na acetonski ekstrakt.

U tabeli 3.23. prikazan je sadržaj antocijana u analiziranim ekstraktima ploda crnog duda (Prilog 3.).

Tabela 3.23. Identifikovani antocijani u ekstaktima ploda crnog duda.

Antocijani (520 nm, mg/kg)	CRNI DUD	
	Metanol	Aceton
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	888,32	32,72
Cijanidin-3- <i>O</i> -rutinozid	349,94	5,36
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glukozid	12,19	1,73
Pelargonidin-3- <i>O</i> -rutinozid	2,98	-

Antocijani koji su kvalifikovani i kvantifikovani u metanolnom ekstraktu ploda crnog duda su: cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, pelargonidin-3-*O*-glukozid i pelargonidin-3-*O*-rutinozid. Acetonski ekstrakt ne sadrži pelargonidin-3-*O*-rutinozid. Metanolni ekstrakt sadrži znatno veće količine ovih antocijana u odnosu na acetonski ekstrakt ploda crnog duda.

3.3.3. Određivanje sadržaja metala u plodu i ekstraktima ploda crnog duda

Sadržaj teških metala u plodu i ekstraktima ploda crnog duda prikazan je u tabeli 3.24.

Tabela 3.24. Sadržaj teških metala u plodu i ekstraktima ploda crnog duda.

CRNI DUD							
Rastvarač	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Mn (mg/100g)	Cd (µg/100g)	Ni (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Pb (mg/100g)
Plod	42,13±7,17	1,07±0,14	0,81±0,09	1,77±0,13	0,27±0,00	3,40±0,35	0,14±0,01
Voda	0,23±0,01	0,02±0,01	0,07±0,01	-	0,05±0,01	0,04±0,01	-
Etanol 50%	0,70±0,02	0,02±0,00	0,10±0,01	-	0,03±0,00	0,08±0,01	-
Etanol	0,50±0,00	0,01±0,00	0,20±0,02	0,34±0,03	0,02±0,00	0,91±0,06	-
Aceton 50%	12,62±2,84	0,01±0,00	0,41±0,06	0,85±0,10	0,01±0,00	1,56±0,05	-
Aceton	5,28±0,06	0,28±0,03	0,54±0,04	0,26±0,01	0,03±0,00	1,50±0,00	-
Metanol 50%	0,80±0,02	0,06±0,01	0,08±0,01	-	0,05±0,01	0,99±0,03	-
Metanol	0,48±0,01	0,08±0,01	0,19±0,03	0,18±0,01	0,03±0,01	0,55±0,03	-

Plod crnog duda sadrži najveću količinu gvožđa (42,13 mg/100g) a najmanju količinu kadmijuma (1,77 µg/100g), kao i plod belog i crvenog duda. Takođe, samo plod pokazuje prisustvo olova (0,14 mg/100g) dok u ekstraktima olovo nije detektovano. Sadžaj teških metala u plodu crnog duda opada u sledećem nizu: gvožđe>cink>bakar>mangan>nikal>olovo>kadmijum.

Plod crnog duda iz Turske sadrži znatno manju količinu gvožđa (5,00 mg/100g) (*Ercisli, 2010*). Količina mangana bila je veća u odnosu na naše vrednosti (7,00 mg/100g), dok je sadžaj cinka približno jednak našim rezultatima (3,00 mg/100g) (*Ercisli, 2010*). Drugi autori publikovali su, takođe niže vrednosti sadržaja gvožđa u plodu crnog duda (4,2 mg/100g) (*Ercisli i Orhan, 2007*) u odnosu na naše. Takođe, sadžaj bakra je bio niži (0,4 mg/100g), dok je količina mangana bila veća (4,2 mg/100g) u odnosu na naše rezultate (0,81 mg/100g). Količina cinka je približno jednaka (3,2 mg/100g) (*Ercisli i Orhan, 2007*). Crni dud iz Pakistana sadrži

znatno veće količine gvožđa i cinka (77,6 i 59,2 mg/100g, respektivno). Sadržaj nikla je, takođe veći (1,6 mg/100g) u odnosu na naše rezultate (0,27 mg/100g) (*Imran i sar., 2011*).

Vodeni ekstrakt sadrži najmanju količinu gvožđa (0,23 mg/100g) dok je najveća količina prisutna u aceton 50% ekstraktu (12,62 mg/100g). Sadržaj bakra se kreće od 0,01 mg/100g u etanolnom i aceton 50% ekstraktu do 0,28 mg/100g u acetonskom ekstraktu. Najmanju količinu mangana sadrži vodeni ekstrakt (0,07 mg/100g) dok je najveća količina zabeležena u acetonskom ekstraktu (0,54 mg/100g). Prisustvo kadmijuma nije potvrđeno u svim ekstraktima. Ekstrakt vode, etanola 50% i metanola 50% ne sadrže kadmijum dok se u ostalim kreće od 0,18 do 0,85 mg/100g u metanolnom i aceton 50% ekstraktu, respektivno. Sadržaj nikla je u ispitivanim ekstraktima nizak i kreće se od 0,01 mg/100g u aceton 50% ekstraktu do 0,05 mg/100g u vodenom i metanol 50% ekstraktu. Količina cinka je najmanja u vodenom ekstraktu (0,04 mg/100g) a najveća u acetonu 50% (1,56 mg/100g).

Koeficijenti ekstrakcije prikazani su u tabeli 3.25.

Tabela 3.25. Koeficijenti ekstrakcije u ekstraktima ploda crnog duda.

Rastvarač	Fe	Cu	Mn	Cd	Ni	Zn
Voda	0,55	1,87	8,64	-	18,52	1,18
Etanol 50%	1,66	1,87	12,35	-	11,11	2,35
Etanol	1,19	0,93	24,69	19,21	7,41	26,76
Aceton 50%	30,00	0,93	50,62	48,02	3,70	45,88
Aceton	12,53	26,17	66,67	14,69	11,11	44,12
Metanol 50%	1,90	5,61	9,88	-	18,52	29,12
Metanol	1,14	7,48	23,46	10,17	11,11	16,18

Koeficijent ekstrakcije u ekstraktima ploda crnog duda se kreće od 0,55 % u vodenom ekstraktu za ekstrakciju gvožđa do 66,67 % u acetonskom ekstraktu za ekstrakciju mangana.

3.3.4. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda

U tabeli 3.26. prikazana je antimikrobna aktivnost ekstrakata crnog duda.

Tabela 3.26. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda crnog duda (*Morus nigra L.*)

Test mikroorganizmi	Aceton 50%		Metanol		DMSO		Tetraciklin
	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	20 µl	50 µl	
<i>Salmonella typhimurium</i>	11 mm	16 mm	11 mm	17 mm	-	-	28 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	16 mm	-	16 mm	-	-	19 mm
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	17 mm	11 mm	16 mm	-	-	36 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	11 mm	16 mm	11 mm	16 mm	-	-	34 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	14 mm	11 mm	15 mm	-	-	30 mm

Mikrobiološkim ispitivanjem utvrđeno je da metanolni i aceton 50% ekstrakt ploda crnog duda pokazuju antibakterijsko dejstvo na sve ispitivane bakterije.

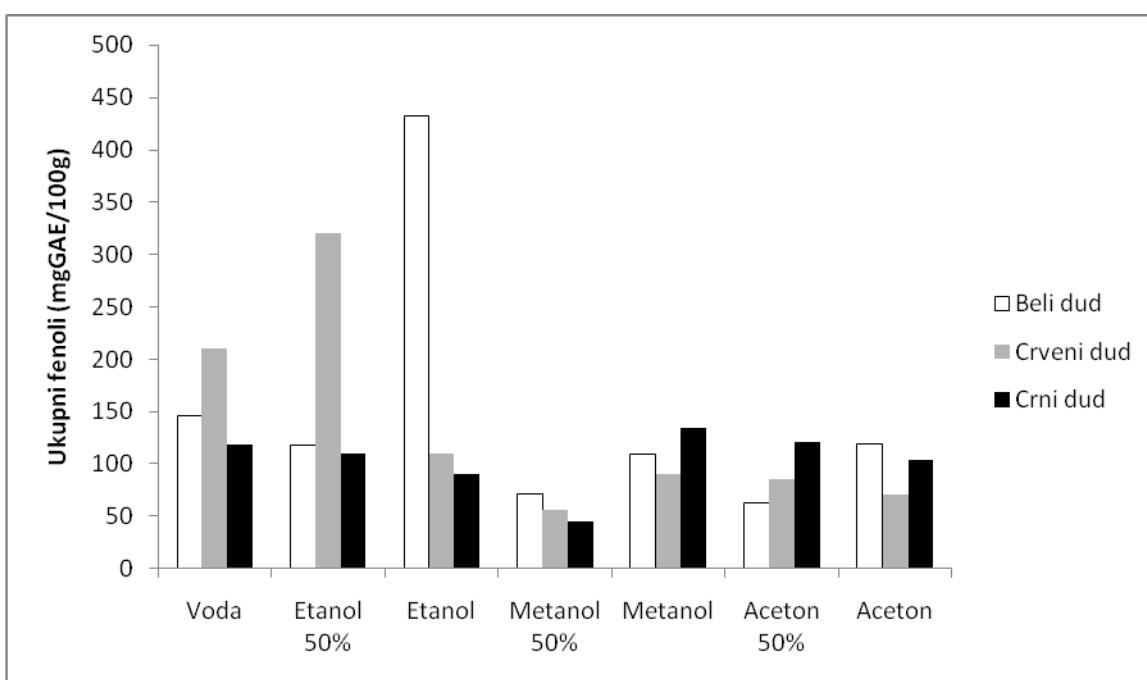
Khalid (2011) je ispitivao antimikrobnu aktivnost voćnog soka crnog duda i utvrdio da postoji delovanje na *Bacillus subtilis*, *Bacillus spizizenii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, što se u značajnoj meri slaže sa našim rezultatima.

3.4. UPOREDNI PREGLED REZULTATA DOBIJENIH ANALIZOM EKSTRAKATA PLODA BELOG, CRVENOG I CRNOG DUDA

3.4.1. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima tri vrste duda

Određen je sadržaj ukupnih fenola u sedam rastvarača različite polarnosti za tri različite vrste duda sa područja Jugoistočne Srbije.

Na Histogramu 3.12. prikazan je sadžaj fenola u različitim ekstraktima ploda tri vrste duda.



Histogram 3.12. Uporedni pregled sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima ploda tri vrste duda.

Na osnovu dobijenih podataka napravljen je redosled vrsta duda u pogledu sadržaja ukupnih fenola u rastvaračima različite polarnosti i to je prikazano u Tabeli 3.27.

Tabela. 3.27. Redosled sadržaja ukupnih fenola u različitim ekstraktima različitih vrsta duda.

Rastvarač	Dielektrična konstanta	Redosled vrste duda u pogledu sadržaja ukupnih fenola		
Voda	80	Crveni	Beli	Crni
Etanol 50%	52,5	Crveni	Beli	Crni
Metanol 50%	36,5	Beli	crveni	Crni
Metanol	33	Crni	Beli	Crveni
Aceton 50%	30,5	Crni	Crveni	Beli
Etanol	25	Beli	Crveni	Crni
Aceton	21	Beli	Crni	Crveni

Sa Histograma 3.12. vidi se da najveći sadržaj fenola ima etanolni ekstrakt belog duda (432,48 mgGAE/100g) dok je najmanji sadržaj ukupnih fenola u metanol 50% ekstraktu crnog duda (45,45 mgGAE/100g). Najveći sadržaj fenola pokazali su etanolni, etanol 50% i vodenii ekstrakti sve tri vrste duda.

U ekstraktima etanola, metanola 50% redosled sadržaja ukupnih fenola je sledeći: beli >crveni >crni dud.

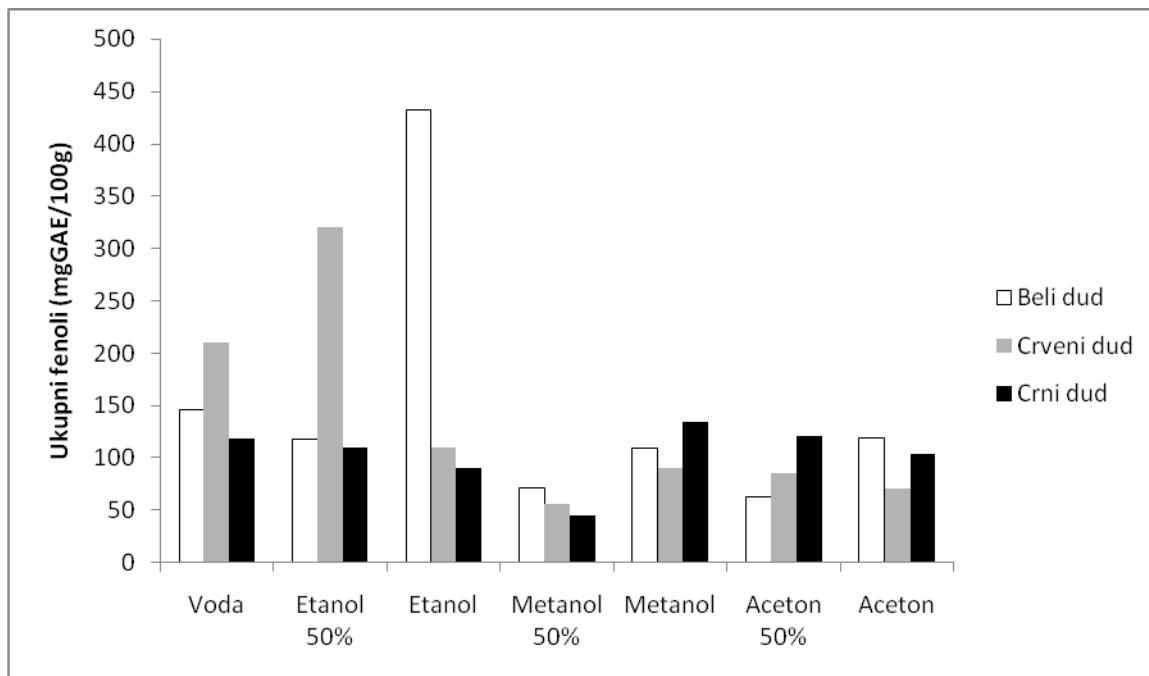
U metanolnim ekstraktima sadržaj fenola opada u sledećem nizu: crni>beli>crveni dud. U vodenom i etanol 50% ekstraktu najveći sadržaj fenola imao je plod crvenog duda, zatim belog duda, a najmanji sadržaj fenola bio je u plodu crnog duda.

Aceton 50% ekstrakt crnog duda pokazao je najveći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na ekstrakte crvenog i belog duda u kojima je sadržaj fenola niži. U acetonskom ekstraktu, najveći sadržaj ukupnih fenola ima ekstrakt ploda belog duda, zatim ploda crnog duda, dok je namanji sadržaj fenola pokazao acetonski ekstrakt ploda crvenog duda.

Najveći sadržaj ukupnih fenola ima crveni dud u rastvaračima velike polarnosti (voda, etanol 50%), crni dud u rastvaračima srednje polarnosti (metanol i aceton 50%), i beli dud u rastvaračima niske polarnosti (etanol, aceton).

3.4.2. Uporedni pregled sadžaja flavonoida u ekstraktima tri vrste duda

Na Histogramu 3.13. prikazan je sadržaj flavonoida u ekstraktima belog, crvenog i crnog duda.



Histogram 3.13. Uporedni pregled sadžaja flavonoida u ekstraktima tri vrste duda.

Na osnovu dobijenih podataka napravljen je redosled vrsta duda u pogledu sadržaja flavonoida u rastvaračima različite polarnosti i to je prikazano u Tabeli 3.28.

Tabela. 3.28. Redosled sadržaja ukupnih fenola u različitim ekstraktima različitih vrsta duda.

Rastvarač	Dielektrična konstanta	Redosled vrste duda u pogledu sadržaja flavonoida		
Voda	80	Crveni	Crni	Beli
Etanol 50%	52,5	Crni	Crveni	Beli
Metanol 50%	36,5	Crni	crveni	Beli
Metanol	33	Crni	Crveni	Beli
Aceton 50%	30,5	Crni	Beli	Crveni
Etanol	25	Crni	Crveni	Beli
Aceton	21	Crni	Beli	Crveni

Sadržaj flavonoida u ekstraktima tri vrste duda kreće se od 29,00 mgGAE/100g u metanolu 50% ploda belog duda do 210,77 mgGAE/100g svežeg voća u metanolnom ekstraktu ploda crnog duda.

Sadržaj flavonoida u etanol 50%, etanolnom, metanol 50% i metanolnom ekstraktu opada po sledećem redosledu: crni>crveni>bela dud.

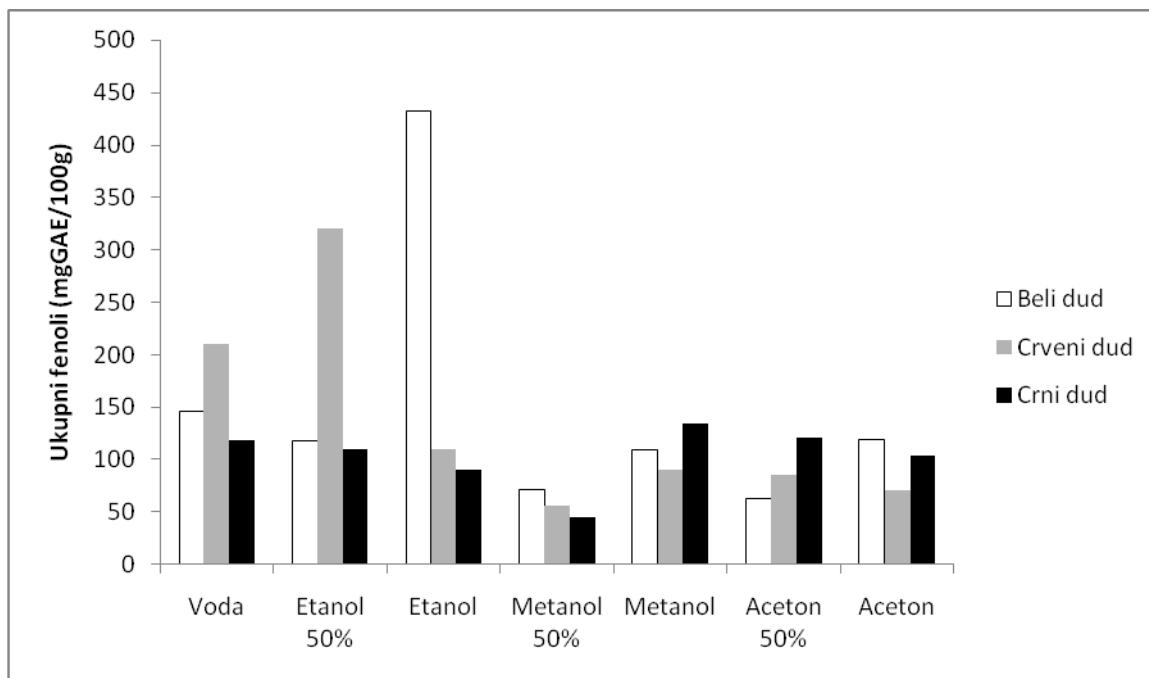
U aceton 50% i acetonskom ekstraktu najveći sadržaj flavonoida imao je crni dud, zatim plod belog duda, a najmanje flavonoida bilo je u crvenom dudu.

Plod crvenog duda u vodenom ekstraktu sadržao je najviše flavonoida, dok je manje bilo u crnom i belom dudu, respektivno.

Crni dud se odlikuje najvećim sadržajem flavonoida u svim ispitivanim rastvaračima sa izuzetkom vode, gde najveći sadržaj ima crveni dud. Beli dud ima najmanji sadržaj flavonoida u svim ispitivanim rastvaračima osim u rastvoru acetona i acetona 50%.

3.4.3. Uporedni pregled sadržaja monomernih antocijana u ekstraktima tri vrste duda

Histogram 3.14. prikazuje uporedni pregled sadržaja monomernih antocijana u ekstraktima duda.

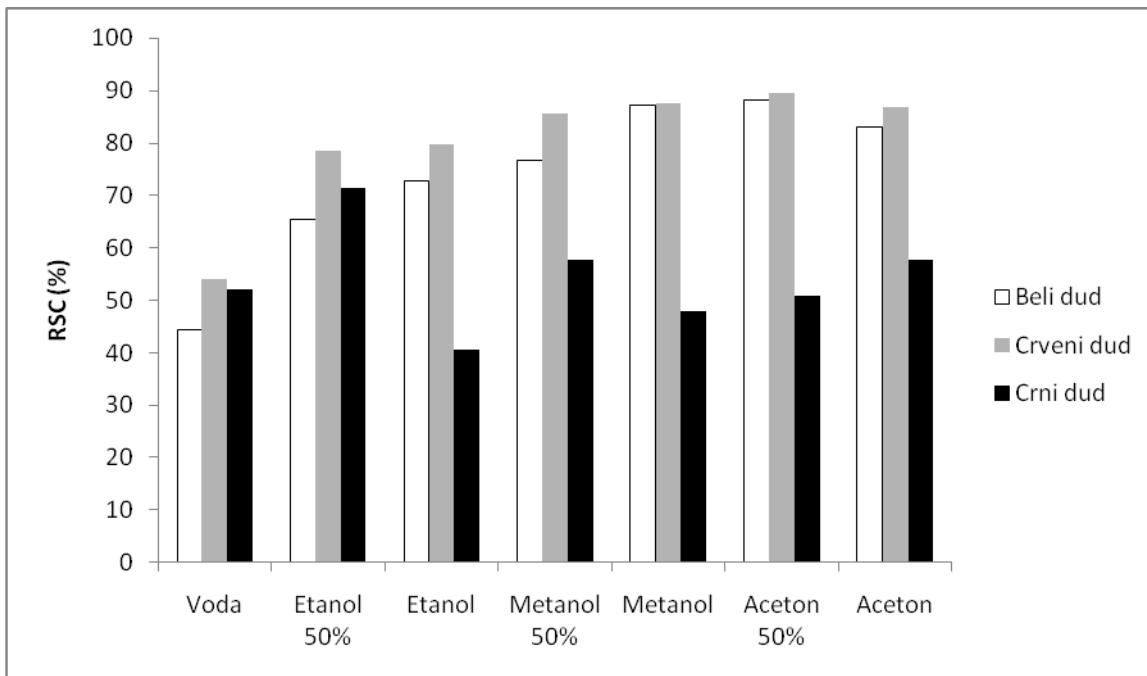


Histogram 3.14. Uporedni pregled sadržaja antocijana u ekstraktima duda.

Kao što je očekivano, nijedan od ekstrakata ploda belog duda nije pokazao sadržaj antocijana. Neki ekstrakti ploda crvenog duda potvrdili su prisustvo malih količina antocijana. To su vodeni, etanol 50%, aceton 50% i acetonski ekstrakt crvenog duda. Najviše antocijana bilo je u etanol 50% i acetonskom ekstraktu (5,34 i 5,28 mg/100g, respektivno). Svi ekstrakti ploda crnog duda sadrže znatne količine monomernih antocijana odakle potiče boja i voća.

3.4.4. Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom DPPH metode

Na Histogramu 3.15. prikazana je antioksidativna aktivnost ekstrakata plodova belog, crvenog i crnog duda primenom DPPH metode za određivanje antioksidativne aktivnosti.



Histogram 3.15. Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom DPPH metode.

Najmanja antioksidativna svojstva ima etanolni ekstrakt ploda crnog duda (40,55%), dok su antioksidativna svojstva najviše izražena u acetonu 50% ploda crvenog duda (89,41%). Generalno, vodeni ekstrakti pokazali su najmanje antioksidativne aktivnosti, a metanolni, aceton 50% i aceton najviše antioksidativne aktivnosti. U vodenom i etanol 50% ekstraktu antioksidativna aktivnost opada u nizu: crveni>crni>beli dud. U ostalim ekstraktima antioksidativnu aktivnost opada u nizu: crveni>beli>crni dud.

Na osnovu dobijenih podataka napravljen je redosled vrsta duda u pogledu antioksidativne aktivnosti u rastvaračima različite polarnosti i to je prikazano u Tabeli 3.29.

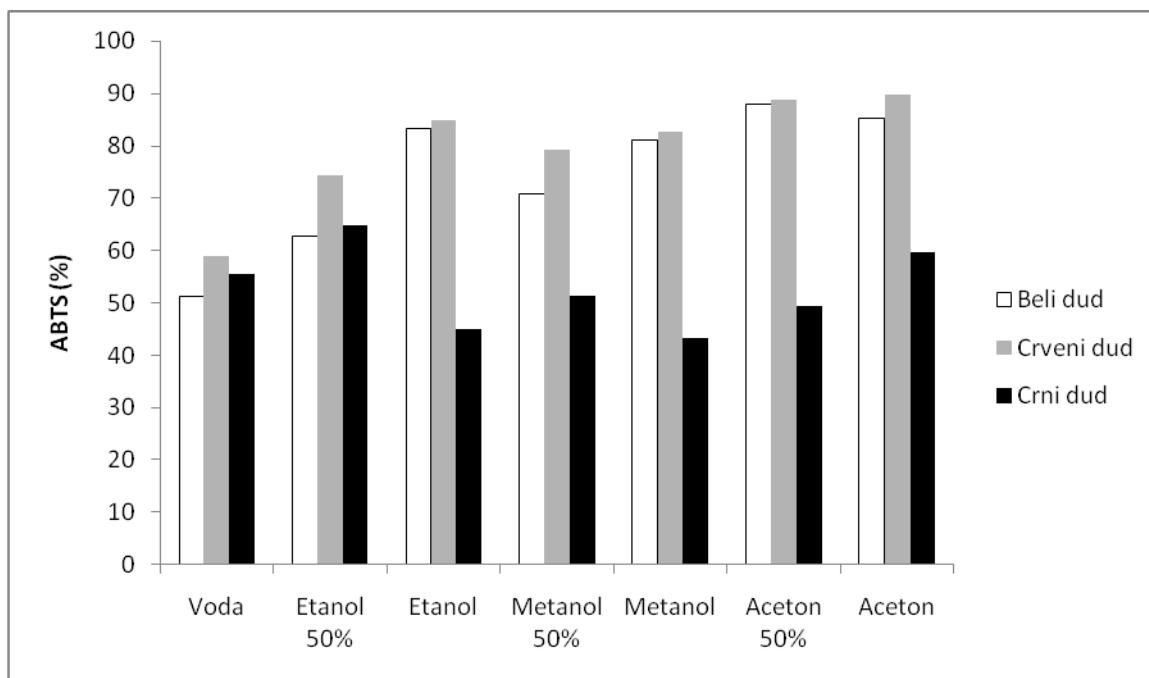
Tabela. 3.29. Redosled antioksidativne aktivnosti različitih ekstraktima različitih vrsta duda (DPPH metoda).

Rastvarač	Dielektrična konstanta	Redosled vrste duda u pogledu sadržaja flavonoida		
Voda	80	Crveni	Crni	Beli
Etanol 50%	52,5	Crveni	Crni	Beli
Metanol 50%	36,5	Crveni	Beli	Crni
Metanol	33	Crveni	Beli	Crni
Aceton 50%	30,5	Crveni	Beli	Crni
Etanol	25	Crveni	Beli	Crni
Aceton	21	Crveni	Beli	Crni

Najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju ekstrakti crvenog duda u svim sistemima rastvarača. U rastvaračima veće polarnosti crni dud ima veću antioksidativnu aktivnost, a u rastvaračima manje polarnosti beli dud ima veću antioksidativnu aktivnost, što je verovatno posledica vrste i količine ekstrahovanih jedinjenja.

3.4.5. Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom ABTS metode

Histogram 3.16. pokazuje uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom ABTS testa za određivanje antioksidativne aktivnosti.



Histogram 3.16. Uporedni pregled antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda primenom ABTS metode.

Na osnovu dobijenih podataka napravljen je redosled vrsta duda u pogledu antioksidativne aktivnosti u rastvaračima različite polarnosti i to je prikazano u Tabeli 3.30.

Tabela. 3.30. Redosled antioksidativne aktivnosti različitih ekstraktima različitih vrsta duda (ABTS metoda).

Rastvarač	Dielektrična konstanta	Redosled vrste duda u pogledu antioksidativne aktivnosti		
Voda	80	Crveni	Beli	Crni
Etanol 50%	52,5	Crveni	Beli	Crni
Metanol 50%	36,5	Crveni	Beli	Crni
Metanol	33	Crveni	Beli	Crni
Aceton 50%	30,5	Crveni	Beli	Crni
Etanol	25	Crveni	Beli	Crni
Aceton	21	Crveni	Beli	Crni

Korišćenjem ABTS testa, u svim ispitivanim ekstraktima, antioksidativna aktivnost opada po sledećem redosledu: crveni>beli>crni dud. Antioksidativna aktivnost se kreće od 43,32% u metanolnom ekstraktu ploda crnog duda do 89,69% u acetonskom ekstraktu crvenog duda.

3.4.6. PCA analiza sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima crnog i crvenog duda

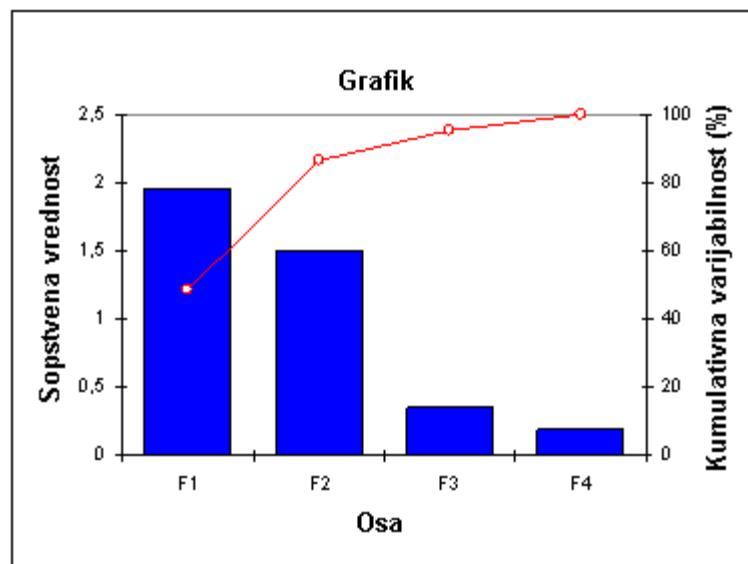
Na osnovu podataka dobijenih određivanjem odabranih klasa jedinjenja u uzorcima dudova (Tabela 3.30.), PCA je korišćena za moguće razlike u ovim uzorcima. PCA je korisno oruđe, zbog toga što je jedna od njenih prednosti redukcija broja varijabli eksperimentalnih podataka i ekstrakcija malog broja latentnih faktora (glavnih komponenata, PCA) za analizu odnosa između uočenih varijabli (Horel, 1981; Horel, 1984).

Tabela 3.30. Sadržaj selektovanih klasa jedinjenja u ekstraktima duda.

Plod	Rastvarač	Ukupni fenoli (mgGAE/100g)	flavonoidi (mgCE/100g)	Antocijani (mgCy-3-o-Glu/100g)
<i>Morus rubra L.</i>	Voda	210,39±0,46	192,07±1,51	2,59±0,17
	Etanol 50%	320,78±0,77	99,83±0,09	5,34±0,10
	Etanol	109,75±0,39	112,43±0,06	-
	Metanol 50%	56,40±0,05	38,39±1,48	-
	Metanol	90,26±0,21	142,70±2,04	-
	Aceton 50%	85,91±0,69	49,77±0,14	1,70±0,31
	Aceton	71,40±2,39	44,95±0,67	5,28±0,62
<i>Morus nigra L.</i>	Voda	118,84±0,77	141,70±5,66	114,83±2,25
	Etanol 50%	109,80±2,25	144,90±6,99	128,68±1,20
	Etanol	90,26±0,42	183,90±2,01	125,68±2,77
	Metanol 50%	45,45±0,23	112,07±1,05	44,34±1,02
	Metanol	134,42±0,19	210,77±0,06	87,18±0,98
	Aceton 50%	120,78±0,21	191,91±0,93	84,31±0,67
	Aceton	103,90±0,41	157,10±0,98	74,72±1,05

Na osnovu ovog prikazivanja, moguće je klasifikovati uzorke po raspodeli selektovanih klasa jedinjenja. Početna tačka za PCA izračunavanja je bio matriks podataka dimenzija n x p, gde je n broj slučajeva (redova) i p je broj varijabli (kolona). U matriksu, uzorci dudova su korišćeni kao redovi. Kolone su rezultat analize određenih klasa jedinjenja uzoraka dudova. Kao rezultat PCA analize, 4 nove varijable su dobijene koje su okarakterisane sopstvenim vrednostima. Izvedena statistika sa Pearson korelacionim matriksom na uzorcima dudova bazirana na sadržaju određenih klasa jedinjenja pokazuje da postoji jaka pozitivna korelacija između količine ukupnih fenola i polimera (0,785), i srednja pozitivna korelacija između količine antocijana i flavonoida (0,592).

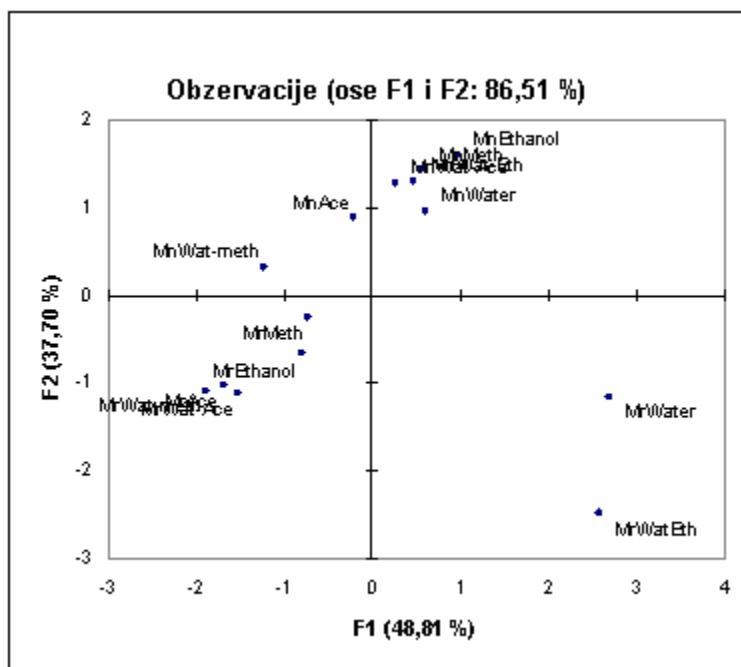
Broj faktora predstavlja ukupan broj varijabli korišćenih u setu podataka. Sopstvene vrednosti faktora su 1,953, 1,508, 0,347, i 0,193, redom. Tako, dva faktora se moraju koristiti za objašnjavanje dobijenih varijabilnosti (48,81 % i 37,70 %) (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Važnost faktora i vrednosti kumulativnih varijabilnosti.

Sve vrednosti za F1 su pozitivne; neke vrednosti faktora (F2, F3, i F4) su pozitivne, a neke od njih su negativne.

Grafička prikazivanja bazirana na sadržaju određenih klasa jedinjenja su predstavljena na Slici 3.2.



Slika 3.2. Grafici glavnih komponenata (F1 i F2) proučavanih biljnih uzoraka na sadržaj pojedinih klasa jedinjenja. (Uzorci su označeni na sledeći način: 1. Prva dva slova označavaju latinsko ime biljke (Mr znači da je biljka *Morus rubra L.*); 2. Sledеćа slova označavaju rastvarač(e) korišćene za ekstrakciju selektovanih klasa jedinjenja (WatEth znači Water-Ethanol)).

Sa Slike 3.2. može se videti da je visok sadržaj ukupnih fenola prisutan u uzorcima dudova na desnoj strani grafika a nizak na levoj strani grafika. Takođe, može se zaključiti da je visok sadržaj flavonoida prisutan u uzorcima dudova u gornjem delu grafika, a nizak na suprotnoj strani grafika.

3.4.7. Uporedni pregled rezultata HPLC analize ekstrakata tri vrste duda

U tabeli 3.31. prikazan je uporedni pregled HPLC analize tri vrste duda.

Tabela 3.31. Uporedna pregled HPLC analize ekstrakata tri vrtse duda.

Fenolne kiseline (320nm) mg/kg	CRNI DUD		CRVENI DUD		BELI DUD	
	Metanol	Aceton	Metanol	Aceton	Metanol	Aceton
Hlorogenska kiselina	-	-	9,22	-	7,36	-
Kafena kiselina	-	-	3,87	-	3,80	-
Neohlorogenska kiselina	231,41	22,29	6,76	15,18	25,21	22,99
Kriptohlorogenska kiselina	143,28	18,34	-	8,57	24,15	8,92
Flavonoidi (360nm)						
Kvercetin-3-O-rutinozid	123,17	29,12	12,59	13,94	16,91	26,58
Kvercetin-3-O-glukoqid	64,88	18,96	6,10	5,78	26,04	5,02
Kvercetin-3-O-ramnozid	38,89	44,62	-	22,85	-	24,91
Kempferol-3-O-rutinozid	-	-	18,52	-	8,12	5,13
Kvercetin	4,21	-	-	-	-	-
Antocijani (520nm)						
Cijanidin-3-O-glukoqid	888,32	32,72	11,17	-	-	-
Cijanidin-3-O-rutinozid	349,94	5,36	-	-	-	-
Pelargonidin-3-O-glukoqid	12,19	1,73	-	-	-	-
Pelargonidin-3-O-rutinozid	2,98	-	-	-	-	-

U ekstraktima belog, crvenog i crnog duda identifikovano je ukupno četiri fenolne kiseline: hlorogenska, neohlorogenska, kriptohlorogenska i kafena kiselina. Neohlorogenska

kiselina je potvrđena i u metanolnom i acetonskom ekstraktu belog, crvenog i crnog duda. Kriptohlorogensku kiselinu sadrže svi ekstrakti osim metanolnog ekstrakta crvenog duda. Kafenu i hlorogensku kiselinu sadrže metanolni ekstrakti belog i crvenog duda. Najmanji sadržaj pokazala je kafena kiselina u metanolnom ekstraktu belog duda (3,80 mg/kg), dok je najveća količina neohlorogenske kiseline u metanolnom ekstraktu ploda crnog duda (231,41 mg/kg).

HPLC analizom, u ispitivanim ekstraktima, potvrđeno je prisustvo sledećih flavonoida: kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, kempferol-3-*O*-rutinozid i kvercetin. Svi ispitvani ekstrakti tri vrste duda sadrže kvercetin-3-*O*-rutinozid i kvercetin-3-*O*-glukozid. Kvercetin-3-*O*-ramnozid sadrže svi ispitvani ekstrakti osim metanolnih ekstrakata belog i crvenog duda. Kempferol-3-*O*-rutinozid sadrže metanolni ekstrakti belog i crvenog duda i acetonski ekstrakt belog duda. Kvercetin sadrži samo metanolni ekstrakt crnog duda. U acetonskom ekstraktu belog duda zabeležena je najmanja količina kvercetin-3-*O*-glukozida (5,02 mg/kg), dok je najveća količina kvercetin-3-*O*-rutinozida zabeležena u metanolnom ekstraktu crnog duda (123,17 mg/kg).

Kvalifikovani i kvantifikovani antocijani u ekstraktima tri vrste duda su: cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, pelargonidin-3-*O*-glukozid i pelargonidin-3-*O*-rutinozid. Cijanidin-3-*O*-glukozid sadrže metanolni i acetonski ekstrakti crvenog i crnog duda. Cijanidin-3-*O*-rutinozid i pelargonidin-3-*O*-glukozid sadrže samo metanolni i acetonski ekstrakti ploda crnog duda. Pelargonidin-3-*O*-rutinozid je prisutan samo u metanolnom ekstraktu ploda crnog duda. Beli dud ne sadrži antocijane.

3.4.8. Uporedni pregled sadržaja metala u plodovima i ekstraktima tri vrste duda

Voće se lako može kontaminirati teškim metalima tokom kultivacije ili kasnije tokom obrade i zbog toga je određivanje sadržaja teških metala od visokog značaja. Prisustvo nekih teških metala u velikim količinama u telu može imati toksično dejstvo (*Jabeen i sar., 2010; Khan i sar., 2008; Sharma i sar., 2009; WHO, 2005*). Sadržaj teških metala je jedan od kriterijuma za korišćenje biljnog materijala u proizvodnji tradicionalnih lekova. Teški metali imaju značajnu toksičnost za ljude, životinje, mikroorganizme i biljke (*Fotakis i Timbrell, 2006*). Stoga, kontaminacija voća teškim metalima može ugroziti kvalitet i bezbednost hrane (*Sharma i sar., 2009*). Olovo i kadmijum su vrlo štetni elementi za ljudski organizam posebno u visokim

koncentracijama (*Hamurcu, 2010*). Zbog toga, postoji maksimalna dozvoljena granica kadmijuma u voću i povrću koja iznosi 0,05 mg/kg, dok je maksimalna dozvoljena koncentracija olova 0,2 mg/kg (*Codex Stand, 1995*). Različiti faktori kao što su izduvni gasovi, industrijski otpad i otpadne vode, povećavaju sadržaj teških metala u voću i drugih jestivih delova biljaka. Najveći zagađivač postrojenja pored puteva jesu izduvni gasovi (*Ma i sar., 2013*).

U ovom radu je ispitivan sadržaj teških metala (gvožđe, cink, bakar, kadmijum, mangan, nikal i olovo) u plodu tri vrste duda i njihovim ekstraktima (Tabela 3.32.). Potvrđen je sadržaj svih metala.

Plod sve tri vrste duda pokazao je najveći sadržaj gvožđa, dok je najmanje bilo kadmijuma. Nivo gvožđa se kreće od 23,06 mg/100g u plodu belog duda do 57,38 mg/100g u plodu crvenog duda. Količina gvožđa u plodovima belog, crvenog i crnog duda prelazi granice koju propisuje FAO/WHO u jestivim biljkama (2 mg/100g) (*FAO/WHO, 1984*). Međutim, rezultati ovog istraživanja su uporedivi sa podacima koji su publikovani u ranijim istraživanjima drugih autora o sadržaju gvožđa.

Koncentracija bakra u ispitivanim plodovima se kreće od 0,86 do 1,51 mg/100g. Sadržaj bakra ne prelazi granice koje su ranije propisane (2 mg/100g) (*WHO, 1998*). Koncenracija bakra koja je pronađena u plodovima duda je uporediva sa rezultatima drugih istraživača.

Količina mangana u plodovima duda se kreće od 0,81 mg/100g (crni dud) do 2,33 mg/100g (beli dud).

Koncentracija kadmijuma u testiranim plodovima se kreće od 1,77 do 2,46 µg/100g u crnom i belom dudu, respektivno. Kadmijum se može akumulirati u organizmu i oštetiti rad bubrega i jetre (*WHO, 1998*). Dozvoljena granična vrednost za kadmijum u biljkama je 0,03 mg/100g (*WHO, 2005*). Svi ispitivani materijali sadržali su veće količine kadmijuma.

Količina nikla u plodu sve tri vrste duda je približno jednaka (0,36, 0,37 i 0,27 mg/100g za beli, crveni i crni dud, respektivno).

Tabela 3.32. Sadržaj teških metala u plodu belog, crvenog i crnog duda i njihovim ekstraktima.

UZORAK	Rastvarač	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Mn (mg/100g)	Cd (µg/100g)	Ni (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Pb (mg/100g)
<i>Morus alba L.</i>	Plod	23,06±1,02	0,86±3,11	2,32±0,18	2,45±0,21	0,36±0,01	2,23±0,17	0,09±0,01
	Voda	0,32±0,01	0,08±0,02	0,28±0,02	-	0,10±0,01	0,73±0,05	-
	Etanol 50%	0,15±0,16	0,04±0,02	0,27±0,01	-	0,05±0,01	0,59±0,04	-
	Etanol	0,71±0,14	0,08±1,36	0,44±0,03	0,33±0,02	0,04±0,01	0,86±0,07	-
	Aceton 50%	1,44±0,04	0,08±0,01	0,42±0,04	0,42±0,03	0,05±0,01	1,05±0,08	-
	Aceton	5,38±4,11	0,26±0,19	0,59±0,04	0,25±0,02	0,03±0,01	1,63±0,23	-
	Metanol 50%	0,35±0,30	0,04±0,54	0,15±0,01	-	0,14±0,02	0,91±0,07	-
	Metanol	0,23±0,18	0,11±0,03	0,46±0,01	-	0,10±0,01	1,12±0,08	-
<i>Morus rubra L.</i>	Plod	57,38±6,25	1,51±0,12	1,98±0,20	1,84±0,15	0,37±0,03	5,04±0,06	0,20±0,02
	Voda	1,05±0,78	0,01±0,19	0,09±0,01	-	0,05±0,01	0,43±0,03	-
	Etanol 50%	0,70±0,10	0,02±0,00	0,15±0,01	-	0,04±0,00	0,43±0,03	-
	Etanol	0,32±0,94	0,01±0,00	0,18±0,01	-	0,02±0,00	0,57±0,02	-
	Aceton 50%	5,85±1,16	0,05±0,01	0,39±0,02	0,29±0,02	0,06±0,01	0,55±0,02	-
	Aceton	5,69±0,36	0,28±0,01	0,59±0,04	0,27±0,04	0,05±0,01	1,04±0,02	-
	Metanol 50%	0,31±5,10	0,09±0,01	0,09±0,01	-	0,04±0,00	0,08±0,01	-
	Metanol	0,32±0,09	0,11±0,01	0,25±0,02	-	0,02±0,00	0,12±0,01	-
<i>Morus nigra L.</i>	Plod	42,13±8,14	1,07±0,11	0,81±0,06	1,77±0,13	0,27±0,00	3,40±0,32	0,14±0,01
	Voda	0,23±1,96	0,02±0,01	0,07±0,01	-	0,05±0,01	0,04±0,01	-
	Etanol 50%	0,70±0,02	0,02±0,00	0,10±0,01	-	0,03±0,00	0,08±0,01	-
	Etanol	0,50±0,00	0,01±0,00	0,20±0,02	0,34±0,02	0,02±0,00	0,91±0,05	-
	Aceton 50%	12,62±3,68	0,01±0,00	0,41±0,05	0,85±0,07	0,01±0,00	1,56±0,04	-
	Aceton	5,28±0,03	0,28±0,03	0,54±0,03	0,26±0,01	0,03±0,00	1,50±0,00	-
	Metanol 50%	0,80±1,01	0,06±0,01	0,08±0,01	-	0,05±0,01	0,99±1,00	-
	Metanol	0,48±3,01	0,08±0,01	0,19±0,02	0,18±0,01	0,03±0,01	0,55±3,12	-

Najviši sadržaj cinka bio je u plodu crvenog duda (5,04 mg/100g) a najniži u plodu belog duda (2,23 mg/100g). Količina cinka koju propisuje FAO/WHO je 2,74 mg/100g (*FAO/WHO, 1984*). Dozvoljena količina cinka pronađena je samo u plodu belog duda, dok u ostalim ispitivanim uzorcima količina cinka prevazilazi dozvoljene granice (*WHO, 2005*).

Sadržaj olova se kreće od 0,09 mg/100g u plodu belog duda do 0,2 mg/100g u plodu crvenog duda. Količina olova se kreće u granicama koje su propisane i dozvoljene (1 mg/100g) (*WHO, 2005*). Prisustvo olova je potvrđeno samo u plodovima sve tri vrste ali ne i u njihovim ekstraktima. Trichopoulos (*Trichopoulos, 1997*) je publikovao da oovo ima toksično dejstvo čak i u malim koncentracijama a može imati i kancerogeno dejstvo.

U ispitivanim ekstraktima, najveći sadržaj gvožđa je zabeležen u aceton 50% ekstraktu crnog duda (12,62 mg/100g), a najniža koncentracija bila je u etanol 50% ekstraktu belog duda (0,15 mg/100g). Sadržaj bakra se u ekstraktima kreće u rasponu od 0,01 mg/100g u vodenom i etanol 50% ekstraktu crvenog duda i etanolnom i aceton 50% ekstraktu crnog duda do 0,28 mg/100g u acetonskom ekstraktu ploda crvenog i crnog duda.

Sadržaj mangana je bio najviši u acetonskom ekstraktu belog i crvenog duda (0,59 mg/100g), a najniža koncentracija bila je u metanol 50% ekstraktu crnog duda (0,08 mg/100g). Količina kadmijuma se kreće u rasponu od 0,18 µg/100g u metanolnom ekstraktu crnog duda do 0,85 µg/100g u aceton 50% ekstraktu crnog duda. Voden, etanol 50% i metanol 50% ekstrakti belog i crvenog duda nisu potvrdili prisustvo kadmijuma. Količina nikla u ekstraktima je niska i kreće se od 0,01 mg/100g u aceton 50% ekstraktu crnog duda do 0,14 mg/100g u metanol 50% ekstraktu belog duda. Najveća količina cinka zabeležena je u acetonskom ekstraktu belog duda (1,63 mg/100g), dok je najniža koncentracija bila u vodenom ekstraktu crnog duda (0,04 mg/100g).

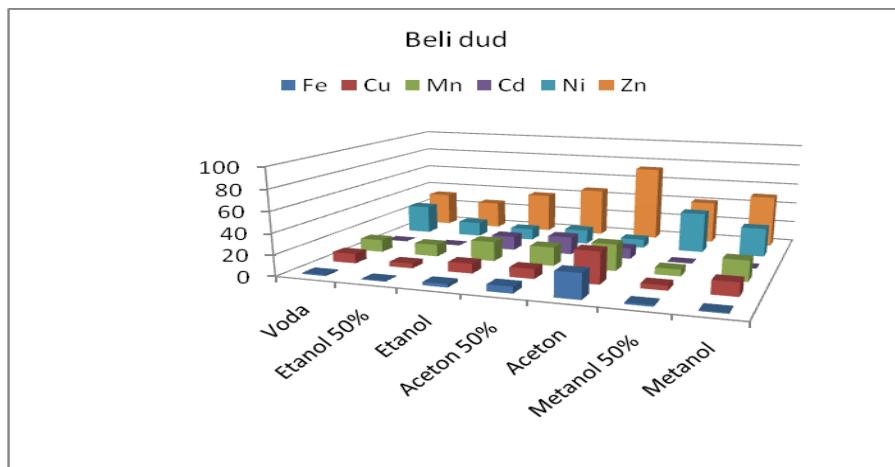
Najviši sadržaj gvožđa, bakra, mangana i cinka pokazao je acetonski ekstrakt ploda belog duda (5,38, 0,26, 0,59 i 1,63 mg/100g, respektivno). Kadmijuma je bilo najviše u aceton 50% ekstraktu belog duda (0,42 µg/100g), dok voden, etanol 50%, metanolni i methanol 50% ekstrakti nisu pokazali prisustvo kadmijuma. Metanol 50% ekstrakt belog duda sadrži najveću količinu nikla (0,14 mg/100g). Etanol 50% ekstrakt belog duda pokazao je niske koncentracije gvožđa, bakra i cinka (0,15, 0,04 i 0,59 mg/100g, respektivno). Najniži sadržaj mangana bio je u

metanol 50% ekstraktu belog duda (0,15 mg/100g). Acetonski ekstrakt pokazao je najniži sadržaj nikla (0,03 mg/100g).

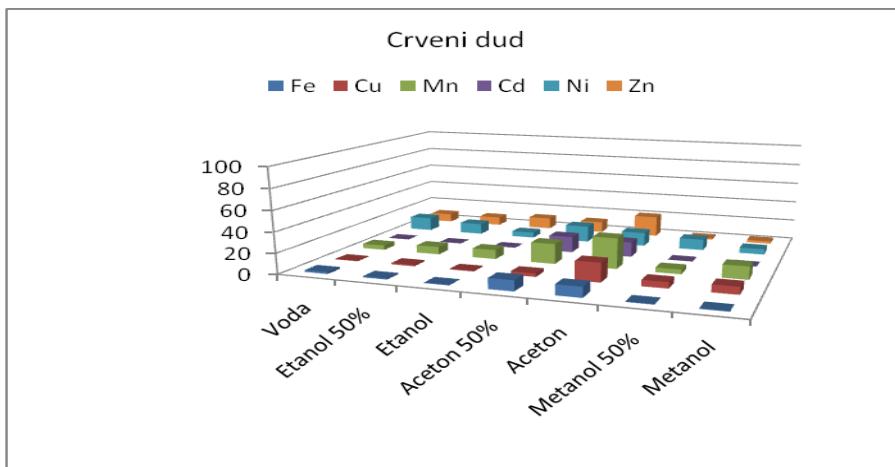
Najveći sadržaj teških metala u ekstraktima ploda crvenog duda pokazali su acetonski i aceton 50% ekstrakt. Aceton 50% ekstrakt pokazao je najveći sadrža gvožđa i nikla (5,85 i 0,06 mg/100g, respektivno). Najveća koncentracija bakra, mangana i cinka bila je u acetonskom ekstraktu ploda crvenog duda (0,28, 0,59 i 1,04 mg/100g, respektivno). Vodeni, etanol 50%, etanolni, metanol 50% i metanolni ekstrakti ploda crvenog duda nisu potvrdili prisustvo kadmijuma. Najniža koncentracija gvožđa, mangana i cinka bila je u metanol 50% ekstraktu (0,31, 0,09 i 0,08 mg/100g, respektivno). Vodeni i etanolni ekstrakt crvenog duda ima najnižu koncentraciju bakra (0,01 mg/100g). Etanolni ekstrakt imao je najnižu koncentraciju nikla (0,02 mg/100g). Mangana je bilo najmanje u vodenom i metanol 50% ekstraktu ploda crvenog duda (0,09 mg/100g).

Najveća koncentracija gvožđa u ekstraktima ploda crnog duda bila je u aceton 50% ekstraktu. Takođe, aceton 50% ekstrakt pokazao je najveći sadržaj kadmijuma i cinka. Količina bakra i mangana bila je najveća u acetonskom ekstraktu. Vodeni i metanol 50% ekstrakt imali su najveći sadržaj nikla. Vodeni, etanol 50% i metanol 50% ekstrakti ploda crnog duda nisu pokazali prisustvo kadmijuma. Vodeni ekstrakt crnog duda imao je najniži sadržaj gvožđa, mangana i cinka (0,23, 0,07 i 0,04 mg/100g, respektivno). Najmanja koncentracija bakra i nikla bila je u acetolu 50% (0,01 mg/100g).

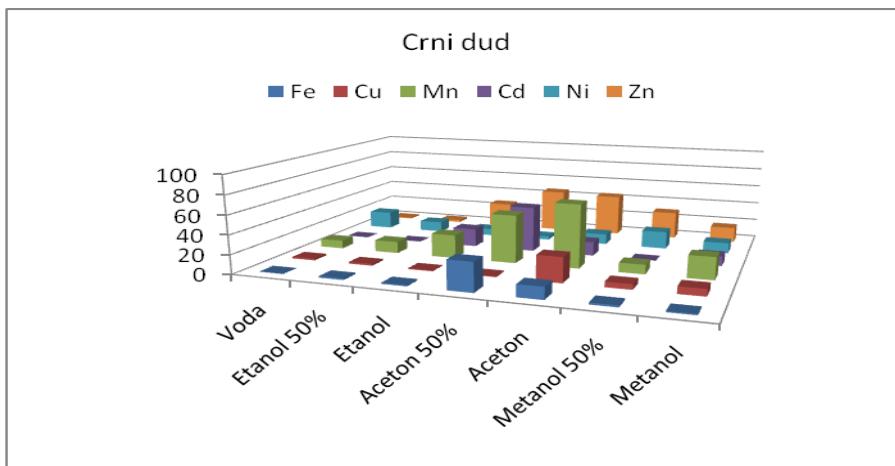
Koefficijenti ekstrakcije dobijeni u ovom istraživanju znatno variraju od 0,54% do 73,06%. Koefficijent ekstrakcije uglavnom zavisi od rastvarača. Najniži prenos teških metala bio je u metanolu 50% crvenog duda za ekstrakciju gvožđa (0,54 %) a najviši u acetonskom ekstraktu belog duda za ekstrakciju cinka (73,06%). Koefficijent ekstrakcije, takođe, zavisi od vrste biljnog materijala koji se ekstrahuje. Koefficijenti ekstrakcije u belom, crvenom i crnom dudu su prikazane na slikama 3.3., 3.4. i 3.5.



Slika 3.3. Koeficijenti ekstrakcije u ekstraktima ploda belog duda.



Slika 3.4 Koeficijenti ekstrakcije u ekstraktima ploda crvenog duda.



Slika 3.5. Koeficijenti ekstrakcije u ekstraktima ploda crnog duda.

Vodeni ekstrakti sve tri vrste duda imali su relativno nizak koeficijent ekstrakcije osim za ekstrakciju cinka u belom dudu (32,74%). Etanol 50% i etanolni ekstrakti pokazali su najmanje koeficijente ekstrakcije. Etanol 50% ekstrakt belog duda pokazao je najveći koeficijent ekstrakcije za ekstrakciju cinka (26,46%). Najniži koeficijent ekstrakcije bio je za ekstrakciju gvožđa (0,65%).

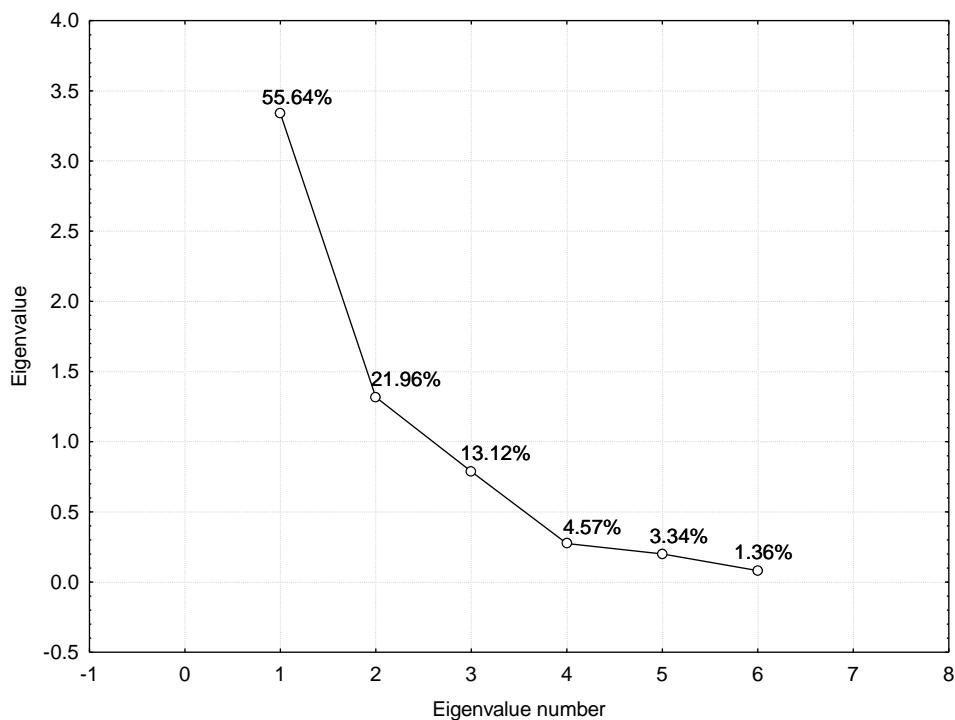
Koeficijent ekstrakcije bio je najveći u acetonskom i aceton 50% ekstraktu sve tri vrste duda. Aceton 50% ekstrakt imao je visok koeficijent ekstrakcije za ekstrakciju cinka u belom dudu i za ekstrakciju gvožđa, mangana, kadmijuma i cinka u crnom dudu. U ostalim ekstraktima, koeficijent ekstrakcije bio je ispod 30%. Acetonski ekstrakt belog duda pokazao je najveći koeficijent ekstrakcije za ekstrakciju cinka (73,09%). Visok koeficijent ekstrakcije (veći od 30%) bio je za ekstrakciju bakra u belom dudu (30,23%), mangana i cinka u crnom dudu (66,67% i 44,12%, respektivno). Metanol 50% ekstrakt belog, crvenog i crnog duda imao je koeficijent ekstrakcije manji od 30% osim za ekstrakciju nikla i cinka u belom dudu (38,89% i 40,81%, respektivno). Takođe, metanol 50% ekstrakt pokazao je najmanji koeficijent ekstrakcije, u odnosu na ostale ekstrakte, za ekstrakciju gvožđa u crvenom dudu. Metanolni ekstrakt pokazao je visok koeficijent ekstrakcije a najviši za ekstrakciju cinka u belom dudu (50,22%).

Iz dobijenih rezultata o koncentracijama teških metala u različitim ekstraktima tri vrste duda može se zaključiti da postoji značajna razlika ($p<0,05$) među ispitivanim uzorcima.

3.4.9. PCA analiza sadržaja metala u ekstraktima crnog, crvenog i belog duda

Da bi se istakao odnos između elemenata korišćena je PCA analiza (analiza glavne komponente).

PCA analiza vrši transformaciju podataka ortogonalnih komponenti koji su linerana kombinacija promenljivih komponenti. Jedan od glavnih ciljeva PCA analize je da identificuje suštinski značajne faktore. Glavne komponente su one koje imaju sopstvenu vrednost (eigenvalues) veću od 1. (Kaiser criterion) (Kaiser, 1960; Cartell, 1996) (slika 3.6.).



Slika 3.6. Sopstvene vrednosti korelace matrice.

To je dovelo do formiranja dve glavne komponente. Prva komponenta je 55,64%, a druga 21,96% od ukupne varijacije podataka. Prve dve komponente čine 77,60% od ukupne varijacije podataka. Prva komponenta predstavlja maksimalnu varijaciju. Faktor opterećenja i udela svakog elementa prikazan je u tabeli 3.33.

Tabela 3.33. Rezultati opterećenja za sve ekstrahovane faktore.

	FAKTOR 1 (PC1)	FAKTOR 2 (PC2)	FAKTOR 3	FAKTOR 4	FAKTOR 5	FAKTOR 6
Fe	-0,8437*	-0,3055	0,1789	0,3599	0,1681	-0,0712
Cu	-0,8088*	-0,4549	-0,5201	0,1033	0,0835	0,1406
Mn	-0,8826*	0,3244	-0,1152	-0,0094	-0,2837	-0,1478
Cd	-0,4338	0,6389*	0,2694	-0,0497	-0,1807	0,1768
Ni	0,2561	0,7558*	0,5811	0,1448	-0,0448	0,0508
Zn	-0,8523*	0,2245	0,2479	-0,3327	0,2233	-0,0335
Sopstvene vrednosti (Eigen-value)	3,34	1,32	0,79	0,27	0,20	0,08
Varijansa (%)	55,64	21,96	13,12	4,57	3,34	1,36
Kumulativno (%)	55,64	77,60	90,73	95,30	98,64	100

*vodeći > 0,5 i < -0,5

Faktori opterećenja elemenata dati u Tabeli 3.33. ukazuju na sličnost i korelaciju između različitih elemenata koji su prisutni u ekstraktima. Elementi sa malim faktorom opterećenja imaju mali uticaj na strukturu rezulatata. Elementi koji imaju visoke faktore opterećenja ukazuju da ti elementi imaju najveći uticaj na grupisanje i separaciju ispitivanih uzoraka (ekstrakata).

Prvi faktor sa vrednošću od 55,64 % varijanse ukazuje da gvožđe, mangan, bakar i cink imaju visoko opterećenje, a nikal i kadmijum nisko opterećenje. Svi elementi sem nikla imaju negativne faktore opterećenja. Negativna korelacija potvrđuje da postoji jak uticaj između glavnih i elemenata u tragovima.

Drugi faktor po značaju je odgovoran za 21,96 % ukupne varijanse. Ne postoje značajni faktori opterećenja za sve elemente, sa izuzetkom nikala i kadmijuma. Taj faktor ima dominantno opterećenje za nikala, što ukazuje da on predstavlja potencijalno antropogeni kontaminant (*Ražić i sar., 2005*).

Korelaciona analiza sadržaja metala u različitim ekstraktima ploda različitih vrsta dada prikazane u Tabeli 3.34.

Korelaciona analiza sadržaja metala u različitim ekstraktima različitih vrsta duda pokazuje jaku korelaciju između dve grupe elemenata. Generalno, interpretacija korelaceione analize vrši se primenom korelacionih koeficijenata većih od 0,5 (*Miller i Miller, 2005*).

Tabela 3.34. Korelacioni matriks za koncentracije elemenata u ispitivanim ekstraktima.

	Fe	Cu	Mn	Cd	Ni	Zn
Fe	1,0000	0,8087*	0,5844*	0,3182	-0,3021	0,6150*
Cu		1,0000	0,7487*	0,1320	-0,0389	0,5118*
Mn			1,0000	0,4608	-0,0439	0,7413*
Cd				1,0000	-0,3845	0,4243
Ni					1,0000	0,0356
Zn						1,0000

*označene su značajne korelacije pri $p < 0,05$

Korelacioni koeficijenti imaju vrednosti od -1 do +1 i ne zavise od jedinica u kojima su izrazene vrednosti merenih parametara. Na osnovu dobijenih rezultat izdvajaju se dve grupe elemenata. Značajna korelacija je utvrđena između sadržaja gvožđa, mangana, bakra i cinka , dok ne postoji značajna korelacija ovih metala sa sadržajem kadmijuma i nikla.

Poređenje naših rezultata u pogledu sadržaja teških metala u plodu duda iz jugoistočne Srbije sa rezultatima drugih autora prikazano je u tabeli 3.35.

Tabela 3.35. Sadržaj mineralnih elemenata u plodu duda sa drugih područja.

(mg/100g)	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Morus rubra</i> L.	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Morus rubra</i> L.	<i>Morus alba</i> L.	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Morus alba</i> L.
	Turska	Turska	Turska	Turska	Turska	Pakistan	Pakistan
Fe	5	5	4,2	4,5	4,2	77,6	73
Cu	-	-	0,4	0,4	0,5	-	-
Mn	7	5	4,2	4,0	3,8	-	-
Ni	-	-	-	-	-	1,6	2,2
Zn	3	3	3,2	3,2	2,8	59,2	50,2
Literatura	<i>Ercisli i sar., 2010</i>	<i>Ercisli i sar., 2010</i>	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>	<i>Ercisli i Orhan, 2007</i>	<i>Imran i sar., 2011</i>	<i>Imran i sar., 2011</i>

Nekoliko radova je prethodno objavilo toksičnih metala u različitim vrstama duda (*Ercisli i Orhan, 2007; Ercisli i sar., 2010; Imran i sar., 2011*). Ove studije su uglavnom bile usmerene na ispitivanje makro-elemenata u plodovima duda kao što su kalijum, kalcijum, magnezijum i natrijum i mikro-elemente kao što su gvožđe, cink i nikal (tabela 3.35.). Sadržaj teških metala u ispitivanim ekstraktima duda se kreće od 3 do 77,6 mg/100g. Najdominantniji elementi bili su gvožđe i cink, najmanje je bilo bakra. Količina mikro-elemenata opada u nizu: gvožđe>cink>nikal. Plod beleg duda iz Turske sadži manje količine teških metala (*Imran i sar., 2011*) u odnosu na rezultate iz ovog rada.

Konačno, ispitivanje sadržaja teških metala u plodovima tri vrste duda iz jugoistočne Srbije i njihovim ekstraktima ukazuje na najveći sadržaj gvožđa (13,8-42,3 mg/100g), dok je sadržaj bakra, cinka i mangana znatno niži i kreće se od 0,9 do 6,2 mg/100g.

U različitim sredinama, mnogi faktori utiču na sadržaj teških metala u zemljištu i biljkama, uključujući industrijalizaciju, gustinu saobraćaja i nepoznate atmosferske depozite. Pošto ispitivani dud iz jugoistočne Srbije sadži najviše gvožđa a najmanje kadmijuma, može se zaključiti da ispitivane vrste duda rastu u nezagađenom području jugoistočne Srbije. Ispitivanje

sadržaja teških metala je obavezno i preporučeno po Evropskim standardima kako bi se sprečilo trovanje teškim metalima.

3.4.10. Uporedni pregled antimikrobne aktivnosti ekstrakata ploda belog, crvenog i crnog duda

U tabeli 3.36. prikazan je uporedni pregled antimikrobne aktivnosti ekstrakata ploda belog, crvenog i crnog duda.

Tabela 3.36. Antimikrobne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda.

	Voda	Metanol 50%	Metanol	Aceton 50%
<i>Salmonella typhimurium</i>	Beli dud	Beli dud Crveni dud	Beli dud Crveni dud Crni dud	Crni dud
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	Crveni dud Crni dud	Crni dud
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	Beli dud Crveni dud Crni dud	Crni dud
<i>Staphylococcus aureus</i>	Beli dud	-	Beli dud Crni dud	Crni dud
<i>Escherichia coli</i>	-	-	Beli dud Crveni dud Crni dud	Crni dud

Iz tabele 3.36. možemo zaključiti da metanolni i aceton 50% ekstrakt ploda crnog duda pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na sve ispitivane bakterije. Metanolni ekstrakt crvenog duda pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na sve ispitivane bakterije osim na *Staphylococcus aureus*, dok metanol 50% ekstrakt ploda crvenog duda pokazuje antimikrobnu aktivnost samo na bakteriju *Salmonella typhimurium*. Vodeni ekstrakt belog duda pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na dve bakterije: *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. Metanol 50% ekstrakt belog duda pokazuje aktivnost u samo u odnosu na bakteriju *Salmonella typhimurium*, dok metanolni ekstrakt crvenog duda pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na sve ispitivane bakterije osim bakterije *Staphylococcus aureus*.

Zaključak

U okviru ove doktorske teze izvršeno je kvantitativno određivanje fenolnih komponenata različitim ekstrakata ploda belog (*Morus alba* L.), crvenog (*Morus rubra* L.) i crnog (*Morus nigra* L.) duda sa područja jugoistočne Srbije, kao i određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata spektrofotometrijskom metodom. AAS metodom određen je sadržaj teških metala u plodu i ekstraktima tri vrste duda. Takođe, određena je i antimikrobna aktivnost ekstrakata. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Ispitivanjem sadžaja ukupnih fenola utvrđeno je da svi ekstrakti imaju visok sadržaj ukupnih fenola. Sadržaj zavisi od polarnosti rastvarača i vrste duda. Najveći sadržaj ukupnih fenola ima crveni dud u rastvaračima velike polarnosti (voda, etanol 50%), crni dud u rastvaračima srednje polarnosti (metanol i aceton 50%) i beli dud u rastvaračima niske polarnosti (etanol i aceton).
- Veći sadržaj ukupnih fenola imaju vodenii, etanolni 50% i etanolni ekstrakti sve tri vrste ploda duda. Najveći sadržaj ukupnih fenola ima etanolni ekstrakt belog duda (432,48 mgGAE/100g), dok je najmanje fenola u metanolnom 50% ekstraktu ploda crnog duda (45,45 mgGAE/100g).
- Svi ispitivani ekstrakti ploda crnog duda (osim vodenog) imaju veći sadržaj flavonoida u odnosu na ekstrakte crvenog i belog duda. Najviše flavonoida ima u metanolnom 50% ekstraktu crnog duda (210,77 mgCE/100g). U svim rastvaračima osim u acetonu i acetonu 50% ekstrakti belog duda imaju najmanji sadržaj flavonoida.
- Nijedan od ispitivanih ekstrakata ploda belog duda nije pokazao sadržaj monomernih antocijana. Pojedini ekstrakti ploda crvenog duda (vodenii, etanolni 50%, acetonski 50% i acetonski) sadrže veoma male količine antocijana. Svi ispitivani ekstrakti ploda crnog duda sadrže znatne količine monomernih antocijana što je i očekivano s obzirom na boju ploda crnog duda koja potiče od prisustva antocijana.
- Određivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata tri vrste duda korišćenjem DPPH metode, utvrđeno je da svi ekstrakti osim vodenog imaju visoku antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti crvenog duda imaju najveću antioksidativnu aktivnost u svim

rastvaračima, dok ekstrakti crnog duda imaju veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata belog duda samo u rastvaračima veće polarnosti (voda i etanol 50%). Antioksidativna aktivnost se kreće od 40,55% u etanolnom ekstraktu crnog duda do 89,41% u acetonskom ekstraktu crvenog duda.

- Korišćenjem ABTS testa za određivanje antioksidativne aktivnosti utvrđeno je da svi ispitivani ekstrakti ploda crvenog duda imaju znatno veće antioksidativne aktivnosti u odnosu na ekstrakte belog i crnog duda. Antioksidativna aktivnost se kreće od 43,32% u etanolnom ekstraktu crnog duda do 89,69% u acetonskom ekstraktu crvenog duda.
- Rezultati dobijeni primenom ovih dveju metoda pokazuju dobro slaganje, što je potvrđeno primenom t i F-testa.
- U ekstraktima belog, crvenog i crnog duda identifikovano je ukupno četiri fenolne kiseline HPLC analizom: hlorogenska, neohlorogenska, kriptohlorogenska i kafena kiselina. Neohlorogenska kiselina je identifikovana u svim ispitivanim ekstraktima belog, crvenog i crnog duda. Kriptohlorogensku kiselinu sadrže svi ekstrakti osim metanolnog ekstrakta crvenog duda. Kafenu i hlorogensku kiselinu sadrže metanolni ekstrakti belog i crvenog duda.
- HPLC analizom, u ispitivanim ekstraktima, potvrđeno je prisustvo sledećih flavonoida: kvercetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, kempferol-3-*O*-rutinozid i kvercetin. Svi ispitivani ekstrakti tri vrste duda sadrže kvercetin-3-*O*-rutinozid i kvercetin-3-*O*-glukozid. Kvercetin-3-*O*-ramnozid sadrže svi ispitivani ekstrakti osim metanolnih ekstrakata belog i crvenog duda. Kvercetin sadrži samo metanolni ekstrakt crnog duda.
- U metanolnom ekstraktu crnog duda određeni su i kvantifikovani antocijani: cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, pelargonidin-3-*O*-glukozid i pelargonidin-3-*O*-rutinozid. U acetonskom ekstraktu crnog duda određeni su svi prethodno pomenuti antocijani osim pelargonidin-3-*O*-glukozida. U metanolnom ekstraktu crvenog duda identifikovan je cijanidin-3-*O*-glukozid. U ekstraktima belog duda nisu identifikovani antocijani.

- Atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom određivan je sadržaj teških metala (Fe, Cu, Mn, Cd, Ni, Zn i Pb) u plodu i ekstraktima tri vrste duda. Plod duda je pokazao najveći sadrzaj Fe i nizak sadržaj toksičnih metala. Voda i vodeno-alkoholni rastvori imaju niske koeficijente ekstrakcije za ispitivane metale. Sadržaj metala je najveći u ekstraktima acetona i acetona 50%.
- Postoji značajna korelacija između sadržaja Fe, Mn, Cu i Zn, a ne postoji značajna korelacija ovih metala sa sadržajem Ni i Cd.
- Generalno, sadržaj metala u plodovima duda i njegovim ekstraktima je u propisanim granicama, pa se mogu koristiti u ishrani i u pripremi pomoćnih farmaceutskih formulacija.
- Ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakata duda na sledeće bakterije: *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Metanolni i aceton 50% ekstrakt crnog duda pokazuju antimikrobnu aktivnost na sve ispitivane bakterije. Metanolni ekstrakt crvenog duda pokazuje antimikrobna svojstva u odnosu na sve ispitivane bakterije osim *Staphylococcus aureus*. *Ekstrakti* metanol 50% ekstrakt crvenog i belog duda pokazuje aktivnost samo na *Salmonella typhimurium*. Nijedan od ispitivanih ekstrakata belog duda ne pokazuje antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakteriju *Pseudomonas aeruginosa*. Metanolni ekstrakt belog duda ima antimikrobnu aktivnost u odnosu na sve ostale ispitivane bakterije. Vodeni ekstrakti belog duda pokazuju aktivnost u odnosu na bakterije *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. Najveću antimikrobnu aktivnost pokazali su metanolni ekstrakti a najmanju vodenii.
- Dobijeni rezultati ukazuju da su sveži plodovi duda i njihovi ekstrakti bogati fenolnim jedinjenjima, imaju visoku antioksidativnu aktivnost, ne sadrže toksične metale, pokazuju antibakterijsku aktivnost te se mogu upotrebiti u ishrani i pripremi pomoćnih farmaceutskih formulacija.

Conclusion

In this doctoral thesis were performed quantitative determination of phenolic compounds in different fruit extracts of white (*Morus alba* L.), red (*Morus nigra* L.) and black mulberry (*Morus nigra* L.) from Southeast region of Serbia, as well as the determination of antioxidant activity of tested extracts using the spectrophotometric methods. The content of heavy metals in the fruit and extracts of three type of mulberries were determined by AAS method. Also, the antimicrobial activity of the tested extracts were determined. On the basis of these results can be derived the following conclusions:

- All of the tested extracts have a high content of total phenols. The content depends on the type of solvent polarity and the type of mulberry. The highest content of the phenols have a red mulberry in a high polarity solvent (water, ethanol 50%), black mulberry in low polarity solvents (methanol and 50% acetone) and white mulberry in low polarity solvents (ethanol and acetone).
- A higher content of total phenols are in water, ethanol and 50% ethanol extracts of all three species of mulberry fruit. The highest content of total phenols shows an ethanol extract of the white mulberry (432.48 mgGAE/100g), while the lowest phenols content is in 50% methanol extract of the fruit of the black mulberry (45.45 mgGAE/100g).
- All of the tested extracts of black mulberry fruit (except water) have a higher content of flavonoids in relation to extracts of red and white mulberry. Most flavonoids have the 50% methanol extract of black mulberry (210.77 mgCE/100g). In all of the solvents, except acetone and acetone 50% extract of white mulberry, is the smallest content of flavonoids.
- The tested extracts of the fruit of the white mulberry has not shown the content of monomeric anthocyanins. Some extracts of the fruit of the red mulberry (water, 50% ethanol, 50% acetone and acetone) contain very small amounts of anthocyanins. All tested extracts of black mulberry fruit contains a substantial amount of monomeric anthocyanins, which was expected, because the color of the fruit of the black mulberry tree comes from the presence of anthocyanins.

- Using the DPPH method for determination of antioxidant activity of tested extracts of three species of mulberry has a high antioxidant activity, except water extracts. Extracts of red mulberry have the highest antioxidant activity in all of the using solvents, while the black mulberry extracts have a higher antioxidant activity than extracts of white mulberry in a solvent with a higher polarity (water and ethanol 50%). The antioxidant activity ranged from 40.55% in the ethanol extract of black mulberry to 89.41% in acetone extract of red mulberry.
- Using the ABTS assay for the determination of antioxidant activity was determined that all the red mulberry fruit extract had significantly higher antioxidant activity compared to extracts of white and black mulberry. The antioxidant activity ranged from 43.32% in the ethanol extract of black mulberry to 89.69% in acetone extract of red mulberry.
- The results obtained by these two methods showed good agreement, which was confirmed by using t and F-test.
- In the extracts of white, red and black mulberry identified the four phenolic acids by HPLC analysis: chlorogenic, 4-caffeoylquinic, 5-caffeoylquinic and caffeic acid. 5-caffeoylquinic acid was identified in all tested extracts of white, red and black mulberry. 4-caffeoylquinic acids contain all the extracts except methanol extract of red mulberry. Caffeic and chlorogenic acid containing methanol extracts of white and red mulberry.
- In the tested extracts, the following flavonoids were confirmed by HPLC analysis: quercetin-3-*O*-rutinoside, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-ramnoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside and quercetin. All of the three tested species of mulberry extracts containing quercetin-3-*O*-rutinoside and quercetin-3-*O*-glucoside. Quercetin-3-*O*-ramnoside containing all tested extracts except methanol extract of white and red mulberry. Quercetin contains only the methanol extract of black mulberry.
- The methanolic extract of black mulberry contains the following anthocyanins: cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-rutinoside, pelargonidin-3-*O*-glucoside and pelargonidin-3-*O*-rutinoside. The acetone extract of black mulberry contains all of these anthocyanins except pelargonidin-3-*O*-glucoside. The methanolic extract of red mulberry contains

cyanidin-3-*O*-glucoside. In the extracts of white mulberry anthocyanins have not been identified.

- The content of heavy metals (Fe, Cu, Mn, Cd, Ni, Zn and Pb) in the fruit and extract of three types of mulberry was determined by atomic absorption spectrophotometry. Mulberry fruit showed the highest content of Fe and a low content of toxic metals. Water and water-alcohol solutions are with low extraction ratios for the investigated metals. The metal content was highest in extracts of acetone and acetone 50%.
- There was a significant correlation between the content of Fe, Mn, Cu and Zn, and there is no significant correlation these metals with the content of Ni and Cd.
- Generally, the metal content in the fruits of mulberry and its extract is within the prescribed limits, and can be used in the diet and in the preparation of pharmaceutical formulations.
- The antimicrobial activity of the extracts of mulberry was tested on the following bacteria: *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Methanol and 50% acetone extract of black mulberry show antimicrobial activity of all tested bacteria. The methanol extract of red mulberry shows antimicrobial activity to all of the tested bacteria except for *Staphylococcus aureus*. Extracts 50% methanol of red and white mulberry showed activity only in *Salmonella typhimurium*. The tested extracts of white mulberry show no antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The methanol extract of white mulberry has antimicrobial activity to all the other bacteria tested. The water extract of white mulberry shows activity to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. The highest antimicrobial activity showed the methanol extracts and the lowest activity was in water.
- The results indicate that the fresh fruits of mulberry and their extracts are rich in phenolic compounds and have a high antioxidant activity. Also, the tested samples did not show a presence of toxic metals, exhibit antibacterial activity and can be used in the diet and preparing pharmaceutical formulations.

LITERATURA

- Acworth I. N., The Handbook of Redox Biochemistry, Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA, **2003**.
- Alissa E.M., Bahijri S.M., Ferns G.A., The controversy surrounding selenium and cardiovascular diseases: a review of the evidence. Medicinal Science Monitor, 9, RA9-18, **2003**.
- Ahmad J., Farooqui A.H., Siddiqui T.O., *Morus nigra*, Hamdard Med. 15, **1985**, 76–78.
- AOAC, Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C. 17th Edition, **2000**.
- Asano N., Oseki K., Tomioka E., Kizu H., Matsui K., N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities, Carb. Res. 259, **1994**, 243–255.
- Ascherio A., Rimm E.B., Hernana M.A., Giovannucci E.L., Kawachi I., Stampfer M.J., Willett W.C., Intake of Potassium, Magnesium, Calcium, and Fiber and Risk of Stroke Among US Men. Circulation, 98, **1998**, 1198-1204.
- Bae S.H., Suh H.J., Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea, LWT - Food Sci. & Technol. 40, **2007**, 955–962.
- Beelman R.B., Roys D.J., Selenium enriched of Pleurotus cornucopiae (Pulet) Rolland and Grifola frondosa (Dicks:Fr) S. F. Gray mushrooms. Int. J. Med. Mushrooms, 8, **2006**, 77-84.
- Bor M., Cevik C., Uslu I., Guneral F., Duzgun, E., Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. Acta Cardiol., 54, **1999**, 271-276.
- Borowska E. J., Mazur B., Kopciuch R., Buszewski B., Polyphenol, Anthocyanin and Resveratrol Mass Fraction and Antioxidant Properties of Cranberry Cultivars, Food Technol. Biotechnol., 47, **2009**, 56-61.
- Brand-Williams W, Cuvelier M. E, Berset C., Use of the radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie, **1995**, 28, 25-30.
- Cattell R.B., The Scree Test for the Number of Factors, Multivar Behav Res, 1, **1996**, 245-276.
- Chen P.N., Chu S.C., Chiou H.L., Kuo W.H., Chiang C.L., Hsieh Y.S., Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line, Cancer Lett. 235, **2006**, 248–259.

- Chu Q., Lin M., Tian H., Ye J., Study on capillary electrophoresis-amperometric detection profiles of different parts of *Morus alba* L., *J. Chomatogr. A* 1116, **2006**, 286–290.
- Chun W., Li X., Yuanchang W., Hu C., Xianzhi H., Determination of total polyphenol content and anti-tyrosinase capacity of mulberry medicine (*Morus nigra* L.) extract, *Afr. J. Biotech.* 10, **2011**, 16175–16180.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-tenth edition, Wayne Pennsylvania, USA, M02-A10, **2009**.
- Codex Stand, Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed, **1995**, 31-32.
- Combs G.F., Clark L.C., Turnbull B.W., An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors*, 14, **2001**, 153-159.
- Darias-Martin J., Lobo-Rodrigo G., Henrnandez-Cordero J., Diaz-Diaz E., Diaz-Romero C., Alcoholic beverages obtained from black mulberry, *Food Technol. Biotechnol.*, 41, **2003**, 173–176.
- Dean J.R., Extraction Techniques in Analytical Sciences, WILEY, **2009**, 49-53.
- Dewick P.M., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Second Edition, John Wiley & Sons, New York, **2002**, pp 121-123.
- Drljača D., Ultrazvučna ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz sedimenta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, **2009**, 30-42.
- Drmić H., Režek Jambrak A., Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, **2010**, 45.
- Du Q., Zheng J., Xu Y., Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity, *J. Food Compos. Anal.*, 21, **2008**, 390–395.
- Du J., He Z.D., Jiang R.W., Ye W.C., Xu H.X., But P.P.H., Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L., *Phytochem.*, 62, **2003**, 1235–1238.
- Duke J.A., Handbook of edible weeds, CRC press Inc, U.S.A., **1992**.
- Duraković S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno- tehnološki inženjering, Zagreb, **1996**.
- Elmacı Y., Altug T., Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra* L.) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data, *J. Sci. Food Agric.* 82, **2002**, 632–635.

- Ercisli S., Orhan E., Chemical composition of white (*Morus alba* L.), red (*Morus rubra* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, Food Chem., 103, **2007**, 1380–1384.
- Ercsli O., Orhan E., Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey, Sci. Hortic., 116, **2008**, 41–46.
- Ercisli S., Tosun M., Duralija B., Voća S., Sengul M., Turad M., Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) mulberry genotypes, Food Technol. Biotech., 48, **2010**, 102–106.
- Everett T.H., New illustrated encyclopedia of gardening, Greystone Press, N. Y., U.S.A., **1960**.
- Facciola S., Cornucopia: a source book of edible plants, Kampong publ., Vista, Calif., U.S.A., **1990**.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, 18, **2002**, 872–879.
- FAO/WHO, “Contaminants,” In: Codex Alimentarius, Vol. XVII, FAO/WHO, Codex Alimentarius Commission, Rome, **1984**.
- Fotakis G., Timbrell J.A., Role of Trace Elements in Cadmium Chloride Uptake in Hepatoma Cell Lines, Toxicol. Lett., 164, **2006**, 97–103.
- Fuhrman B., Volkova N., Suraski A., Aviram M., White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine, J. Agric. Food Chem., 49, **2001**, 3164–3168.
- Fukai T., Kaitou K., Terada S., Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from Morus species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Fitoterapia 76, **2005**, 708–711.
- Galvin C., These de doctorat Enologie-Ampelologie, Universite de Bordeaux II, **1993**.
- Gerasopoulos D., Stavroulakis G., Quality characteristics of four mulberry (*Morus* species) cultivars in the area of Chania, Greece, J. Sci. Food Agric., 73, **1997**, 261–264.
- Green J. M., A principal guide to analytical method validation, Anal. Chem., 68, **1996**, 305A.
- Guisti M. M., Wrolstad R. E., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley and Sons, **2003**.
- Gudžić B., Milenković M., Sibinović P., Đorđević S., Structural characterization of quercetin, Faculty of Technology, Leskovac, Zbornik radova, 13, **2000**, 151–164.

- Gundogdu M., Muradoglu F., Gazioglu Sensoy R.I., Yilmaz H., Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC, Sci. Hortic., 132, **2011**, 37–41.
- Habib G., Mulberry fruit based feed blocks - a key supplement for livestock in mountainous regions, Mt. Res. Dev., 24, **2004**, 106–109.
- Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, Free Radical Res. Com., 9, **1990**, 1–32.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Free radicals in biology and medicine (2nd edn) Clarendon Press, Oxford, **1989**.
- Hamurcu M., Mineral and Heavy Metal Levels of Some Fruits Grown at the Roadsides, Food Chem. Toxicol., 48, **2010**, 1767-1770.
- Hancock W. S., Choloupek R. C., Kirkland J. J. Synder L. R., Temperature as a variable in RP-HPLC separations of peptide and protein sample: I. Optimizing the separation of a growth hormone tryptic digest, J. Chromatogr. A, 686, **1994**, 31-38.
- Hassimotto N.M.A., Genovese M.I., Lajolo F.M., Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brasil, Food Sci. Technol. Int., 13, **2007**, 17–25.
- Hathcock, J.N., Vitamin and Mineral Safety, 2nd Edition, Council for Responsible Nutrition (CRN Press), Washington, **2004**.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, J. Nutr Biochem., 13, **2002**, 572-584.
- Horel J.D., Mon. Weather Rev., 109, **1981**, 2080.
- Horel J.D., J. Clim. Appl. Meteorol., 23, **1984**, 1660.
- Hugo W. B., Bloomfield S. F., Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fentichlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 3. The effect of fentichlor on the metabolic activities of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, J. Appl. Bacteriol., 34, **1971**, 579-591.
- Iacopini P., Baldi M., Starchi P., Sebastiani L., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, J. Food Compos. Anal., 21, **2008**, 589-598.

- IOM, Institute of Medicine, Food Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D. National Academy Press, Washington DC, **1999**.
- Imran M., Khan H., Shah M., Khan R., Khan F., Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species, J. Zhejiang Univ.-Sci. B, 11, **2011**, 973–980.
- Isabelle M., Lan Lee B., Nam Ong C., Liu X., Huang D., Peroxyl radical scavenging capacity, polyphenolics and lipophilic antioxidant profiles of mulberry fruits cultivated on Southern China, J. Agric. Food Chem., 56, **2008**, 9410–9416.
- Ito N., Fukushima S., Hasegawa A., Shibata M., Ogiso T., Carcinogenicity of butylated hydroxy anisole in F344 rats, J. Natl. Cancer Inst., 70, **1983**, 343–347.
- Jabeen S., Shah M.T., Khan S., Hayat M.Q., De- termination of Major and Trace Elements in Ten Impor- tant Folk Therapeutic Plants of Haripur Basin, Pakistan, Pak. J. Med. Plants Res., 4, **2010**, 559-566.
- Jakšić M., Toksične tvari u hrani, Tehnološki fakultet, Tuzla, Bosna i Hercegovina, **2009**.
- Jia Z., Tang T., Wu J., The determination of flavonoids content in mulberry and scavenging effect on superoxide radicals, Food Chem., 64, **1999**, 555-562.
- Johns L., Stevenson V., Fruit for the home and garden, Angus and Robertson, Sydney, Australia, **1985**.
- Kaiser H.F., The Application of Electronic Computers to Factor Analysis, Educ. Psychol Meas., 20, **1960**, 141-151.
- Kalac P., Svoboda L., A review of trace elements concentration in edible mushrooms, Food Chem., 69, **2000**, 273-281.
- Katalinić V., Mošina S. S., Sktroza D., Generalić I., Polyphenolic profile antioxidant properties and antimicrobial activitz og grape skin extract of 14 *Vitis vinifera* vatieties grown in Dalmatia (Croatia), Food Chem., 119, **2010**, 715-723.
- Katsube T., Imawaka N., Kawano Y., Yamazaki Y., Shiwaku K., Yamane Y., Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity, Food Chem., 97, **2006**, 25–31.
- Kazakevich Z., Lobrutto R., *HPLC for Pharmaceutical Scintists*, John Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, **2007**.

- Khan S.A, Profile of Heavy Metals in Selected Medicinal Plants, Pakistan Journal of Weed Science Research, 14, **2008**, 101-110.
- Khalid N., Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra L.*) fresh juice, Pak. J. Bot., 43, **2011**, 91–96.
- Kim T.W., Kwon Y.B., Lee J.H., Yang I.S., A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits, Kor. J. Seric. Sci., 38, **1996**, 100–107.
- Kobrin S.M., Goldfarb S., Magnesium Deficiency, Semin Nephrol., 10, **1999**, 525-535.
- Knekt P., Marniemi J., Teppo L., Heliovaara M., Aromaa A., Is low selenium status a risk factor for lung cancer, Am. J. Epidemiol., 148, **1998**, 975-982.
- Kutlu T., Durmaz G., Ates B., Yilmaz I., Cetin M.S., Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra L.*), Turk. J. Biol., 35, **2011**, 103–110.
- Lachman J., Šulc M., Schilla M., Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine – making process, Food Chem., 103, **2007**, 802-807.
- Leonardth W., Kurktschiev T., Meissner D., Lattke P., Abletshauser C., Weidinger G., Jaross W., Hanefeld M., Effects of fluvastatin therapy on lipids, antioxidants, oxidation of low density lipoproteins and trace metals. Eur. J. Clin. Pharmacol., 53, **1997**, 65-69.
- Lepojević T., Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, **2000**.
- Leposavić G., Patološka fiziologija, Farmaceutski fakultet, Beograd, **2008**.
- Leucuta S., Vlase L., Gocan S., Radu L., Fodorea C., Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, J. Liq. Chromatogr. R. T., 28, **2005**, 3109-3117.
- Lin H.Y., Lai, L.S., Isolation and viscometric characterisation of hydrocolloids from mulberry (*Morus alba L.*) leaves, Food Hydrocolloid., 23, **2009**, 840-848.
- Lin J.Y., Tang C.Y., Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, Food Chem., 101, **2007**, 140–147.
- Liu L.K., Chou F.P., Chen Y.C., Chyan C.S., Ho H.H., Wang C.J., Effects of mulberry (*Morus alba L.*) extracts on lipid homeostasis *in vitro* and *in vivo*, J. Agric. Food Chem., 57, **2009**, 7605–7611.

- Ma C.L., Ao X.Y., Li J., Zhao N., Li N.Y., Chen Y., Determination of 15 Elements in *Ottelia acuminata* by Microwave Digestion and ICP-OES, *J. Food Agric. Environ.*, 11, **2013**, 899-902.
- Marjanović N.J., Jankovitš I.F., Instrumentalne metode analize, Tehnološki fakultet - Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad, **1983**.
- Masilamani S., Qadri S.M.H., Dandin S.B., Mulberry fruits: A potential value-addition enterprise, *Indian Silk.*, 46, **2008**, 12–17.
- Mazimba O., Majinda R.R.T., Motlhanka D., Antioxidant and antibacterial constituents of *Morus nigra*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 5, **2011**, 751–754.
- Memon A.A., Memon N., Luthria L.D., Bhanger I.M., Pitafi A.A., Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus leavigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 60, **2010**, 25–32.
- Milenović D., Razvoj i validacija HPLC metoda za određivanje rezidual aktivnih komponenti farmaceutskih preparata, Doktorska disertacija, PMF, Niš, **2010**.
- Miller J. N., Miller J. C., “Statistics and chemometrics for analytical chemistry,” Pearson Education Limited, London, **2005**.
- Milošević S., Ekstrakcija ginka (*Ginkgo biloba* L.) ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom, doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, **2011**.
- Mitra S., Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, WILEY Interscience, **2003**, 148–154
- Moller J.K.S., Madsen H.L., Aaltonen T., Skibsted L.H., Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants, *Food Chem.*, 64, **1999**, 215-219.
- Naczk M., Shahidi F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 41, **2006**, 1523-1542.
- Naderi G., Asgary S., Sarraf-Zadegan N., Oroojy H., Afshin-Nia F., Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra* L., *Phytother. Res.*, 18, **2004**, 365–369.
- Neve J., Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Risk*, 3, **1996**, 42-47.
- Ohara Z., Peterson T. E., Harrison D. G., Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production, *J. Clin. Invest.*, 91, **1993**, 2546-2551.

- Ordom E.Z., Gomez J.D., Attuone M.A., Isla M.L., Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts, Food Chem., 97, **2006**, 452–458.
- Orhan D. D., Hartevioğlu A., Küpeli E., Yesilada E., *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits, J. Ethnopharmacol., 112, **2007**, 394-400.
- Oteiza, P., Mackenzie, G., Zinc, oxidant-triggered cell signaling and human health, Mol. Aspects Med., 26, **2005**, 245-255.
- Ozcan M., Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey, Food Chem., 84, **2004**, 437-440.
- Ozgen M., Serce S., Kaya K., Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin rich *Morus nigra* L. and *Morus rubra* L. fruits, Sci. Hortic., 119, **2009**, 275–279.
- Parr A.J., Bolwell, G.P., Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, J Sci. Food Agric., 80, **2000**, 985-1012.
- Park K.M., You J.S., Lee H.Y., Baek N.I., Hwang J.K., kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens, J. Ethnopharmacol., 84, **2003**, 181–185.
- Patnaik P., Dean's amalytical chemistry handbook, Mc Graw-Hill companies, **2004**.
- Pawlowska A.M., Oleszek W., Braca A., Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits, J. Agric. Food Chem., 56, **2008**, 3377–3380.
- Pekić B., Miljković D., Hemija i tehnologija kardiotoničnih glikozida, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, **1980**.
- Perez-Gregorio M.R., Reguiero J., Alonso-Gonzales E., Pastrana-Castro L.M., Simal-Gandara J., Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolics levels from mulberries (*Morus nigra* L.), LWT, 40, **2011**, 1793–1801.
- Pietta P.G., Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod., 63, **2000**, 1035-1042.
- Piletić M. V., Milić B. Lj., Đilas S. M., Organska hemija II deo, Prometej, Novi Sad, **1993**.
- Radojković M.M., Zeković Z.P., Vidović S.S., Kocar D.D., Masković P.Z., Free radical scavenging activity, total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts, Hem. Ind., 66, **2012**, 547–552.

- Rastogi K., Mehrotra M., Compendium of Indian medicinal plants, PID, New Delhi, India, **1990**.
- Ražić S., Onjia A., Đogo S., Slavković L., Popović A., Determination of metal content in some herbal drugs-Empirical and chemometric approach, *Talanta*, 67, **2005**, 233-239.
- Raynie D.E., Extraction, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, Academic Press, **2000**, 118.
- Re R., Pellegrin N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Bio. Med.*, 26, **1999**, 1231-1237.
- Riberau-Gayon J., Stonestreet E., Le dosage des anthocyanins dans le Vin rouge, *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 9, **1965**, 2649-2655.
- Risher J., McDonald A.R., Citra M.J., Bosch S., Amata R.J., Toxicological profile for Selenium“, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, **2003**.
- Ruberto G., Randa A., Daquino C., Amico V., Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars, *Food Chem.*, 100, **2007**, 203-210.
- Russo M.W., Murray S.C., Wurzelmann J.L., Woosley J.T., Sandler R.S., Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas, *Cancer*, 28, **1997**, 125-129.
- Sanchez-Moreno J., Larrauri JA, Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines, *J. Agric. Food Chem.*, 79, **1999**, 1301-1304.
- Samaržija D., Antunac N., Važnost dokazivanja prisutnosti antibiotičkih ostataka u mlijeku Mljekarstvo, 52, **2002**, 61-66.
- Saris N.E., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A., Magnesium: an update on physiological, clinical, and analytical aspects, *Clin. Chim. Acta*, 294, **2000**, 1-26.
- Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M.M., Toth-Markus M., Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables, *Food Res. Int.*, 38, **2005**, 1023–1029.
- Shan B., Cai Y-Z., Brooks J., Corke H., The *in vitro* antibacterial activity of dietary species and medicinal herb extracts, *Int. J. Food Microbiol.*, 117, **2007**, 112–119.
- Shamberger R. J., The genotoxicity of selenium, *Mutat. Res.*, 154, **1998**, 29-48.
- Sharma K.R., Agrawal M., Marshall M.F., Heavy Metals in Vegetables Collected from Production and Market Sites of a Tropical Urban Area of India, *Food Chem. Toxicol.*, 47, **2009**, 583- 591.

- Shi H., Noguchi N., Niki E., Introducing natural antioxidants, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England, **2001**, 22-70.
- Shils M.E., Magnesium. U: Modern nutrition in health and disease, 9th Edition, Shils, M.E., Olson J.A., Shike, M., Ross, C.A. (Eds), Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, 169-192.
- Singhal B.K., Dhar A., Khan M.A., Bindroo B.B., Fotedar R.K., Potential economic additions by mulberry fruits in sericulture industry, Plant Hortic. Technol., 9, **2009**, 47–51.
- Singleton V.L., Rossi J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents, Am. J. Enol. Viticult., 16, **1965**, 144–158.
- Sohn H.Y., Son K.H., Kwon C.S., Kang S.S., Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai, Phytomedicine, 11, **2004**, 666–672.
- Stark O., Clinical laboratory analysis, Belgrade, Serbia, **1969**.
- Stinzing F.C., Stinzing A.S., Carle R., Frei B., Wrolstad R.E., Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments, J. Agric. Food Chem., 50, **2002**, 6172–6181.
- Švarc-Gajić J., General Toxicology. Nova Science Publishers, Inc., New York, **2009**.
- Tasić N., Radak Đ., Cvetković Z., Petrović B., Ilijevski N., Djordjević-Debić G., Uloga i značaj oligoelemenata u patogenezi arteroskleroze. Vojnosanitetski pregled, 61, **2004**, 667-673.
- Thabti I., Elfalleh W., Hannachi H., Ferchichi A., Da Graca Campos M., Identification and quantification of phenolics acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS, J. Funct. Foods, 4, **2012**, 367–374.
- Thompson C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267, **1995**, 1456-62.
- Todorović M., Optičke metode instrumentalne analize, Hemijski fakultet, Beograd, **1997**.
- Tolić A., Operacija ekstrakcije tečno-tečno, Novi Sad , Tehnološki fakultet, **1996**.
- Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K., Antioxidant and antimicrobial activites of *Laetiporus Sulphurens* (Bull.) Murrill, Food Chem., 101, **2007**, 267-273.
- Trichopoulos D., Epidemiology of Cancer," In: V. T. De Vita, Ed., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Lippincott Company, Philadelphia, **1997**, 235-239.

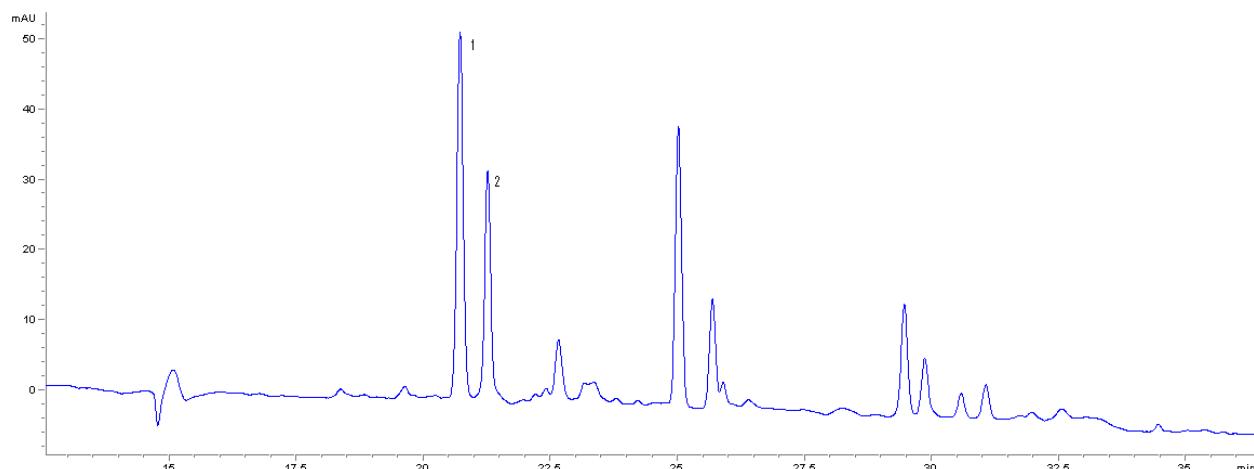
- Veljković D., Vučković G.N., Minerali u ishrani. Hemijski pregled, 51, **2010**, 14-19.
- Vertuani S., Angusti A., Manfredini S., The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, Curr. Pharm. Des., 10, **2004**, 1677–94.
- Villano D., Fernandez-Pachon M. S., Troncoso A. M., Garcia-Parrilla M. C., Influence of enologocal practices on the antioxidant activity of wines. Food Chem., 95, **2006**, 394–404.
- Zadernowski R., Naczk M., Nesterowicz J., Phenolic acid profiles in some small berries, J. Agric. Food Chem., 53, **2005**, 2118–2124.
- Zhang W., He J., Pan Q., Han F., Duan C., Separation and character analysis of anthocyanins from mulberry (*Morus alba* L.) pomace, Czech J. Food Sci., 29, **2011**, 268–276.
- Yang X., Yang L., Zheng H., Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats, Food Chem. Toxicol., 48, **2010**, 2374-2379.
- Wang H., Cao G., Prior R.L., Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanin, J. Agric. Food Chem., 45, **1997**, 304–309.
- WHO, Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials, Revised, Geneva, **2005**.
- World Health Organization, Quality Control Methods for Medicinal Fruit Materials, Geneva, **1998**.

www.crfg.org/pubs/ff/mulberry.html

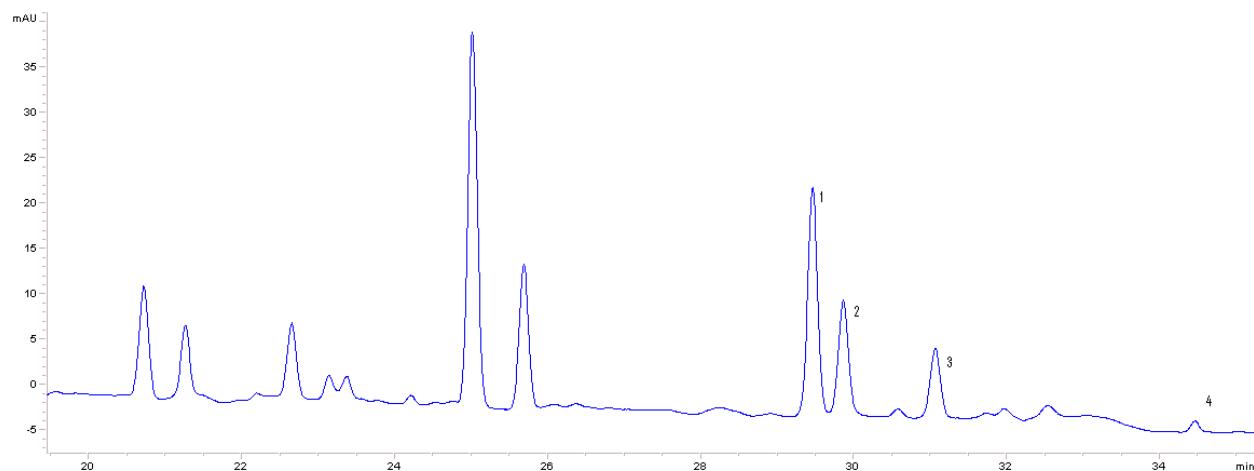
www.eHow.com

www.itmonline.com

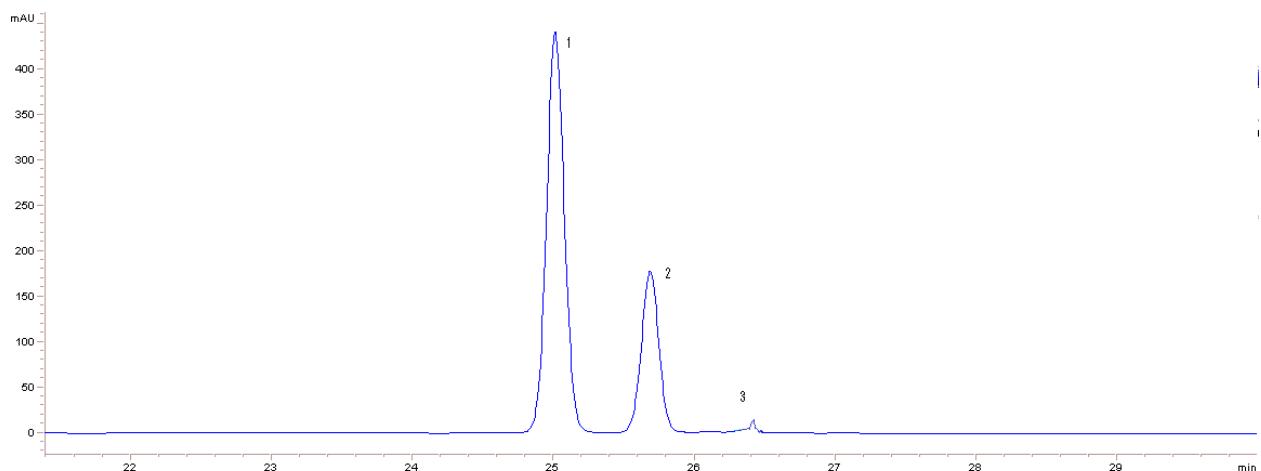
www.tytyga.com

PRILOZI

Prilog 1. HPLC analiza acetonskog ekstrakta crnog duda (*Morus nigra L.*) na 320 nm:
neohlorogenska kiselina (1), kriptohlorogenska kiselina (2).



Prilog 2. HPLC analiza acetonskog ekstrakta ploda crnog duda (*Morus nigra L.*) na 360 nm: kvercetin-3-O-rutinozid (1), kvercetin-3-O-glukozid (2), kvercetin-3-O-ramnozid (3), kvercetin (4).



Prilog 3. HPLC analiza acetonskog ekstrakta ploda crnog duda (*Morus nigra L.*) na 520 nm: cijanidin-3-O-glukozid (1), cijanidin-3-O-rutinozid (2), pelargonidin-3-O-glukozid.

BIOGRAFIJA

Danica S. Dimitrijević rođena je 01.10.1983. godine u Nišu. Srednju medicinsku školu "Dr Milenko Hadžić" završila je 2002. godine u Nišu. Na Odseku za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu diplomirala je 2007. godine. Doktorske studije iz hemije, na Odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, upisala je 2007. godine i položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,37.

Školske 2013/2014. godine bila je angažovana na izvođenju vežbi iz predmeta Hemija primarnih biomolekula na odseku za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Recenzirala radove za naučne časopise: Fruits, Medicinal and Aromatic Plant Research Journal, International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine, British Journal of Pharmaceutical Research, Preparative Biochemistry & Biotechnology.

BIBLIOGRAFIJA

Danica S. Dimitrijević je objavila 6 radova iz doktorske disertacije u časopisima sa SCI liste i 4 saopštenja.

Radovi objavljeni u časopisima sa SCI liste (M22)

1. Danijela A Kostić, Danica S Dimitrijević*, Snežana S Mitić, Milan N Mitić, Gordana S Stojanović, Ana V Živanović. A survey on macro- and micro-elements, phenolic compounds, biological activity and use of *Morus* spp. (*Moraceae*), Fruits, vol 68, issue 4, 333-347, 2013.

Radovi objavljeni u časopisima sa SCI liste (M23)

2. Danijela A Kostić, Danica S Dimitrijević*, Snežana S Mitić, Milan N Mitić, Gordana S Stojanović, Ana V Živanović. Phenolic Content and Antioxidant Activities of *Morus nigra L.* (*Moraceae*) Fruit Extracts from Southeast Serbia. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2013; 12(1): 105-110.
3. Danijela A. Kostić, Danica S. Dimitrijević*, Gordana S. Stojanović, Snežana S. Mitić, Milan N. Mitić. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Fresh Fruit Extracts of Mulberries from Serbia. Oxidation Communication 36, No 1, 4–14 (2013).
4. Danica S. Dimitrijević*, Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanović, Snežana S. Mitić, Milan N. Mitić, Ružica Micić. Polyphenol contents and antioxidant activity of five fresh fruit *Morus* spp. (*Moraceae*) extracts. Agro Food Hi Tech, vol 24(5), 34-37, 2013.
5. Danica S. Dimitrijević*, Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanović, Snežana S. Mitić, Milan N. Mitić, Aleksandra S. Đorđević. Phenolic composition, antioxidant activity, mineral content and antimicrobial activity of fresh fruit extracts of *Morus alba L.* Journal of Food and Nutrition Research, 53, 22-30, 2014.

Radovi objavljeni u časopisima sa SCI liste

6. Ružica J. Micić, Danica S. Dimitrijević*, Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanović, Snežana S. Mitić, Milan N. Mitić, Aleksandra N. Pavlović, Saša S. Randelović. Content of Heavy Metals of Mulberry Fruits and Their Extracts-Correlation Analysis. American Journal of Analytical Chemistry, 4, 674-682, 2013.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja:

1. Dušan Đ. Paunović, Milan N. Mitić, Milan B. Stojković, Branka B. Stojanović, Danica S. Dimitrijević, Phenolic profiles of commercial dark beers from Serbia, XXII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, Book of abstracts BFP-30, September 5-9, 2012, Ohrid, Macedonia.

2. Danica S. Dimitrijević¹, Danijela A. Kostić¹, Gordana S. Stojanović¹, Novica R Ristic², Jasmina M. Veličković¹, Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Acetone Extracts of Mulberries From Serbia, Belgrade Food International Conference , Food, health and well being, P 1.30, 69 Belgrade, 2012
3. Jasmina M. Veličković , Danica S. Dimitrijević, Danijela A. Kostić, Gordana S. Stojanović, Novica R. Ristic, Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit , Belgrade Food International Conference , Food, health and well being, P 1.30, 70 Belgrade, 2012
4. V.Miljkovic, Lj.Nikolic, G.Nikolic, D.Dimitrijevic, S. Randjelovic, Sastav, antioksidativna i antimikrobnna aktivnost ekstrakata belog duda (*Morus Alba*), Book of abstracts 10th simposium Novel technologies nad economic development, st 130, 2013



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
Анализа хемијског састава и антиоксидативне активности
екстраката лула (Morus spp., Moraceae)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, _____

Лектор дисертације:
Даница С. Димитријевић _____

Потпис докторанда:

Даница С. Димитријевић



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме ауторе:

Даница Димитријевић _____

Студијски програм:

Хемија _____

Наставни рад:

Анализа хемијског састава и антиоксидативне активности екстраката дуда
(*Morus spp.*, *Moraceae*) _____

Ментор:

др Данијела Костић _____

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Аутор дисертације:

Даница С. Димитријевић _____

Потпис докторанда:

Д. Димитријевић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигиталнији репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Анализа хемијског састава и антиоксидативне активности екстраката дуда (Morus spp., Moraceae), која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање. Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), а коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Мојимо да појавите само једну од шест популарних лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу,

Аутор дисертације:
Даница С. Димитријевић

Потпис докторанда:

Даница С. Димитријевић