

**UNIVERZITET CRNE GORE  
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**JOVANA SEKULIĆ**

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL CRNOG DUDA (*MORUS  
NIGRA*) I BIJELOG DUDA (*MORUS ALBA*) SA PODRUČJA  
CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2022.**

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**JOVANA SEKULIĆ**

**ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL CRNOG DUDA (*MORUS*  
*NIGRA*) I BIJELOG DUDA (*MORUS ALBA*) SA PODRUČJA  
CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2022.**

## PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Jovana Sekulić

Datum i mjesto rođenja: 10.06.2000. godine; Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Hemijska tehnologija, Metalurško-tehnološki fakultet, UCG, Podgorica, 2020. god.

## INFORMACIJE O MASTER RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Antioksidativni potencijal crnog dudu (*Morus nigra*) i bijelog dudu (*Morus alba*) sa područja Crne Gore.

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

## UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK :

Datum prijave rada: 31.01.2022. god.

Datum prihvatanja teme: 01.04.2022. god.

Mentor: Prof. dr Vesna Vukašinić-Pešić, van. prof. MTF-a

Komisija za ocjenu rada:

1. Prof. dr Nada Blagojević, red. prof. MTF-a, predsjednik
2. Prof. dr Vesna Vukašinić-Pešić, van. prof. MTF-a, mentor
3. Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, red. prof. MTF-a, član

Komisija za odbranu rada:

1. Prof. dr Nada Blagojević, red. prof. MTF-a, predsjednik
2. Prof. dr Vesna Vukašinić-Pešić, van. prof. MTF-a, mentor
3. Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, red. prof. MTF-a, član

Lektor: Autolektura

Datum obrane rada:

## SAŽETAK

U ovom radu određivana su antioksidativna svojstva i sadržaj mikroelemenata plodova duda *Morus alba* i *Morus nigra*, sa područja Crne Gore, Mitrovići. Određivanje antioksidativne aktivnosti je vršeno u soku i tropu, a određivanje mikroelemenata u soku, tropu i ukupnom plodu bijelog i crnog duda. Spektrofotometrijskim metodama je određen sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i tanina, a antioksidativni potencijal je određen DPPH i FRAP testom. Crni dud, *M. nigra* je pokazao veći sadržaj fenolnih jedinjenja (91,1-126,4 mg GAE/100 g), flavonoida (155,93-160,02 mg QE/100 g), antocijana (0,850-0,922 %), tanina (0,41-0,71 %) u odnosu na bijeli dud, *M. alba* (26,91-34,64 mg GAE/100 g; 77,47-91,14 mg QE/100 g; 0,012-0,015 %; 0,235-0,52 %, respektivno). Veću antioksidativnost je pokazao crni dud primjenom DPPH testa (0,293-0,437  $\mu\text{g/ml}$ ) u odnosu na bijeli dud (12,42-19,88  $\mu\text{g/ml}$ ). Takođe, veću antioksidativnu aktivnost mjerenu FRAP testom pokazuju sok (0,113  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) i trop (0,125  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) crnog duda u odnosu na sok (0,0446  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) i trop (0,0392  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) bijelog duda. Zbog značajne nutritivne vrijednosti plodova bijelog i crnog duda neophodno je odrediti i sadržaj mikroelemenata. U ispitivanim uzorcima plodova crnog i bijelog duda određivani su esencijalni (Fe, Cu, Mn, Zn) i toksični elementi (Cd, Pb i Ni) metodom AAS. Najzastupljeniji mikroelement i kod bijelog i kod crnog duda je bio Fe sa koncentracijom od 31,2-35,71 mg/kg i 33,61-42,10 mg/kg, respektivno. Zbog mogućeg prisustva toksičnih elemenata produžen unos može da izazove zdravstvene probleme, te je stoga od velike važnosti kontrola njihovog sadržaja. Prisustvo Pb, Cd i Ni nije detektovano ni u bijelom, ni u crnom dudu. Utvrđen je visok stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i antioksidativne aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama. Najveća korelacija je dobijena između sadržaja antocijana i antioksidativne aktivnosti ( $R^2=0,9952$ ) i flavonoida i antioksidativne aktivnosti ( $R^2=0,9633$ ) određene FRAP metodom.

*Ključne riječi:* *Morus alba*, *Morus nigra*, fenoli, flavonoidi, antocijani, tanini, antioksidativna aktivnost, spektrofotometrijske metode, AAS, DPPH metoda, FRAP metoda, mikroelementi.

## SUMMARY

In this paper, the antioxidant properties and microelement content of *Morus alba* and *Morus nigra* mulberry fruits, from the area of Montenegro, Mitrovići, were determined. Antioxidant activity was determined in the juice and pulp, and microelements were determined in the juice, pulp and total fruit of white and black mulberry. The content of total phenols, flavonoids, anthocyanins and tannins was determined by spectrophotometric methods, and the antioxidant potential was determined by DPPH and FRAP assay. Black mulberry, *M. nigra* showed a higher content of phenolic compounds (91.1-126.4 mg GAE/100 g), flavonoids (155.93-160.02 mg QE/100 g), anthocyanins (0.850-0.922 %) , tannin (0.41-0.71 %) compared to white mulberry, *M. alba* (26.91-34.64 mg GAE/100 g; 77.47-91.14 mg QE/100 g; 0.012- 0.015%; 0.235-0.52%, respectively). Black mulberry showed higher antioxidant activity using the DPPH assay (0.293-0.437 µg/ml) compared to white mulberry (12.42-19.88 µg/ml). Also, the juice (0.113 µmol Fe<sup>2+</sup>/g) and pulp (0.125 µmol Fe<sup>2+</sup>/g) of black mulberry show higher antioxidant activity measured by the FRAP test compared to the juice (0.0446 µmol Fe<sup>2+</sup>/g) and pulp (0.0392 µmol Fe<sup>2+</sup>/g) d) white mulberry. Due to the significant nutritional value of white and black mulberry fruits, it is necessary to determine the content of microelements. In the examined samples of black and white mulberry fruits, essential (Fe, Cu, Mn, Zn) and toxic elements (Cd, Pb and Ni) were determined using the AAS method. The most abundant microelement in both white and black mulberry was Fe with a concentration of 31.2-35.71 mg/kg and 33.61-42.10 mg/kg, respectively. Due to the possible presence of toxic elements, prolonged intake can cause health problems, and therefore it is of great importance to control their content. The presence of Pb, Cd and Ni was not detected in either white or black mulberry. A high degree of correlation of total phenols, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity determined by DPPH and FRAP methods was determined. The highest correlation was obtained between anthocyanin content and antioxidant activity ( $R^2=0.9952$ ) and flavonoids and antioxidant activity ( $R^2=0.9633$ ) determined by the FRAP method.

Key words: *Morus alba*, *Morus nigra*, phenols, flavonoids, anthocyanins, tannins, antioxidant activity, spectrophotometric methods, AAS, DPPH method, FRAP method, microelements.

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	8
2. TEORIJSKI DIO.....	9
2.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE CRNOG I BIJELOG DUDA.....	9
2.2 LJEKOVITA SVOJSTVA DUDA .....	13
2.3 DUD KAO IZVOR FENOLA, FLAVONOIDA, ANTOCIJANA I TANINA .....	15
2.4 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DUDA .....	20
2.5 MAKROELEMENTI I MIKROELEMENTI.....	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	28
3.1 UZORKOVANJE BIJELOG I CRNOG DUDA .....	28
3.2 PRIPREMA UZORAKA BIJELOG I CRNOG DUDA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA MIKROELEMENTATA.....	28
3.2.1 Određivanje sadržaja mikroelemenata atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS).....	28
3.2.2 Određivanje dnevnog unosa elemenata (DMI) bijelog i crnog duda .....	29
3.3 HEMIJSKA ANALIZA SOKA I TROPA BIJELOG I CRNOG DUDA .....	29
3.3.1 Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	29
3.3.2 Određivanje sadržaja flavonoida .....	30
3.3.3 Određivanje sadržaja tanina.....	30
3.3.4 Određivanje sadržaja antocijana.....	31
3.3.5 Određivanje antioksidativnih svojstava soka i tropa bijelog i crnog duda .....	31
3.3.5.1 Određivanje antioksidativnih svojstava primjenom DPPH testa .....	31
3.3.5.2 Određivanje antioksidativnih svojstava primjenom FRAP testa .....	32
3.4 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	33
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	34
4.1 SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA .....	34
4.2 SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA.....	36
4.3 SADRŽAJ UKUPNIH ANTOCIJANA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA.....	38
4.4 SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA .....	40

4.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKA I TROPA BIJELOG I CRNOG DUDA .....	41
4.6 MIKROELEMENTI U ISPITIVANIM UZORCIMA BIJELOG I CRNOG DUDA .....	43
4.6.1 Dnevni unos određivanih elemenata (DMI) bijelog i crnog duda.....	45
4.7 KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, MIKROELEMENTATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA BIJELOG I CRNOG DUDA.....	47
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA .....	50

## 1. UVOD

U posljednje vrijeme raste interesovanje za konzumiranje voća i praksu zdrave ishrane. Dud je posljednjih godina dobio poseban značaj zbog svog fitohemijskog sastava i blagotvornog djelovanja na zdravlje ljudi. Botanički dijelovi *Morus* spp. (plodovi, listovi, grančice, korijenje) smatraju se bogatim izvorom sekundarnih metabolita.

Dud pripada porodici *Moraceae*. Plodovi dudu se uglavnom konzumiraju kao svježe voće, džemovi i sokovi. Sadrže značajne količine biološki aktivnih sastojaka koji bi mogli biti povezani sa nekim potencijalnim farmakološkim aktivnostima koje su korisne za zdravlje. Zbog toga se koriste u tradicionalnoj medicini. Studije su pokazale da je prisustvo bioaktivnih komponenti u plodovima dudu, uključujući alkaloidne i flavonoide, povezano sa antioksidativnom aktivnošću, kao i da plodovi dudu posjeduju nekoliko potencijalnih farmakoloških zdravstvenih koristi, uključujući antiholesterol, anti-gojaznost i hepatoprotektivne efekte koji mogu biti povezani sa prisustvom nekih od ovih bioaktivnih jedinjenja. U poređenju sa drugim bobičastim voćem, postoji manje podataka o bioaktivnim polifenolima iz dudu što otežava njegovu primjenu kao funkcionalnog voća i/ili sastojaka zdrave hrane.

U Crnoj Gori biljka dud se jako malo koristi u ishrani, a još manje je istražena u pogledu ljekovitog djelovanja. Stoga je predmet istraživanja ovog rada plod *Morus nigra* L. i *Morus alba* L. sa teritorije Crne Gore sa željom da se istakne njen višestruki značaj u medicini i prehrambenoj industriji. Utvrđena je antioksidativna aktivnost ove biljke različitim metodama, određen sadržaj fenola, flavonoida, tanina, antocijana i teških metala.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE CRNOG I BIJELOG DUDA

Dud je višegodišnja drvenasta biljka, pripada porodici *Moraceae* i rodu *Morus* porijeklom iz Kine. Postoje 24 vrste *Morusa* i jedna podvrsta, sa najmanje 100 poznatih sorti. Potiče iz Azije a kroz vjekove su nastale brojne vrste, tako da su danas na tržištu dostupne različite vrste i podvrste roda *Morus*. (Mohamed, 2013).

Hibridi duda potiču od tri glavne vrste duda: bijelog duda (*Morus alba*), crvenog duda (*Morus rubra*) i crnog duda (*Morus nigra*). Sva tri različita duda potiču iz različitih dijelova svijeta. Crveni dud je porijeklom iz Sjedinjenih Američkih Država. Bijeli dud, uzgajan za proizvodnju svilene bube, poreklom je iz Kine. Crni dud je poreklom iz Azije (Dimitrijević, 2014).

**Crni dud** (*Morus nigra*) (Slika 1) je cvjetna biljka, ima plodove jedinstvenog ukusnog voćnog, osvježavajućeg i kiselog ukusa. Iako je porijeklom iz zapadne Azije, zbog svojih ukusnih plodova uzgaja se i u Evropi (Kutlu et al., 2011; Ozgen et al., 2009). Stablo crnog duda može da naraste do 9 m. Može da daje plodove stotinama godina. Od svih vrsta duda crni dud ima najukusnije plodove. Listovi crnog duda su deblji i veći od listova bijelog duda, grančice su tvrđe i pupoljci deblji (Dimitrijević, 2014).



Slika 1. Prikaz ploda, lista i stabla crnog duda (*Morus nigra*).

Od svih vrsta duda crni dud je najmanje otporan na hladnoću. Najbolje ga je saditi na dobro dreniranom zemljištu sa rastojanjem od 4,5 m između svakog stabla, pa će godinama davati krupne

sočne plodove (Everett, 1960; Gerasopoulos i Stavroulakis, 1997; Zeng et al., 2015; Facciola, 1990).

**Bijeli dud** (*Morus alba*) (Slika 2) je listopadno drvo koje može narasti do 24 m. Listovi bijelog duda su svjetlozelene boje i mogu biti različitog oblika na istom stablu. Cvjeta od aprila do maja, dva mjeseca prije cvjetanja crnog duda, sa muškim i ženskim cvjetovima na istom stablu ili na različitim stablima. Najotporniji je na hladnoću od sve tri vrste duda. Dobio je ime po boji cvjetova, a ne po boji ploda. Plodovi bijelog duda se koriste od juna do avgusta, liče na kupinu, mogu biti okruglog ili ovalnog oblika, bijelo-ružičaste do ljubičaste boje. Plod bijelog duda je slatkog ukusa, ali mu nedostaje kiselosti (Dimitrijević, 2014).

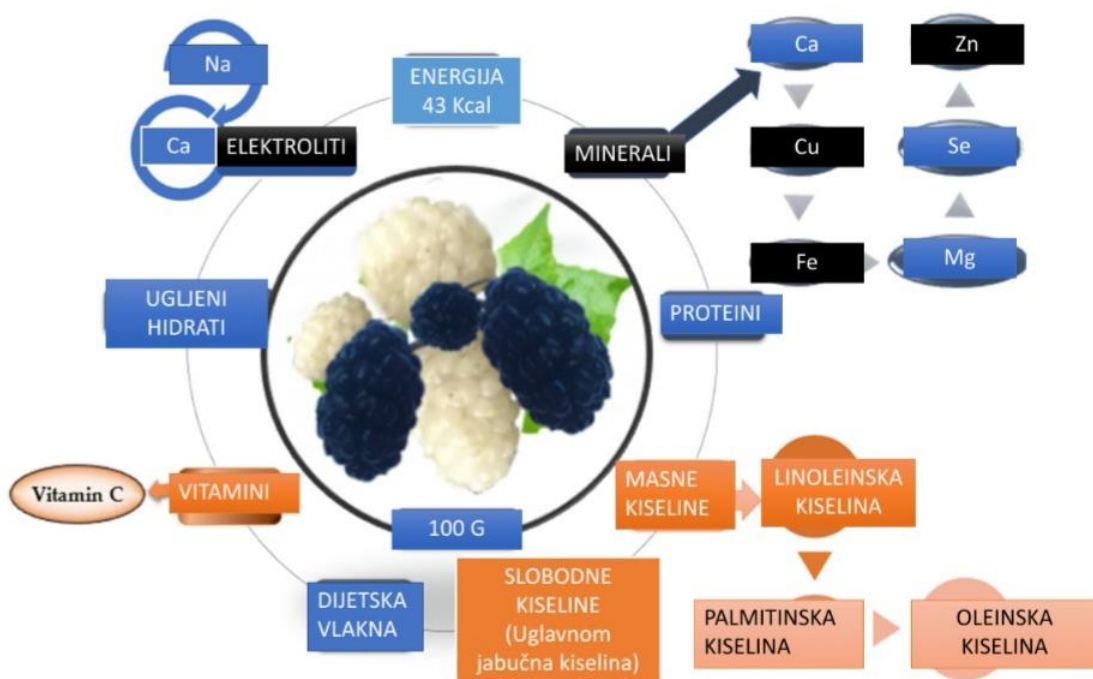


Slika 2. Prikaz ploda, lista i stabla bijelog duda (*Morus alba*).

Azijske zemlje imaju dugu i bogatu istoriju masovnog uzgoja bijelog duda kao ključnog staništa za uzgoj svilene bube, takođe poznatog kao Sang Shen u Kini i Oddi u Koreji (Yuan i Zhao, 2017). Vjeruje se da je prije oko 5000 godina, kineska carica Si Ling-Shi slučajno otkrila da se svilene bube mogu dobiti iz čaure dudovog lista, a tajna ove umjetnosti čuva se u Kini oko 2000 godina (Wei et al., 2018). S druge strane, u Turskoj i Grčkoj dud se više uzgaja za proizvodnju voća nego za proizvodnju lišća (Ercisli i Orhan, 2007).

Za uspješno gajenje duda potrebno je voditi računa o različitim klimatskim uslovima (svjetlo, temperatura, voda, vjetar), ali je najbitniji faktor svjetlost pa se sadi na osunčanim mjestima, a redovi se postavljaju u pravcu istok-zapad. Budući da je dud biljka koja voli svjetlo, za gotovo sve kultivisane sorte potreban period vegetacije je oko 200 dana (Srivastava et al., 2003;

Deshmukh et al., 1993). Na biohemijski sastav ploda mogu uticati različiti faktori, kao što su genotip, vrijeme berbe, uslovi rasta uključujući faktore životne sredine i zemljište (Ali et al., 2021). Na slici 3 je prikazan sadržaj hranljivih komponenti u plodovima dudu. U istraživanjima je navedeno da plod dudu, na 100 g, sadrži 71,5 (*Morus alba*)-72,6 (*Morus nigra*) g H<sub>2</sub>O, 0,96 (*Morus nigra*)-1,5 (*Morus alba*) g proteina, 0,95 (*Morus nigra*)-1,10 (*Morus alba*) g masti, 1,47 (*Morus alba*)-11,75 (*Morus nigra*) g vlakana, 0,5 (*Morus nigra*)-0,57 (*Morus alba*) g pepela, 132-152 mg Ca, 922 (*Morus nigra*)-1668 (*Morus alba*) mg K, 4,2 mg Fe (*Morus alba* i *Morus nigra*), 1,323 (*Morus nigra*)-3,095 (*Morus alba*) mg malinske kiseline i 21,8 (*Morus nigra*)-22,4 (*Morus alba*) mg askorbinske kiseline. (Jan et al., 2021)



Slika 3. Hranljivi sastojci u plodovima dudu (Memete et al., 2022)

Plod i list dudu sadrže mnoge bioaktivne komponente (Vijayan et al., 2004; Hasimoto et al., 2008). Plod dudu je dobar izvor fenolnih jedinjenja, uključujući antocijanine, flavonoide i karotenoide i ima jedinstven i osvežavajući ukus (Gerasopoulos i Stavroulakis, 1997; Ercisli et al., 2007; Ozgen et al., 2009; Okatan et al., 2018; Imran et al., 2010; Kutlu et al., 2011; Gecer et al., 2016). Takođe, plodovi dudu predstavljaju izvor vitamina (C, E, B2) i minerala (K, Ca, Mg, Na, Fe, Zn), što ih čini fiziološki vrijednim (Ercisli i Orhan 2007). Zbog toga se plodovi dudu koriste za efikasno liječenje brojnih bolesti, kao što su dijabetes, hipertenzija, artritis, rak, kardiovaskularne bolesti,

Alchajmerova bolest, anemija i druge bolesti povezane sa hroničnom upalom (Sass-Kiss et al., 2005; Chen et al., 2006; Kim et al., 2010).

Listovi duda su bogati alkaloidima uključujući 1-deoksinojirimicin (DNJ), najmoćniji inhibitor glikozidaze koji smanjuje nivo šećera u krvi (Kimura et al., 2007; Nakagawa et al., 2010).

Dud je višenamjenska biljka, koje se može koristiti u različite svrhe. Pored upotrebe za ljudsku ishranu koristi se i kao stočna hrana, gorivo i za proizvodnju vlakana. Uzgaja se uglavnom u azijskim zemljama zbog lista koji predstavlja jedinu prirodnu hranu za svilenu bubu, a takođe je i jedna od glavnih komponenti industrije svile. Kina i Indija, kao najveći proizvođači svile, uzgajaju različite vrste duda koje su prilagodljive različitim agroklimatskim uslovima. Tu spadaju: *M. alba*, *M. atropurpurea*, *M. bombicis*, *M. indica*, *M. latifolia* i *M. multicalius* (Datta, 2000).

Plodovi duda smatraju se funkcionalnom hranom koja se, kada sazri, može jesti svježa ili suva (Chen et al., 2017; Han et al., 2017). Svježi plodovi su vrlo kvarljivi, uglavnom zbog svoje glatke teksture, velike brzine omekšavanja i disanja, te podložnosti napadima gljivica. Nakon berbe mijenja im se aroma i izgled, povećavaju se procesi razgradnje, a intenzitet sinteze smanjuje, zbog čega se preporučuje optimalan način konzerviranja (Han et al., 2017; Jin et al., 2015). Kako bi se zadovoljili zahtjevi potrošača i osiguralo da proizvodi budu i zdravi i ukusni počeli su se prerađivati u različitim oblicima, kako bi se mogli čuvati i konzumirati na duži rok (Han et al., 2017; Vega et al., 2021). Mnogi istraživači su objavili njegov značaj za ishranu i zdravlje ljudi kao rezultat djelovanja njegovih jedinjenja (Koiuncu 2004; Hassimotto et al., 2007; Ozgen et al., 2009).

Prema dostupnim informacijama, u Crnoj Gori se dud uglavnom gaji u kućnim baštama u vidu pojedinačnih stabala, a rijetko se sadi u voćnjacima. Takođe, nema dostupnih radova o ispitivanju hemijskog sastava i ljekovitog djelovanja duda sa područja Crne Gore. Stoga, zbog blagotvornog dejstva ploda i drugih djelova duda, posebna pažnja se mora posvetiti proširenju uzgoja ove biljne vrste, kao i ispitivanju ovog voća sa biohemijskog aspekta, a sve u cilju promovisanja značaja njegovog korišćenja u prerađivačkoj industriji.

## 2.2 LJEKOVITA SVOJSTVA DUDA

Dud je jedna od važnih tradicionalnih biljaka koja se široko koristi u medicini već više vjekova. Biljni preparati su najstariji i najbogatiji lijekovi u zaštiti zdravlja ljudi, a danas čovjek proučava, testira i vraća povjerenje u prirodne, efikasne lijekove koji su preživjeli nekoliko generacija. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, gotovo osamdeset posto svjetske populacije i dalje koristi komplementarne terapije, od kojih mnoge potiču od biljaka kao što je dud. Bioaktivna jedinjenja u različitim vrstama duda mogu produžiti životni vijek čovjeka (Venkatesh Kumar et al., 2008). Različita farmaceutska svojstva biljke dud razmatraju mnogi naučnici i navode da mnoga biokemijska jedinjenja kao što su moranolin, albufuran, albanol, morusin, kuvanol i hidrosimoricin imaju važnu ulogu u farmaceutskoj industriji (Andallu et al., 2001; Andallu et al., 2003; Singhal et al., 2010).

Dud je odličan izvor kalijuma koji tijelo koristi za stvaranje energije neophodne za napajanje ćelija. Pored toga, elementi u dudu imaju potencijal da zaustave oštećenje ćelija i stimulišu imuni sistem (Doi et al., 2001). Dud se takođe koristi za sprečavanje moždanog udara i srčanih bolesti i za smanjenje znakova starenja zbog svoje uloge u antioksidativnim procesima. Dud može da podstiče proizvodnju tjelesne tečnosti. Sadrži obilje hranljivih elemenata kao što su minerali i vitamini; može liječiti hronične bolesti digestivnog trakta, podstaći lučenje želudačnog soka, ojačati sposobnost varenja i asimilacije, poboljšati apetit i otkloniti nadimanje i zatvor. Dud je veoma pogodan za liječenje hroničnog gastritisa, hepatitisa i Alchajmerove bolesti (Shih et al., 2009; Ha et al., 2012).

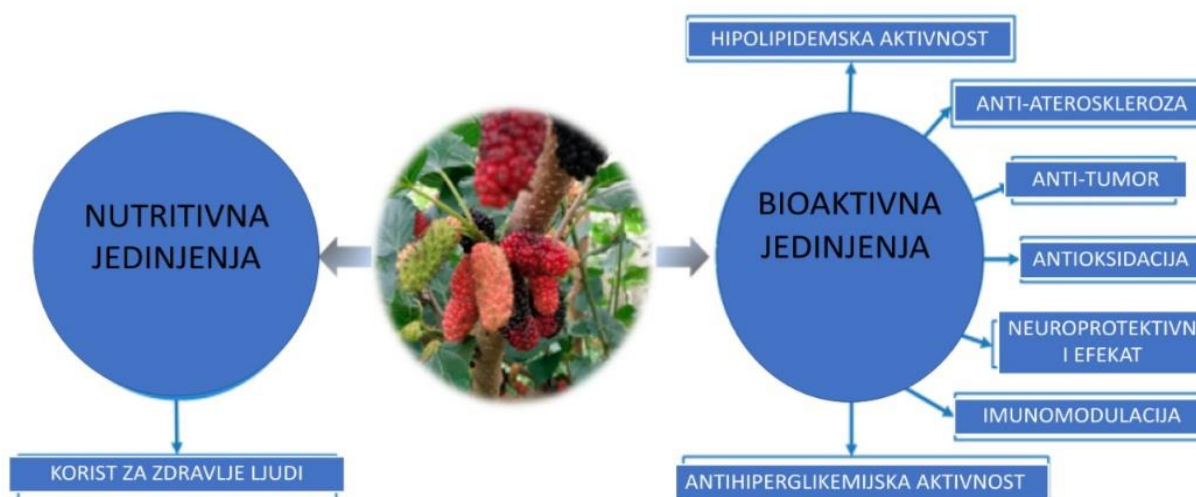
Osim što je hrana, plod duda se hiljadama godina koristi u narodnoj medicini, posebno u Kini, za liječenje upale grla, anemije i upale krajnika (Singh, 1997). Savremena istraživanja su otkrila da je, zbog bogatog sadržaja bioaktivnih polifenola, potvrđeno da plodovi duda posjeduju širok obim bioaktivnosti (Slika 4), kao što je uklanjanje slobodnih radikala (Du et al., 2008; Liang et al., 2012b; Wang i Hu, 2011) i antidijabetički (Wang et al., 2013), neuroprotektivni (Song et al., 2014), antitrombotički (Yamamoto et al., 2006), imunomodulirajući efekat (Lee et al., 2013) i drugi.

Kora korijena duda koristi se u antiinflamatorne, diuretičke i antipiretičke svrhe u orijentalnoj medicini, dok se plodovi duda koriste kao tonik i sedativ (Asano et al., 2001).

Plodovi duda se obično konzumiraju kao svježe voće. Međutim, pošto je dud meko voće koje se brzo kvari više se koriste njegovi proizvodi kao što su: sok (Liu et al., 2004; Singhal et al., 2010;

Wang et al., 2016), džem (Tomas et al., 2016), alkoholna pića (Tang et al., 2008) i pekmez (Sengül, 2005).

Plodovi duda su se u Turskoj u medicini koristili kao sredstvo protiv parazita, kao lijek protiv dizenterije, te kao laksativ, hipoglikemik i ekspektorans (Baytop, 1996). Plod duda je također tradicionalno kinesko jestivo voće koje se efikasno koristi u narodnoj medicini za liječenje groznice, jačanje zglobova, zaštitu jetre od oštećenja, snižavanje krvnog pritiska i olakšavanje izlučivanja mokraće. Nedavno je zauzeo važnu poziciju na lokalnom tržištu bezalkoholnih pića, iako su njegovi biološki i farmakološki efekti još uvijek slabo definisani (Bae i Suh, 2007; Chen, et al., 2005).



Slika 4. Bioaktivne sposobnosti ploda duda (Yuan i Zhao, 2017).

Plodovi crnog duda se također dugo vremena efikasno koriste u narodnoj medicini u Turskoj za liječenje groznice, zaštitu jetre, jačanje zglobova, olakšavanje izlučivanja mokraće i snižavanje krvnog pritiska (Baytop, 1984). Voće tamne boje, posebno bobičasto voće (ribizla, aronija, kupina, borovnica, dud, itd.) prepoznato je da doprinosi ljudskom zdravlju. Osim toga, sve je veći interes za pigmentne komponente ove grupe voća koje mogu poboljšati ljudsko zdravlje ili smanjiti rizik od bolesti (Lin et al., 2007).

Antocijani, koji su efikasno izolovani iz plodova duda, mogli bi se koristiti kao prirodna boja u prehrambenoj industriji (Liu et al., 2004). Prerada, nažalost, može promijeniti oblik polifenola duda i smanjiti njihovu biodostupnost (Cavalcanti et al., 2011). Stoga je potrebno otkriti nove tehnike prerade i skladištenja koji neće uticati na promjenu oblika polifenola (Medina-Torres et al., 2013; Moser et al., 2017).

Neke vrste kao što su *Morus laevigata*, *Morus rubra*, *Morus nigra* i *Morus alba* uzgajaju se zbog svog lišća i plodova koji imaju medicinski značaj. Širok spektar ljekovitih aktivnosti pripisuje se različitim djelovima biljke duda. Na primjer, listovi vrste *Morus alba* se suše i koriste kao čajevi u većini azijskih zemalja (Datta, 2000), a poznato je i njihovo korišćenje za liječenje hiperglikemije, kašlja, hipertenzije, raka i groznice (Kang et al., 2006).

Nedavni naučni dokazi su potvrdili da sušeni prah, vodeni ekstrakt i etanolni ekstrakt lista *M. alba* posjeduju različite biološke aktivnosti, uključujući antidijabetičke, neuroprotektivne, antimikrobne, antioksidativne, antiinflamatorne, antiaterosklerotične i antikancerogene (Sharma et al., 2013). Dud ima moćne hemijske sastojke koji pozitivno utiču na liječenje različitih bolesti kod ljudi. U Indiji ovu biljku od milja zovu „kalpavrukša“ zbog njenog blagotvornog dejstva i prisustva sekundarnih metabolita poput fenola, flavonoida i antocijana koji igraju ključnu ulogu kao čistači za oksidanse prisutne u tijelu (Song et al., 2010). Od posebnog značaja je da su listovi duda korišćeni za liječenje i prevenciju „Xiao-ke“ (sindrom koji se sada može identifikovati kao dijabetes) u kineskoj medicini jer sadrži hemijska jedinjenja koja sprečavaju visok nivo šećera u krvi (hiperglikemiju) nakon obroka bogatog ugljenim hidratima (Miyahara et al., 2004).

### **2.3 DUD KAO IZVOR FENOLA, FLAVONOIDA, ANTOCIJANA I TANINA**

Polifenolna jedinjenja u biljkama su bitna za njihovo antioksidativno djelovanje, pa je važno uraditi kvantitativni test polifenolnog sadržaja u biljkama i povezati ga sa doprinosom njihove antioksidativne aktivnosti (Arfan et al., 2012).

Antocijani su dominantni polifenoli u plodovima duda (Veberić i sar., 2015). Uglavnom su odgovorni za boju plodova duda (Gerasopoulos i Stavroulakis, 1997). Spadaju u antioksidativna i antiinflamatorna jedinjenja i pozitivno utiču na zdravlje ljudi (Nitra et al., 2007). Glavni antocijani u plodovima duda su: cijanidin-3-O-glukozid (C3G), cijanidin-3-O-rutinozid (C3R), pelargonidin-3-O-glukozid i pelargonidin-3-O-rutinozid (Jin et al., 2015). Miljković i sar. su osim ovih

identifikovali u crnom i crvenom dudu i druge vrste antocijana: cijanidin-3-O-arabinozid, peonidin-3-O-arabinozid, delphinidin-3-O-arabinozid, peonidin-3-O-glukozid ili galaktozid ili malvidin-3-O-arabinozid, delphinidin-3-O-glukozid ili galaktozid, petunidin-3-O-glukozid ili galaktozid, malvidin-3-O-glukozid ili galaktozid (Miljković et al., 2015).

Özgen i sar. istraživali su fitohemijski profil i antioksidativna svojstva dvije vrste dudu iz Turske, *M. nigra* i *M. rubra*. Njihova studija je pokazala da *M. nigra* ima veću količinu antocijana, prosječno 571 µg ekvivalenta cijanidin-3-glukozida/g, u poređenju sa *M. rubra* (Özgen et al., 2009).

Ispitivanja su pokazala da je boja ploda dudu povezana sa sadržajem antocijana i da je taj sadržaj znatno veći u crnom dudu (0,57–1,88 mg C3G/g), nego u bijelom dudu (0,01 mg C3G/g) (Sanchez-Salcedo et al., 2015; Ozgen et al., 2009).

Slično, Chen i sar. su otkrili da je sadržaj ukupnih antocijana 5 kineskih sorti dudu manji od 900 µg/g i da nisu primijećeni u bijelim sortama (Chen et al., 2016). U skladu sa vizuelnom promjenom boje, ukupni antocijani se značajno povećavaju kako plodovi sazrijevaju odnosno kada boja prelazi od bijele, preko svijetlo-crvene do crne (Bae i Suh, 2007). Različitost geografskih uslova je takođe doprinijela različitim akumulacijama antocijana (Ercisli i Orhan, 2007; Lee et al., 2004).

Mnoga istraživanja su pokazala da su antocijani moćni antioksidansi koji pripadaju grupi flavonoida, a njihova boja zavisi od strukture i prisustva pigmenta i kiselosti okoline (Bukhari i Kour, 2019; Kim et al., 2020; , Hidalgo i Almajano, 2017; Shebis et al., 2013; Ahlawat et al., 2016; Liu et al., 2020). Generalno, sadržaj bioaktivnih jedinjenja u *M. nigra* je veći u odnosu na *M. alba* . zbog prisustva antocijana (Skender et al., 2019; , Zeng et al., 2016). Kod nekih sorti bijelog dudu otkriveno je prisustvo antocijana (Negro et al., 2019; Kim et al., 2020; , Xiao, et al., 2017), naime sazrijevanje ploda je praćeno promjenom boje od zelene (nezrele) preko bijele do svijetloljubičaste (pri punoj zrelosti) usled akumulacije antocijana. Neka ispitivanja konstatuju odsustvo antocijana u bijelom dudu (Sanchez Salcedo et al., 2015; Krishna et al., 2020).

Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti koji se široko nalaze u voću, uglavnom predstavljeni flavonoidima i fenolnim kiselinama. Sve veće interesovanje za voćem je uglavnom zbog njihovog antioksidativnog potencijala i povezanosti između njihovog konzumiranja i prevencije nekih bolesti. Zdravstvene prednosti ovih fitohemikalija direktno su povezane sa redovnim unosom i njihovom biodostupnošću. Istraživanja su pokazala značaj redovnog konzumiranja voća, posebno za prevenciju bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Charles et al., 2012).



Flavonoidi su hemijski polifenolna sekundarna metabolička jedinjenja koja su odgovorna za boju, aromu cvijeća, za privlačenje oprašivača, klijanje spora, rast i razvoj sadnica (Amalesh et al., 2011). Flavonoidi su strukturno izvedeni iz matičnih supstanci flavona koji se obično nalaze u ćelijskom soku mladih tkiva viših biljaka (Kurian, 2007). U literaturi postoje brojna istraživanja o kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi flavonoida u listovima i plodovima dudu.

Devet flavonoida je izolovano iz listova *Morus alba*, a na osnovu spektroskopske analize i hemijske strukturne analize izvršena je kvalitativna i kvantitativna karakterizacija. Među njima, kvercetin je pokazao značajan efekat uklanjanja radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila i najznačajniji je za antioksidativni potencijal biljke dudu (Butt et al., 2008; Kim et al., 1999; Lee et al., 2008).

Studije navode da su glavni flavonoidi u plodu dudu rutin, morin, kvercetin, miricetin, izokvercetin, maklurin i resveratol koji utiču na bioaktivnost ove biljke (Zhang et al., 2018; Chang et al., 2011). Prisustvo flavonoida u ekstraktima dudu odredilo je njihova antioksidativna svojstva. Ekstrakti dudu mogu pokazati visok antioksidativni potencijal, zbog značajnog sadržaja rutina. Prilikom procjene antioksidativnih svojstava nije važan samo ukupan sadržaj, već je koegzistencija drugih komponenti takođe odgovorna za antioksidativni efekat (Zhishen et al., 1999).

Dud je bogat izvor fenola. Razlike u sadržaju fenola i flavonoida su posljedica genetske derivacije. Prijavljeno je da genotip biljke (Scalzo et al., 2005) i kultivacija (Hakkinen & Torronen, 2000) utiču na ukupan sadržaj fenola i flavonoida u plodu. Obojene supstance imaju tendenciju da se koncentrišu na spoljašnjim ćelijama koštica kod *M. alba*, dok se kod *M. nigra* i *M. rubra* koncentrišu u svim ćelijama koštica. Jasno je da nivoi fenolne kiseline u crvenom i crnom dudu objašnjavaju njihov kiseli, opor ukus. Varijacije fenolnih jedinjenja u plodovima zavise od mnogih faktora, kao što su stepen zrelosti pri berbi, genetske razlike, uslovi životne sredine tokom razvoja ploda, itd. (Zadernovski et al., 2005). U crveno obojenim plodovima koncentracija fenola se povećava u poslednjoj fazi zrenja, zbog maksimalne akumulacije antocijana i flavonola (Bridle & Timberlake, 1978; Gerasopoulos i Stavroulakis, 1997).

Radojković i sar. uporedili su i okarakterisali sadržaj fenola i flavonoida i antioksidativne aktivnosti različitih ekstrakata odabranih vrsta roda *Morus* iz Srbije. Rutin je dominantan flavonoid u ovim vrstama dudu (43,5 mg/100 g za plod *M. alba* i 72,6 mg/100 g za plod *M. nigra*) (Radojković, 2012).

Tanini su glavni polifenolni sekundarni metaboliti. Postoje dvije velike grupe tanina, tj. hidrolizujući i kondenzovani tanini. Široko su zastupljeni u opsegu od 5 do 10 % suvog biljnog materijala (Barbehenn i Constabel, 2011). Nalaze se uglavnom u kori, stabljikama, sjemenu, korijenu, pupoljcima i lišću (Raymond, et al., 2011; Tomak i Gonultas, 2018).

Tanini se od davnina koriste kao efikasne hemikalije za štavljenje životinjskih koža u industriji prerade kože. Oni se, takođe koriste za proizvodnju mastila, proizvodnju lijepkova u industriji drveta, proizvodnju antikorozivnih hemikalija i uklanjanje žive i metil-žive iz rastvora (Chung et al., 1998).

Smatra se da je hrana bogata taninima niske nutritivne vrijednosti. Takođe, pokazalo se da mnogi molekuli tanina smanjuju aktivnost brojnih mutagenih supstanci. Antikarcinogeni i antimutageni potencijali tanina mogu biti povezani sa njihovim antioksidativnim svojstvom, koje je važno u zaštiti ćelijskog oksidativnog oštećenja. Nađeno je da je stvaranje superoksidnih radikala inhibirano taninima i srodnim jedinjenjima (Chung et al., 1998).

U studiji koja je proučavala koncentracije tanina u listu duda dobijene vrijednosti su bile u opsegu od 0,45 do 1,49 g/100 g suve mase (Xiao et al., 2020).

Postoji veliki broj studija koje su objavile polifenolni sastav duda i pokazalo se da on znatno varira u zavisnosti od sorte, tj. klimatskih, zemljišnih, poljoprivrednih i prerađivačkih faktora (Wei et al., 2018; Moise et al., 2018; Ercisli et al., 2010; Heleno et al., 2015).

Iz tabele 1 se može vidjeti da sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u plodovima *M. nigra* varira između 485,5 i 1422 mg GAE/100 g, odnosno 129,2 do 219,12 mg QE/100 g, a u slučaju *M. alba* ukupni fenoli i flavonoidi variraju između 60,4 do 663 mg GAE/100 g i 217 do 370 mg QE/100 g, respektivno.

Chen i sar. izvršili su analizu fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda duda. Određen je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktu ploda duda. Ukupan sadržaj fenola je bio 502,43 mg GAE/100 g, a ukupan sadržaj flavonoida je bio 219,12 mg QE/100 g. U poređenju sa drugim bobičastim voćem kao što su jagoda (Wang & Lin, 2000), kupina (Wang & Lin, 2000), borovnica (Prior et al., 1998) i malina (Gonzales et al., 2000), sadržaj fenolnih jedinjenja u plodovima duda je znatno veći. U ovoj studiji, vrsta i sadržaj antocijana u ekstraktu ploda duda su identifikovani (cijanidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-rutinozid i pelargonidin-3-O-glukozid) i izmjereni (81,36 mg/100 g, 36,05 mg/100 g i 12,46 mg/ 100 g, redom) pomoću HPLC sa odgovarajućim

standardima. Može se zaključiti da je ekstrakt ispitivanog ploda duda bogat fenolnim jedinjenjima, što mu može dati snažno antioksidativno dejstvo (Chen et al., 2017).

Tabela 1. Sadržaj polifenola, antocijana i flavonoida u plodovima duda prema podacima iz literature posljednjih godina (2016–2021).

Vrsta	Ukupni fenoli	Antocijani	Flavonoidi	Referenca
<i>M. nigra</i>	6,93 mgGAE/g	233,77 ± 24,02 µg/g	Nije zabilježeno	(Suttisansanee et al., 2020)
<i>M. nigra</i>	485,5 mgGAE/100 g	206,1 mg C3GE/100 g	Nije zabilježeno	(Negro et al., 2019)
<i>M. nigra</i>	Nije zabilježeno	Nije zabilježeno	20,8703 mg RE/g	(Chen et al., 2016)
<i>M. nigra</i>	502,43mgGAE/100g	81,36 mg C3GE/100 g	219,1mgQE/100g	(Chen et al., 2017)
<i>M. nigra</i>	1422 mg GAE/100 g	Nije zabilježeno	276 mg QE/100 g	(Rodrigues et al., 2019)
<i>M. nigra</i>	3,7 mg GAE/g	11,3–20,3 mg C3GE/g	Nije zabilježeno	(Hooshmand et al., 2021)
<i>M. nigra</i>	6585 mg GAE/kg	Nije zabilježeno	1292 mg QE/kg	(Li et al., 2018)
<i>M. alba</i>	60,4 mg GAE/100 g	289,2 mgC3GE/100 g	Nije zabilježeno	(Negro et al., 2019)
<i>M. alba</i>	181 mg GAE/100 g	Nije zabilježeno	0.0816 mg QE/g	(Rodrigues et al., 2019)
<i>M. alba</i>	663 mg GAE/kg	Nije zabilježeno	217 mg QE/kg	(Li et al., 2018)
<i>M. alba</i>	5,68-40,46mgGAE/g	0,51 - 28,61 mg/g	0,65-3,70mgQE/g	(Kim et al., 2020)
<i>M. alba</i>	534,2 mg GAE/g	15,5 mg C3GE/g	427,6 mg CE/g	(Xiao et al., 2017)

GAE-ekvivalent galne kisline, C3GE- cijanidin-3-glukozidni ekvivalent, RE- rutinski ekvivalenti, QE- kvercetin ekvivalent, CE- katehinski ekvivalenti.

Na sadržaj fenola, flavonoida i antocijana u dudu, pored vrste duda utiče i način ekstrakcije i tip ekstrakcionog sredstva (Kostić et al., 2019). Jedno takvo ispitivanje plodova crnog, crvenog i bijelog duda iz jugoistočne Srbije je pokazalo da sadržaj ukupnih fenola *M. nigra* zavisi od metode ekstrakcije i kreće se od 60,04 do 150,13 mg GAE/100 g i 69,11 do 142,18 mg GAE/100 g za maceraciju i ultrazvučnu ekstrakciju, respektivno. Što se tiče sadržaja flavonoida, *M. rubra* i *M. alba* imaju manji sadržaj flavonoida od *M. nigra*. Ultrazvučna ekstrakcija je bila najefikasnija

metoda izolovanja fenola i flavonoida iz svih ispitivanih uzoraka zbog intenziviranja prenosa mase, jer je prodiranje rastvarača u ćelije duda bilo lakše (Kostić et al., 2019).

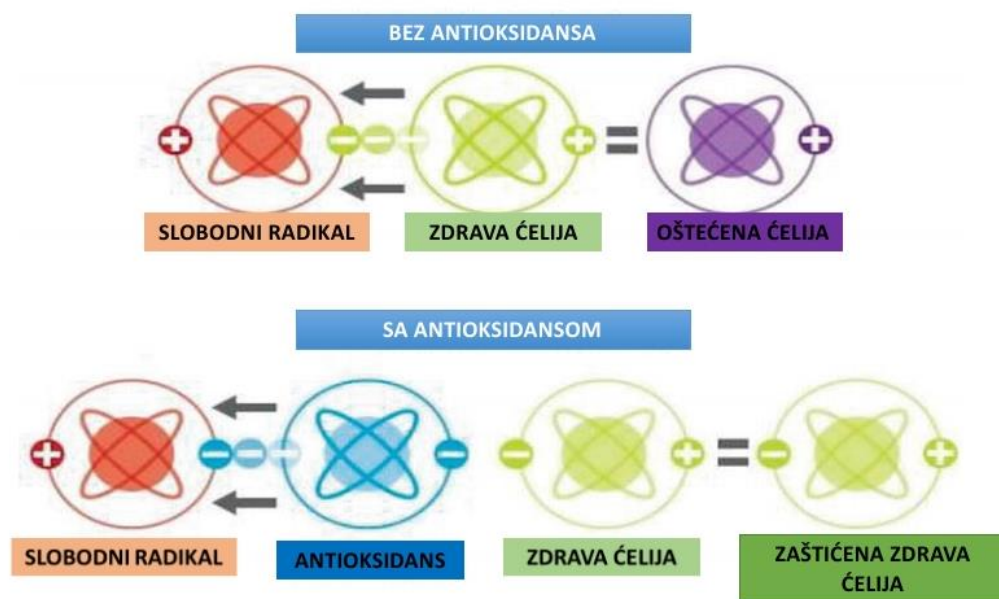
Posljednjih godina, zahvaljujući razvoju analitičkih tehnika za odvajanje i identifikaciju jedinjenja, bilo je moguće identifikovati sastav metabolita duda (Chen et al., 2017; Zorzi et al., 2020; D'Urso et al., 2019). U različitim organima biljke, različitim tehnikama (HPLC; LC-MS-MS; UV-spektroskopija; IR-spektroskopija) detektovani su različiti metaboliti, među kojima su: cijanidin-heksozid (Zorzi et al., 2020; D'Urso et al., 2019), cijanidin-3-O-glukozid (Zelová et al., 2014), cijanidin-3-O-rutinozid (Zelová et al., 2014), pelargonidin-3-O-glukozid (Zelová et al., 2014), rutin (Zelová et al., 2014; Thabti et al., 2012), izokvercetin (Zelová et al., 2014), morin (Zelová et al., 2014), kvercetin (Zelová et al., 2014; Figueredo et al., 2018; Dalmagro et al., 2018), kempferol (Zelová et al., 2014; Figueredo et al., 2018).

## 2.4 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DUDA

Oksidativni stres je neravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanasa u korist radikala. Oksidativni stres može biti posljedica nekoliko faktora životne sredine kao što su izloženost zagađivačima, alkoholu, lijekovima, infekcijama, lošoj ishrani, toksinima, zračenju itd. Visok nivo slobodnih radikala izaziva mnoge biohemijske promjene u organizmima, što doprinosi velikom broju bolesti kao što su dijabetes, ateroskleroza, kardiovaskularne, neurodegenerativne bolesti i rak (Wei et al., 2018; Turan, et al., 2017; Flaczyk et al., 2013; Jiang et al., 2017; Fahimi et al., 2018).

Slobodni radikali su hemijske vrste koje posjeduju nesparene elektrone koji se smatraju fragmentima molekula i generalno su veoma reaktivni. Oni se neprestano proizvode u ćelijama ili slučajnim nusproizvodima metabolizma, kao i u procesu fagocitoze (Ajitha et al., 2001). Potencijalno reaktivni derivati kiseonika, koji se pripisuju kao vrste reaktivnog kiseonika (ROS), su superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikali ( $OH\cdot$ ) i alkoksilni radikali ( $RO\cdot$ ) se stalno stvaraju u malim količinama u biljnim ćelijama (Mehdy, 1994). U normalnim okolnostima, proizvodnja i uništavanje ROS je dobro regulisana u ćelijskom metabolizmu i postoji ravnoteža između generisanih ROS i prisutnih antioksidativnih enzima. Porast koncentracije ROS kulminira oksidativnim stresom (Sreelatha i Padma, 2009). U ovim uslovima, ROS napada vitalne biomolekule i remeti ćelijski metabolizam i na kraju ćelija izaziva sopstvenu smrt.

Biljke stvaraju specifične antioksidativne odbrambene enzime uključujući katalazu, peroksidazu, polifenol oksidazu, askorbat peroksidazu da kontrolišu brzinu formiranja ROS u različitim uslovima stresa okoline (Singhania et al., 2008). Antioksidansi koji se prirodno proizvode u tijelu kao odbrambeni mehanizam za suzbijanje oksidativnog stresa, se nazivaju endogeni antioksidansi i mogu se podijeliti na enzimске i neenzimске (Birben, et al., 2012; Kohen i Niska, 2002). Enzimski antioksidansi su superoksid dismutaza (SOD), glutacion peroksidaza (GPk), katalaza (CAT) i glutacion reduktaza (GRk) (Mates, 2000). Neenzimski antioksidansi su L-arginin, mokraćna kiselina, lipoična kiselina, glutacion, bilirubin. Egzogeni antioksidansi, koji se dobijaju izvan tijela, unose se putem hrane, a to su vitamini, karotenoidi i polifenolna jedinjenja (Galušić, 2020; Kohen i Niska, 2002). S obzirom na to da slobodni radikali povećavaju oksidativni stres u organizmu jako je bitno da se poveća nivo egzogenih antioksidanasa u tijelu i time održi dobar antioksidativni status (Phaniendra et al., 2015; Gulcin 2020; Cavalu i Damian, 2003)



Slika 5. Neutralizacija slobodnog radikala antioksidansom (Noctor i Foyer, 1998).

Antioksidansi su molekuli koji će neutralisati slobodne radikale (Slika 5) tako da je proces oksidacije potisnut ili odložen prihvatanjem elektrona slobodnih radikala ili doniranjem elektrona slobodnim radikalima radi stabilizacije radikala zbog gubitka nesparenog elektrona (Velioglu et al., 1998; Lu et al., 2010). Antioksidansi sprečavaju stvaranje reaktivnih vrsta u organizmu, prekidaju lančanu reakciju slobodnih radikala ili reaktivnih vrsta koristeći katalitičke i

nekatalitičke molekule i na taj način popravljaju oštećene ćelije (Vertuani et al., 2004). Antioksidansi su prisutni u niskim koncentracijama, ali imaju značajnu aktivnost i direktno reaguju na uklanjanje ili stabilizaciju slobodnih radikala, čime sprečavaju neželjene efekte i zaustavljaju oštećenja koja će se desiti od oksidacije supstrata koji se može oksidovati (Kohen i Niska, 2002; Kunvar i Priadarsini, 2011; DeFeudis et al., 2003). Antioksidansi mogu da djeluju kao pojačivači imunološkog sistema jer sprječavaju oksidativni stres koji ima glavnu ulogu u razvoju degenerativnih ili hroničnih bolesti, tako da antioksidansi mogu smanjiti rizik od raka, kardiovaskularnih bolesti, katarakte, dijabetesa i drugih degenerativnih bolesti (Yang et. al., 2016; Ahlawat et. al, 2016; D'Urso, et. al 2019; Cavalu et. al., 2003; Seal i Chaudhuri, 2015; Sevanian i Ursini, 2000; Lian et al., 2008).

Razvijene su različite metode za procjenu in vitro antioksidativnog kapaciteta (Gulcin, 2020). Metode se zasnivaju na sposobnosti uzoraka da uklone radikal sintetičke boje ili da redukuju redoks-aktivno jedinjenje, što se prati spektrofotometrijski. Testovi uklanjanja radikala uključuju metode zasnovane na transferu atoma vodonika (HAT) ili mehanizmima prenosa jednog elektrona (SET) (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Metode zasnovane na HAT-u mjere klasičnu sposobnost antioksidansa da ugasi slobodne radikale doniranjem vodonika. S druge strane, metode zasnovane na SET-u otkrivaju sposobnost potencijalnog antioksidansa da prenese jedan elektron ( $e^-$ ) da redukuje bilo koje jedinjenje, uključujući metale, karbonile i radikale (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Najčešće korištene metode su bazirane na mehanizmu prenosa jednog elektrona, uključujući Folin-Ciocalteu test, ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC, itd. (Gulcin, 2020).

Folin-Ciocalteuov test (FCR) je poznata metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenola. Zasniva se na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa (smješa fosfovolfamove i fosfomolibdenske kiseline) fenolnim jedinjenjima u alkalnim uslovima (Shahidi i Zhong, 2015).

Metoda uklanjanja radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH) je jedna od najčešće korišćenih metoda za procjenu antioksidativne aktivnosti. Kada se rastvor DPPH radikala pomiješa sa molekulom antioksidansa, koji može da donira atom vodonika, dolazi do redukcije ovog radikala, što je praćeno promjenom boje rastvora od ljubičaste do žute (Alam et al. 2013).

FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) test je metoda koja se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da redukuju kompleks gvožđa 2,4,6-tripiridil-s-triazina  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  u intenzivno plavo obojeni kompleks gvožđa  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  u kiseljoj sredini (Benzie i Strain, 1999).

ABTS test se zasniva na oksidaciji ABTS radikala (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) pomoću oksidansa do njegovog radikalskog katjona, ABTS<sup>•+</sup>, koji je intenzivno obojen. Antioksidativni kapacitet se mjeri kao sposobnost testiranih jedinjenja da smanje boju direktno reagujući sa ABTS radikalom.

CUPRAC (Copper(II) reduction capacity) test se zasniva na redukciji Cu<sup>2+</sup> u Cu<sup>+</sup> kombinovanim djelovanjem svih antioksidanasa u vodenom etanolnom medijumu (pH 7,0) u prisustvu neokuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina), čime se dobijaju kompleksi Cu<sup>+</sup> sa maksimalnim apsorpcionim vrhom na 450 nm (Gulcin, 2008).

Procjena antioksidativnog kapaciteta uzorka jednom metodom nije relevantna, stoga bi trebalo provesti nekoliko postupaka kako bi se istražio antioksidativni kapacitet uzorka (Gulcin, 2020).

Predmet proučavanja velikog broja studija bila je antioksidativna aktivnost bijelog i crnog duda različitim metodama (dio istraživanja je naveden u tabeli 2).

Tabela 2. Metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti plodova duda

DPPH	ABTS	ORAC	CUPRAC	FRAP	Metode / Reference
+	+	/	+	+	Tomas et al., 2015
/	+	/	/	+	Özgen et al., 2009
/	+	/	/	/	Calín-Sánchez et al., 2013
/	+	/	/	/	Calín-Sánchez et al., 2013
+	/	/	/	/	Zhang et al., 2008
+	+	/	/	+	Chen et al., 2017

Tomas i sar. su ispitivali antioksidativna svojstva crnog duda iz Turske. Ukupni antioksidativni kapacitet procijenjen je korišćenjem četiri paralelna in vitro testa: ABTS, FRAP, CUPRAC i DPPH. Ukupni antioksidativni kapacitet se kretao od 946 mg TE/100 g (DPPH metoda) do 4046 mg TE/100 g (CUPRAC metoda), (Tomas et al., 2015).

Antioksidativni potencijal crnog i crvenog duda iz Turske ispitivali su Özgen i sar. Antioksidativni potencijal je procijenjen korišćenjem FRAP i ABTS metode. Plodovi *M. nigra* imali su antioksidativni kapacitet od 6,8–14,4 mmol TE/g. Prosječna vrijednost *M. rubra* bila je oko polovine vrijednosti *M. nigra*, prema ABTS metodi. Slične vrijednosti su dobijene i FRAP metodom (Özgen et al., 2009).

U radu Calín-Sánchez i sar. ispitivani su bijeli i crni dud. U oba slučaja, antioksidativni kapacitet je određen korišćenjem ABTS metode. Rezultati su izraženi kao mg Trolox ekvivalenta/100 g.

Prema ovom istraživanju, plodovi *Morus nigra* imali su značajno veći antioksidativni potencijal od plodova *Morus alba* (Calín-Sánchez et al., 2013).

Zhang i sar. ispitivali su antioksidativni potencijal bijelog dudu sa područja Kine, metodom DPPH. Vrijednosti koje su dobili kretale su se od 29,19 - 44,71 mg TE/100 g (Zhang et al., 2008)

U radu Chen i sar. je vršeno određivanje antioksidativnog kapaciteta ekstrakta ploda dudu različitim metodama (DPPH, FRAP i ABTS) (Chen et al., 2017). Rezultat ispitivanja FRAP metodom je pokazao značajan kapacitet redukcije gvožđa (2,54 mg VCE/g), vrijednost dobijena DPPH metodom je 2,45 mg VCE/g, dok je za ABTS test, antioksidativna aktivnost po gramu plodova dudu jednaka 3,69 mg VCE. Rezultati pokazuju da je ABTS radikal bio osjetljiviji od DPPH radikala ili ferijona kada je bio izložen ekstraktu ploda dudu. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je prisustvo različitih fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda dudu doprinijelo njihovom antioksidativnom potencijalu (Dudonne, et al., 2009).

Komparativna studija koja se bavila ispitivanjem antioksidativnog kapaciteta metanolnog ekstrakta i ekstrakta sa acetonom crnog i bijelog dudu pokazala je da crni dud ima veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa bijelim dudom bez obzira na test kojim je vršeno mjerenje (ABTS i DPPH). Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata se kretala od 0,75 mmol Trolox/g (*Morus alba* metanolni ekstrakt) do 1,25 mmol Trolox/g (*Morus nigra* metanolni ekstrakt) i od 0,78 mmol Trolox/g (*Morus alba* ekstrakt sa acetonom) do 1,19 mmol Trolox/g (*Morus nigra* ekstrakt sa acetonom) određena ABTS metodom. Rezultati dobijeni DPPH metodom pokazuju da su acetonski i metanolni ekstrakti *Morus nigra* bili aktivniji čistači od ekstrakata *Morus alba*. Ekstrakti su pokazali vrijednosti IC<sub>50</sub> od 48 (metanolni ekstrakt *Morus nigra*) do 79 µg/mL (metanolni ekstrakt *Morus alba*) i od 58 (acetonski ekstrakt *Morus nigra*) do 66 µg/mL (acetonski ekstrakt *Morus alba*). Generalno, ekstrakti iz plodova *Morus nigra* su pokazali veće ukupne antioksidativne aktivnosti od onih iz plodova *Morus alba* (Arfan et al., 2012).

Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata pet sorti dudu iz Koreje određena je primjenom DPPH testa. Utvrđeno je da su ekstrakti jaki čistači hidroksilnih radikala i superoksidnih anjona (Bae i Suh, 2007).

Različite metode koje se koriste za in vitro ispitivanje kapaciteta antioksidanata u hrani i u biološkim sistemima mogu dati različite rezultate na koje utiče: sastav analiziranog sistema, inhibicija oksidacije odgovarajućeg supstrata, način iniciranja oksidacije, stepen oksidacije i metod kvantifikacije antioksidativne aktivnosti (Frankel i Meyer, 2000). Uticaj sastava



analiziranog sistema na antioksidativnu aktivnost ogleda se kroz polifenolni sastav. Polifenoli koji najviše utiču na antioksidativnu aktivnost, odnosno koji imaju visoku korelaciju sa određenom antioksidativnošću su: acilovani antocijani (Jin et al., 2015), cijanidin-3-glukozid, peralgonidin (Wang et al., 1997), fenolne kiseline (Ercisli et al., 2010).

## 2.5 MAKROELEMENTI I MIKROELEMENTI

Elementi se, obzirom na količinu u kojoj se nalaze u nekom uzorku, dijele na makroelemente (elementi prisutni u velikim količinama) i mikroelemente (elementi prisutni u  $\mu\text{g/g}$ ) (Mutić, 2022). Natrijum, magnezijum, kalijum, kalcijum, hlor i fosfor se smatraju esencijalnim makroelementima jer čine glavne strukturne komponente tijela. Drugi esencijalni elementi se u tijelu nalaze u tragovima i predstavljaju esencijalne mikroelemente, među koje spadaju: bakar, cink, mangan, nikl, gvožđe, kobalt i selen (Mutić, 2022).

Pored esencijalnih mikroelemenata, postoji i grupa toksičnih elemenata gdje spadaju kadmijum, olovo, arsen i živa. Nazvani su toksični jer njihovo prisustvo u tragovima negativno utiče na zdravlje živih bića (Mutić, 2022).

Velike količine teških metala se godišnje ispuštaju u zemljište zbog različitih antropogenih aktivnosti, kao što su rudarstvo, prekomjerna primjena đubriva i navodnjavanje otpadnim vodama u poljoprivredi, što je rezultovalo ozbiljnom kontaminacijom zemljišta širom svijeta (Wang i Bjorn, 2014; Tan et al., 2015). Prisustvo prekomjernih količina teških metala u zemljištu može dovesti do loših uticaja po okolne ekološke sisteme, podzemne vode, zdravlje biljaka, životinja i ljudi (Houben et al., 2013; Nazarian et al., 2016). Voće se lako može kontaminirati teškim metalima u toku uzgoja ili kasnije tokom faze prerade i stoga je određivanje sadržaja akumuliranih teških metala od velike važnosti.

Ljudskom tijelu su potrebni i metalni i nemetalni elementi u određenim granicama za rast i dobro zdravlje. Stoga je određivanje elementarnog sastava u hrani i srodnim proizvodima suštinski važno za razumijevanje njihovog nutritivnog značaja. Shodno tome, prisustvo nekih teških metala u velikim količinama u tijelu može imati toksično dejstvo (Jabeen et al., 2010; Sharma et al., 2009; WHO, 2005). Sadržaj metala je jedan od kriterijuma za korišćenje biljnog materijala u proizvodnji tradicionalnih lijekova i biljnih infuza.

Brza i neorganizovana urbanizacija i industrijalizacija podigli su nivoe teških metala u okruženju zemalja u razvoju (Sharma et al., 2009). Industrijska proizvodnja i upotreba metala i drugi domaći procesi unijeli su značajne količine potencijalno toksičnih metala u atmosferu i u vodeno i kopno okruženje (O'Connell et al., 2008) što može da ima vrlo negativan uticaj na ljude, životinje, mikroorganizme i biljke (Fotakis i Timbrell, 2006). Dakle, kontaminacija voća teškim metalima predstavlja ozbiljnu prijetnju njegovom kvalitetu i ugrožava bezbjednost hrane (Sharma et al., 2009). Olovo i kadmijum su veoma štetni elementi za ljudski organizam (Hamurcu, 2010). Stoga je FAO/SZO utvrdila dozvoljenu maksimalnu granicu za Pb 0,2 mg/kg i za Cd 0,05 mg/kg u bobicama i drugom sitnom voću (Codex Stand, 1995).

Mineralni sadržaj plodova dudu zavisi od vrste, zrelosti ploda i sastava zemljišta i uslova sredine (svjetlost, vlažnost, temperatura, nadmorska visina) (Ercisli et al., 2007; Sánchez-Salcedo et al., 2015; Paunović et al., 2020; Ercisli et al., 2010).

Razvijen korijenov sistem dudu utiče na dobru apsorpciju hranjivih materija iz zemljišta ali takođe i pogoduje apsorpciji različitih metala iz zemljišta (Jiang et al., 2013). Ren i sar. istraživali su efekte različitih koncentracija Pb na rast dudu i kvalitet listova. Rezultat je pokazao da visina biljke ima rastući trend pri nižim koncentracijama Pb ( $\leq 200$  mg/kg suvog zemljišta). Kada su koncentracije Pb u zemljištu bile veće od 200 mg/kg suvog zemljišta rast dudu i kvalitet listova dudu je počeo očigledno da se inhibira (Ren et al., 2009).

Kada je koncentracija Cd u zemljištu bila manja od 22,3 mg/kg, proizvodnja listova dudu bila je veća ili jednaka onoj pri dozvoljenim koncentracijama, dok je koncentracija veća od ove smanjila proizvodnju listova i listovi su pokazali neke toksične simptome (Chen et al., 1996). Wang i sar. su sprovedi eksperiment i izveli zaključke da na rast i proizvodnju listova dudu nije uticalo kada je koncentracija Cd u zemljištu bila manja od 10 mg/kg. Kada su koncentracije Cd u zemljištu bile u opsegu od 20~40 mg/kg, proizvodnja listova dudu je smanjena za 10%~30%. Stablu dudu je prijetila smrt kada je koncentracija Cd dostigla 145 mg/kg (Wang et al., 1998).

Mnoge studije su izučavale sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u plodovima dudu. Istražen je sadržaj minerala u 15 biljaka dudu iz različitih zemalja poput Turske, Pakistana, Koreje, Srbije i Brazila i pokazalo se da plodovi dudu imaju dovoljne količine esencijalnih makroelemenata, kao što su kalijum (K), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg) i natrijum (Na), pri čemu je dominirao K sa koncentracijom 922-1270 mg/100 g voća, a najmanje je bilo Na sa koncentracijom 58-272 mg/100 g voća. Plodovi dudu sadrže mikroelemente kao što su gvožđe (Fe), cink (Zn), mangan (Mn), bakar

(Cu), pri čemu je Fe bilo sa najvećom koncentracijom od 4,2 do 77,6 mg/100 g voća (Imran et al., 2010).

U studiji Ercislija i sar. od deset elemenata, koliko je određivano u plodovima duda sa područja Turske, preovladavao je kalijum. Od mikroelemenata visok sadržaj imalo je gvožđe, i to 4,2 mg/100 g u *M. alba* i *M. nigra* (Ercisli et al., 2007). U drugoj studiji koja je ispitala *M. alba* i *M. nigra* uzgajanih u Španiji makroelemenati K i P se nalaze u velikim količinama, dok je natrijum prisutan u veoma niskoj koncentraciji (0,01 mg/kg). Opsezi izmjerenih vrijednosti gvožđa su bili 28,20 - 46,74 mg/kg i 23,92 - 37,09 mg/kg kod *M. alba* i *M. nigra*, respektivno, što potvrđuje da su obje vrste duda dobar izvor gvožđa (Sánchez-Salcedo et al., 2015).

U crnom dudu, koji se gaji u zapadnoj Srbiji na različitim nadmorskim visinama, utvrđena je najveća količina fosfora i kalijuma, sa značajnom razlikom u zavisnosti od nadmorske visine. Pored toga, autori su pokazali da je crni dud dobar izvor gvožđa, sa najvećim sadržajem (1,95 mg/100 g) pronađenim na 187 m nadmorske visine (Paunović et al., 2020).

U plodovima duda koji se uzgajaju u regionu Ksinjiang u Kini, kalijum je bio dominantan makronutrijent, a zatim kalcijum i magnezijum. Takođe, primijećen je visok sadržaj Fe u ruskom dudu i crnom dudu iz Kine (11,4–11,9 mg/100 g) (Jiang et al., 2015).

Micić i sar. su ispitali metale u crnom, crvenom i bijelom plodu duda iz regiona jugoistočne Srbije. U plodovima duda je potvrđen sadržaj različitih metala. Sve vrste duda sadržale su u plodu najveći sadržaj gvožđa i najmanji sadržaj Cd. Nivo gvožđa u svim ispitivanim vrstama voća kretao se između 23,06 - 57,38 mg/100 g. Koncentracioni opseg kadmijuma za ispitivane plodove je bio od 1,77 do 2,46 µg/100 g u plodovima *Morus nigra* i *Morus alba*, respektivno (Micić et al., 2013). Pokazano je da sadržaj metala opada sledećim redosledom u plodu bijelog duda: Fe > Mn > Zn > Cu > Ni > Pb > Cd, u plodu crvenog duda: Fe > Zn > Mn > Cu > Ni > Pb > Cd i u plodu crnog duda: Fe > Zn > Cu > Mn > Ni > Pb > Cd. Pored toga, analiza ekstrakata duda je pokazala značajan transfer teških metala tokom postupka ekstrakcije, pa su odgovarajući koeficijenti ekstrakcije dostigli vrijednosti do 73,09 % (Micić et al., 2013).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1 UZORKOVANJE BIJELOG I CRNOG DUDA**

Bijeli i crni dud korišćeni u ovom istraživanju potiču iz centralnog dijela Crne Gore, selo Mitrovići, gornja Zeta. Dud cvjeta u maju, a sazrijeva u junu. Za ova istraživanja plodovi bijelog i crnog duda su ubrani u julu 2021. godine.

Sakupljeni biljni uzorci su nakon procesa cijedenja podijeljeni na sok ( $S_c$ ) i trop ( $T_c$ ) crnog duda (*Morus nigra*), i sok ( $S_b$ ) i trop ( $T_b$ ) bijelog duda (*Morus alba*). Uzorci su zatim zamrznuti i čuvani do dalje analize.

#### **3.2 PRIPREMA UZORAKA BIJELOG I CRNOG DUDA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA MIKROELEMENATA**

##### **3.2.1 Određivanje sadržaja mikroelemenata atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS)**

Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) je jedna od najčešće korišćenih instrumentalnih metoda za analizu metala i nekih metaloida. Kod ove metode se vrši mjerenje broja nepobuđenih atoma. Zato se atomska apsorpciona spektroskopija može definisati kao metoda koja se koristi za određivanje koncentracije nekog elementa u uzorku, mjerenjem smanjenja intenziteta monohromatskog zračenja pri prolasku kroz atomsku paru koja je nastala od uzorka, na talasnoj dužini koja je specifična i karakteristična za svaki element. Lakoća i brzina kojom se precizna i tačna određivanja mogu izvršiti ovom tehnikom učinili su atomsku apsorpcionu spektrometriju jednom od najpopularnijih metoda za određivanje veoma niskih koncentracija metala (Beaty i Kerber, 1997).

Uzorci za AAS su pripremani tako što je odmjereno oko 2 g soka, tropa i cjelokupnog ploda bijelog i crnog duda. U odmjerene uzorke je dodato po 28 ml 65%  $HNO_3$  i 4 ml 30%  $H_2O_2$ . Uzorci su zatim upareni do zapremine od 16 ml, nakon čega su kvantitativno prenešeni u normalne sudove od 100 ml i dopunjeni destilovanom vodom do crte.

Određivanja mikroelemenata u ispitivanim uzorcima bijelog i crnog duda izvršena su na atomskom apsorpcionom spektrometru Perkin Elmer PinAAcle 900T.

### 3.2.2 Određivanje dnevnog unosa elemenata (DMI) bijelog i crnog duda

Procjenu doprinosa dnevnog unosa esencijalnih mikroelemenata prilikom konzumiranja ispitivanog bijelog i crnog duda korišćenjem porcije od 300 g svježih plodova po obroku, izračunata je na osnovu jednačine:

$$DMI = \frac{C \times 100}{RDA}$$

gdje je:

RDA - preporučene dnevne potrebe elemenata prema direktivi Evropske unije (EEC) ([European Economic Community-EEC, 2008](#)),

C - sadržaj mikroelementa (mg) u 300 g obroka.

Takođe, može se izvesti zaključak o unosu toksičnih elemenata i na osnovu toga procijeniti mogući rizik po zdravlje konzumenata. Dnevni unos (DI, %) Cd, Pb i Ni je računat na osnovu jednačine:

$$DI = \frac{C \times 100}{MDI}$$

gdje je:

MDI -maksimalni dnevni unos koji se može tolerisati (EFSA – European Food Safety Authority) ([European Food Safety Authority, 2012](#), [European Food Safety Authority, 2010](#), [European Food Safety Authority, 2015](#)).

### 3.3 HEMIJSKA ANALIZA SOKA I TROPA BIJELOG I CRNOG DUDA

Određivanja bioaktivnih komponenti u ispitivanim uzorcima bijelog i crnog duda izvršena su na spektrofotometru Buck Scientific 105 UV-VIS spectrophotometer.

#### 3.3.1 Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Folin-Ciocalteu metoda je dobro poznata metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, koja je korišćena u ovom radu. Zasniva se na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa

fenolnim jedinjenjima uzorka u alkalnim uslovima. Uzorci su pripremljeni tako što je uzeto po 1 ml soka odn. 1 g tropa ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda  $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$  i pomiješani sa 0,5 ml Folin Ciocalteu reagensa (razblažen deset puta), zatim je u smješu dodato 2,5 ml 7,5 %  $Na_2CO_3$ . Nakon stajanja na tamnom mjestu 120 min, apsorbancija pripremljenih rastvora je izmjerena na talasnoj dužini od  $\lambda=740$  nm. Za konstrukciju kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora galne kiseline (5 do 35 mg/ml). Srednja vrijednost rezultata tri nezavisna mjerenja je izražena kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po 100 g biljne sirovine (mg GAE/100 g).

### 3.3.2 Određivanje sadržaja flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida određen je tako što se pomiješa 1 ml (1 g) ispitivanog uzorka ( $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$ ) crnog i bijelog duda sa 3 ml dejonizovane vode i 0,3 ml  $NaNO_2$ . Nakon stajanja od pet minuta na sobnoj temperaturi dodato je 3 ml 1 %  $AlCl_3$  i 2 ml 1M  $NaOH$ . Uzorci su zatim prenijeti u normalne sudove od 10 ml i dopunjeni do crte dejonizovanom vodom. Izmjerena je apsorbancija na talasnoj dužini od 415 nm. Kalibraciona kriva je zatim konstruisana korišćenjem serije standardnih rastvora kvercetina (početne koncentracije 1 mg/l). Srednji rezultati tri nezavisna mjerenja izraženi su u miligramima kvercetina po 100 g biljne sirovine (mg QE/100 g).

### 3.3.3 Određivanje sadržaja tanina

Metoda koja je korišćena, u ovom radu, za određivanje tanina opisana je u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. ([Council of Europe, 2016](#)). Sadržaj tanina je izračunat na osnovu razlike u apsorbanci ukupnih polifenola ( $A_1$ ) dobijenih nakon tretiranja uzoraka ( $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$ ) fosfomolbdovolframovim reagensom u alkalnom medijumu i polifenola koji se ne adsorbuju na kožni prah ( $A_2$ ). Apsorbancije su izmjerene na talasnoj dužini od 760 nm.

Sadržaj tanina, izražen kao procenat pirogalola, izračunat je uz pomoć formule:

$$\frac{62,5 (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je:

$m_1$  - masa ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda ( $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$ ) u gramima,

$m_2$  -masa pirogalola u gramima,

$A_3$  – apsorbanacija pirogalola

### 3.3.4 Određivanje sadržaja antocijana

Nakon procesa hidrolize ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda ( $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$ ) ukupan sadržaj antocijana je određen smješom MeOH/HCl. Ova metoda je opisana u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. ([Council of Europe, 2016](#)). Intezitet apsorbanacije je izmjeren na talasnoj dužini od 528 nm.

Procenat antocijana, izražen preko cijanidin-3-glukozid hlorida, izračunat je prema formuli:

$$\frac{Ax 5000}{718 \times m}$$

gdje je:

A - apsorbanacija na 528 nm,

m - masa ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda ( $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$ ).

### 3.3.5 Određivanje antioksidativnih svojstava soka i tropa bijelog i crnog duda

#### 3.3.5.1 Određivanje antioksidativnih svojstava primjenom DPPH testa

DPPH metoda je jedna od najčešće korišćenih metoda za procjenu antioksidativne aktivnosti. U testu, radikal se neutrališe prihvatanjem ili atoma vodonika ili elektrona iz antioksidativne vrste (ili redukcionih agenasa) tokom čega se na kraju procesa pretvara u redukovani oblik (DPPH ili DPPH-H). Mjerenja se vrše na talasnoj dužini od 517 nm. Rezultati se obrađuju ili kao ekvivalent standardne reference (Trolox, galna kiselina, askorbinska kiselina) ili kao  $IC_{50}$  ([Bibi Sadeer et al., 2020](#)).

Uzorci za DPPH metodu su pripremljeni tako što se u 300  $\mu$ l etanolnih rastvora ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda ( $S_c$ ,  $T_c$ ,  $S_b$ ,  $T_b$ ) koncentracija 42,46 mg/ml, 490,25 mg/ml, 44,33 mg/ml, 764,12 mg/ml za  $S_c$ ,  $S_b$ ,  $T_c$ ,  $T_b$ , respektivno, doda po 2,7 ml 0,1 mM etanolnog rastvora DPPH. Apсорbancija navedenih smješa je izmjerena nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi, na

talasnoj dužini od 517 nm, uz etanol kao slijepu probu. Procenat inhibicije DPPH izračunat je prema sledećoj formuli (Blois, 1958):

$$\% = 100 - \left[ (A_S - A_B) \times \frac{100}{A_C} \right]$$

gdje je:

$A_S$  - apsorbanacija etanolnih rastvora uzoraka bijelog i crnog duda ( $S_c$ ,  $S_b$ ,  $T_c$ ,  $T_b$ ) prethodno tretiranih DPPH rastvorom,

$A_B$  - apsorbanacija etanolnih rastvora uzoraka bijelog i crnog duda ( $S_c$ ,  $S_b$ ,  $T_c$ ,  $T_b$ ) bez prethodnog tretiranja DPPH rastvorom,

$A_C$  - apsorbanacija etanolnog rastvora DPPH.

$IC_{50}$  vrijednosti predstavljaju koncentraciju uzorka koja dovodi do neutralizacije 50% DPPH radikala (Fausto Rivero-Cruz et al, 2020).

### 3.3.5.2 Određivanje antioksidativnih svojstava primjenom FRAP testa

Pomoću FRAP metode se određuje antioksidativni potencijal u uzorcima redukcijom feri gvožđa ( $Fe^{3+}$ ) u fero gvožđe ( $Fe^{2+}$ ) antioksidansima prisutnim u uzorcima. Nakon redukcije feri gvožđa, razvija se plava boja koja se očitava spektrofotometrijski na 593 nm. Redoks potencijal Fe(III) je približno 0,70V, što čini ovaj test manje specifičnim. To je zato što, ako je bilo koja vrsta prisutna u reakcionoj smješi i ako ima redoks potencijal manji od Fe(III) (<0,70 V), ta vrsta će biti odgovorna za redukciju  $[Fe(TPTZ)_2]^{3+}$  (Bibi Sadeer et al., 2020).

Uzorci su pripremljeni tako što se u 100  $\mu$ l etanolnih rastvora ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda odgovarajućih koncentracija 45,10 mg/ml, 45,25 mg/ml, 42,72 mg/ml, 47,86 mg/ml za  $S_c$ ,  $S_b$ ,  $T_c$ ,  $T_b$ , respektivno, doda 3,0 ml svježe pripremljenog FRAP reagensa (25 ml 300 mmol/l acetatnog pufera, pH vrijednosti 3,6; 2,5 ml 10 mmol/l rastvora TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) u 40 mM rastvoru HCl i 2,5 ml 20 mmol/l rastvora  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ). ApSORBANCIJA je izmjerena nakon stajanja uzoraka 30 min na temperaturi od 37 °C na talasnoj dužini od 593 nm. Slijepa proba je smješa istih sastojaka sa 100  $\mu$ l etanola umjesto etanolnog rastvora analiziranog uzorka.

Za konstrukciju kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora gvožđa u koncentracionom opsegu od 100 do 1000 mmol/l pravljenom od  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  u FRAP reagensu.



Rezultati su izraženi kao milimolovi  $\text{Fe}^{2+}$  jona po gramu biljne sirovine ( $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) (Benzie i Strain, 1999).

### **3.4 STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Za statističku obradu rezultata, za određivanje parametara deskriptivne statistike (srednja vrijednost i devijacija) pri određivanju mikroelemenata u bijelom i crnom dudu, korišćen je NCSS statistički softver ([www.ncss.com](http://www.ncss.com)), a pomoću programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) vršena je statistička analiza hemijskog profila i antioksidativne aktivnosti bijelog i crnog duda.

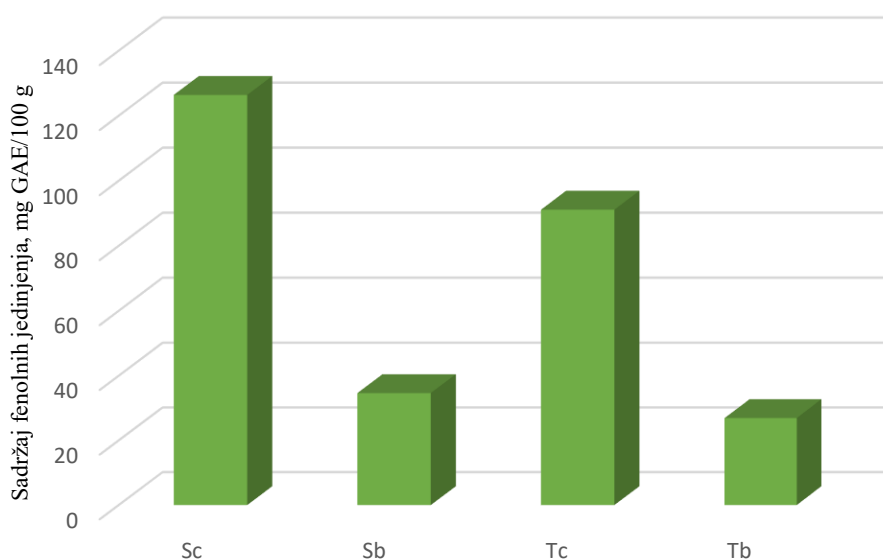
## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA

Biljna fenolna jedinjenja su jedna od glavnih grupa fitomolekula čiji sadržaj utiče na različita terapeutska dejstva ljekovitih biljaka, boju i ukus plodova itd. (Harborne et al., 1999). Brojna istraživanja su usmjerena na njihovo određivanje, odnosno na njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu ( Wei et al., 2018; Turan et al., 2017; Moise et al., 2018; Sánchez-Salcedo et al., 2015; Ercisli et al., 2010; Zoofishan et al., 2018; Heleno et al., 2015)

Na slici 6 su predstavljeni rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola dobijenih ispitivanjem soka i tropa bijelog i crnog duda iz sela Mitrovići.

Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola predstavljena je na slici 7.

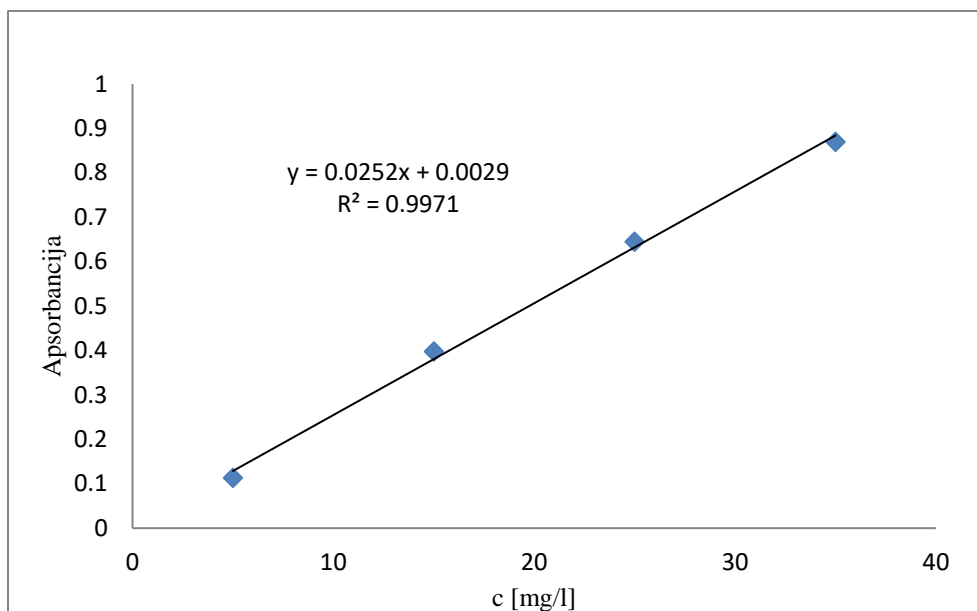


Slika 6. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorcima soka i tropa bijelog i crnog duda

Sadržaj ukupnih fenola dobijen u soku bijelog duda iznosio je 34,64 mg GAE/100 g, a u tropu 26,91 mg GAE/100 g, dok je sadržaj ukupnih fenola u soku crnog duda bio 126,4 mg GAE/100 g, a u tropu ove biljke iznosio je 91,1 mg GAE/100 g. Dobijeni rezultati su pokazali da sok (S<sub>c</sub>) i trop (T<sub>c</sub>) crnog duda imaju veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na sok (S<sub>b</sub>) i trop (T<sub>b</sub>) bijelog duda. Takođe, veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja zabilježen je u soku (S<sub>c</sub> i S<sub>b</sub>) nego u tropu (T<sub>c</sub> i T<sub>b</sub>) kod obje vrste duda.

Slični rezultati su dobijeni proučavanjem šest genotipova crnog duda i osam genotipova bijelog duda sa područja Bosne i Hercegovine i to kod genotipova crnog duda, ukupan sadržaj fenola se kretao od 16,06 mg GAE/100 g do 101,33 mg GAE/100 g, dok je kod genotipova bijelog duda sadržaj fenola bio u opsegu od 6,26 mg do 50,00 mg GAE/100 mg (Skender et al., 2019).

Iako su plodovi duda dobar izvor fenolnih jedinjenja i rezultati svih istraživanja pokazuju da analizirano voće ima visok sadržaj ukupnih fenola, ove vrijednosti značajno variraju u različitim istraživanjima. Sadržaj ukupnih fenola u plodovima osam tajlandskih genotipova duda se kretao od 104,8 do 213,5 mg GAE/100 g (Butkhup et al., 2013), za dudove ubrane na različitim turskim lokalitetima od 158,4 do 249 mg GAE/100 g i od 100,5 do 348,0 mg GAE/100 mg, (Ercisli et al., 2010; Özgen et al., 2009), i u dudu gajenom u Španiji od 76,7 do 180 mg GAE/100 g (Calin-Sanchez et al., 2013). Međutim, podaci koje su objavili Imran i sar. (Imran et al., 2010) i Ercisli i sar. (Ercisli et al 2008) pokazuju da je sadržaj ukupnih fenola u plodovima sakupljenim u sjevernom regionu Pakistana i u sjeveroistočnoj Anadoliji (Turska) bio veoma visok, u rasponu od 880 do 1650 mg GAE/100 g i od 1943 do 2237 mg GAE/100 g, respektivno. Ova velika varijabilnost u sadržaju ukupnih fenola se objašnjava ne samo različitim vrstama genotipa duda, već i uslovima rasta i uzgoja (Sývacý et al., 2004). Poznato je, takođe, da biljka može da akumulira fenolna jedinjenja pod različitim stresnim uslovima (toplota, UV svetlost, napad patogena itd.); odnosno, klimatske promene u vidu variranja od niske do visoke temperature mogu izazvati stres i podstaći proizvodnju fenolnih jedinjenja (Nozolino et al., 1990; Christie et al., 1994; Dixon et al., 1995).



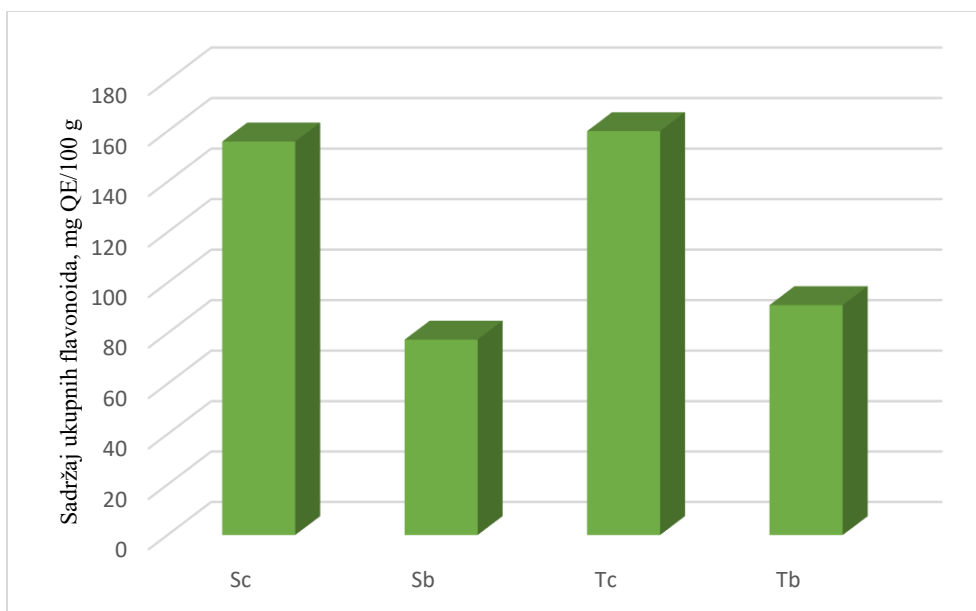
Slika 7. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola

#### 4.2 SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA

Flavonoidi, grupa prirodnih supstanci sa promenljivom fenolnom strukturom, nalaze se u voću, povrću, kori, korijenu, stabljikama, čaju i vinu. Poznato je njihovo blagotvorno dejstvo na zdravlje i zato se radi njihovo izolovanje. Flavonoidi se danas smatraju nezamjenljivim komponentama u različitim nutricionističkim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim primjenama, a sve zbog njihovih antioksidativnih, anti-inflamatornih, anti-mutagenih i anti-kancerogenih svojstava, kao i zbog činjenice da imaju kapacitet da modifikuju ključne funkcije ćelijskih enzima (Panche et al., 2016).

Na slici 8 su predstavljeni rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoida dobijenih ispitivanjem soka i tropa bijelog i crnog duda iz sela Mitrovići.

Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida predstavljena je na slici 9.



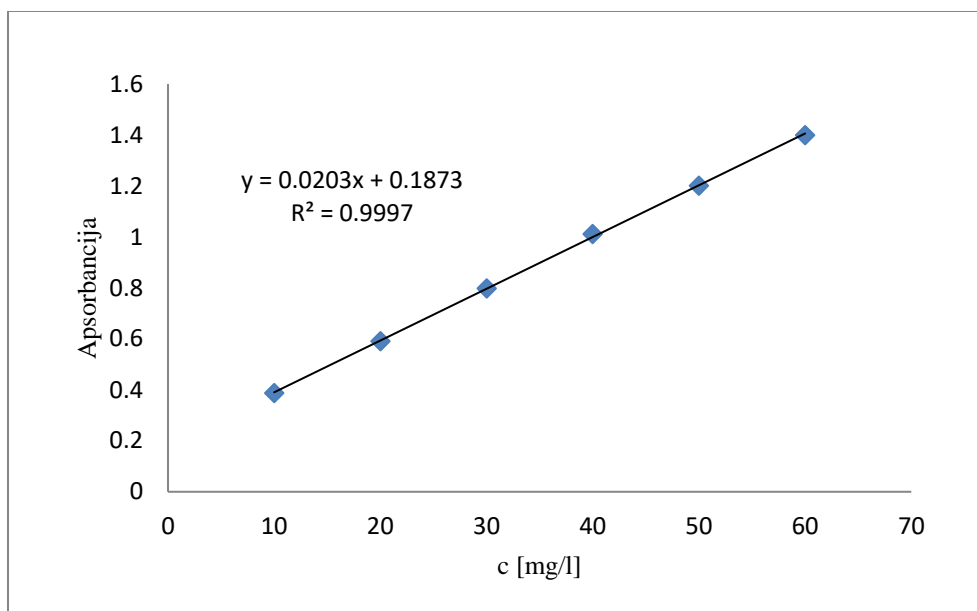
Slika 8. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima soka i tropa bijelog i crnog duda

Dobijeni sadržaj ukupnih flavonoida u soku bijelog duda bio je 77,47 mg QE/100 g, dok je u tropu bijelog duda iznosio 91,14 mg QE/100. Što se tiče crnog duda, sadržaj ukupnih flavonoida u soku je iznosio 155,93 mg QE/100 g, a u tropu 160,02 mg QE/100 g. Slične ili nešto veće vrijednosti ukupnih flavonoida u plodu crnog duda su objavljeni i od strane drugih autora. Naime, Ercisli i Orhan, su u uzorcima crnog duda pronašli znatno veći sadržaj ukupnih flavonoida (276 mg QE/100 g), u odnosu na uzorke bijelog duda (29 mg QE/100 g) (Ercisli & Orhan, 2007).

Nešto manji sadržaj ukupnih flavonoida objavio je Erden ispitivajući crni dud (125,86 mg QE/g), što ukazuje da je uticaj karakteristika predjela (svijetlost, temperatura, prisustvo hranljivih materija u zemljištu i nadmorska visina) od znatne važnosti za raspodjelu flavonoida (Erden, 2021; Shen et al., 2022).

Posmatrajući dobijene rezultate ispitivanja duda iz Mitrovića uočava se da sok i trop crnog duda imaju znatno veći sadržaj flavonoida, nego sok i trop bijelog duda. Sadržaj polifenola se postepeno povećava tokom završnog perioda sazrijevanja u plodovima duda (Gerasopoulos i Stavroulakis, 1997) tako da na sadržaj ukupnih flavonoida ima uticaj i period berbe ispitivanih uzoraka.

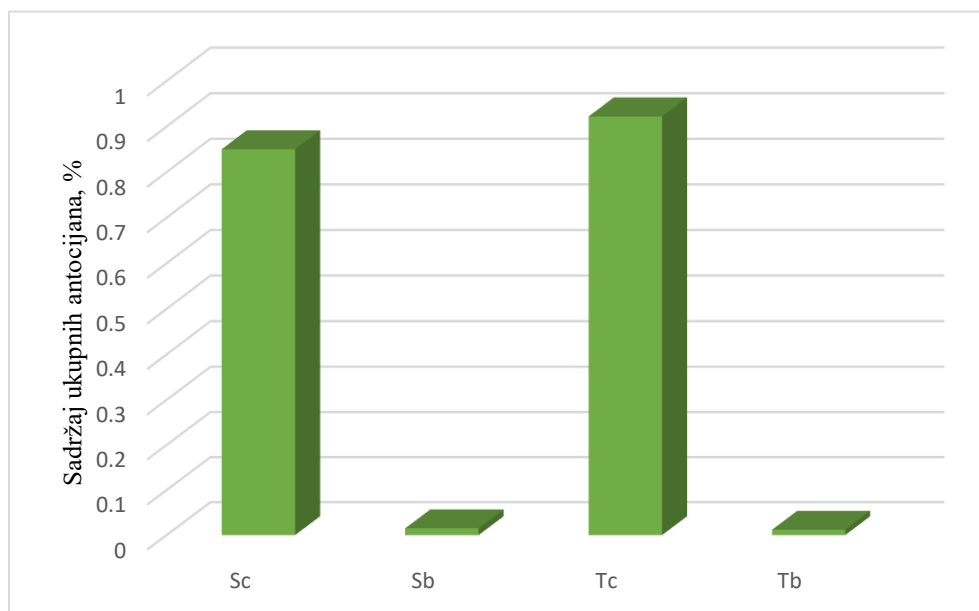
Takođe, prethodne studije su pokazale da je voće tamne boje dobar izvor flavonoida (Cieslik, Greda i Adamus, 2006; Song et al., 2009; Pantelidis et al., 2007), što bi moglo objasniti manje sadržaje flavonoida u plodovima bijelog duda.



Slika 9. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

#### 4.3 SADRŽAJ UKUPNIH ANTOCIJANA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA

Antocijani su jedinjenja iz grupe flavonoida koja uzrokuju crvenu, plavu i ljubičastu boju mnogih biljaka (Araceli Castañeda-Ovando, et al., 2009). Najzastupljeniji antocijanin u dudu je cijanidin-3-glukozid (C3G), koji predstavlja 53,94–78,23 % ukupnih antocijana; cijanidin-3-rutinozid (C3R) čini 19–43,83 % i pelargonidin-3-glukozid (P3G) blizu 5 % (Ştefănuţ et al., 2011; Kamiloglu et al., 2013; Stefanut et al., 2013; Hassimotto et al., 2016; Bao et al., 2016; Qin et al., 2010). S obzirom na veliki uticaj antocijana na ukupnu antioksidativnu aktivnost, poslednjih godina je porasla zainteresovanost za ispitivanje ovih jedinjenja (Jin et al., 2015).



Slika 10. Sadržaj ukupnih antocijana u uzorcima soka i tropa bijelog i crnog dudu

Procentni sadržaj ukupnih antocijana dobijen istraživanjem bijelog i crnog dudu iz Mitrovića predstavljen je na slici 10. U soku bijelog dudu iznosio je 0,015 %, u tropu 0,012 %, dok je u soku crnog dudu iznosio 0,850 %, a u tropu 0,922 %. Detaljnim pregledom literature nisu pronađena istraživanja čije rezultate je moguće porediti sa dobijenim rezultatima.

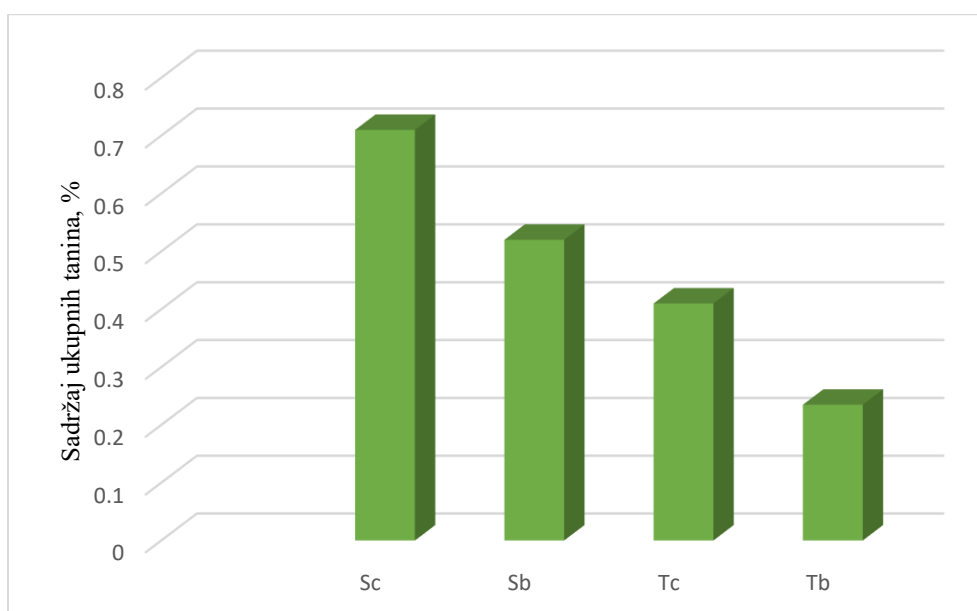
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 10 uočava se da je procentni sadržaj ukupnih antocijana veći u tropu ( $T_b$  i  $T_c$ ) nego u soku ( $S_b$  i  $S_c$ ) i kod bijelog i kod i crnog dudu. Sadržaj antocijana u soku i tropu crnog dudu je znatno veći nego u soku i tropu bijelog dudu. Generalno, sadržaj bioaktivnih jedinjenja u *M. nigra* je veći u odnosu na *M. alba* zbog prisustva antocijana (Skender et al., 2019; , Zeng et al., 2016).

Iako je sadržaj antocijana kod bijelog dudu vrlo nizak, pa čak prema nekim autorima nisu ni detektovani u bijelom dudu (Sanchez Salcedo et al., 2015; Krishna et al., 2018) ipak je kod nekih sorti bijelog dudu otkriveno prisustvo antocijana (Negro et al., 2019; Kim et al., 2020; Xiao et al., 2017), jer pri sazrijevanju ploda dolazi do akumulacije antocijana što je praćeno promjenom boje od zelene (nezrele) do bijele i svijetloljubičaste (pri punoj zrelosti).

#### 4.4 SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U SOKU I TROPU BIJELOG I CRNOG DUDA

Tanini su sekundarni metaboliti prisutni u značajnoj količini u biljnim proizvodima i predstavljaju složena polifenolna jedinjenja. Zbog svojih pozitivnih efekata kao što su antibakterijski i antioksidativni efekti, oni se smatraju bitnim sastojcima hrane. Tanini se koriste kao konzervansi za hranu, što je posledica njihove zaštitne prirode (Singh & Kumar, 2020).

Iako se ranije smatralo da tanini imaju slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na flavonoide, novija istraživanja su potvrdila da antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja zavisi od stepena njihove polimerizacije, i da imaju petnaest do trideset puta intenzivniji antioksidativni potencijal nego prosti fenoli (Stanisavljević, 2015).



Slika 11. Sadržaj ukupnih tanina u uzorcima soka i tropa bijelog i crnog duda

Procentni sadržaj ukupnih tanina dobijenih istraživanjem crnog i bijelog duda iz Mitrovića predstavljen je na slici 11. U soku bijelog duda sadržaj je iznosio 0,52 % , u tropu 0,235 % , dok je u soku crnog duda iznosio je 0,71 % , a u tropu 0,41%.

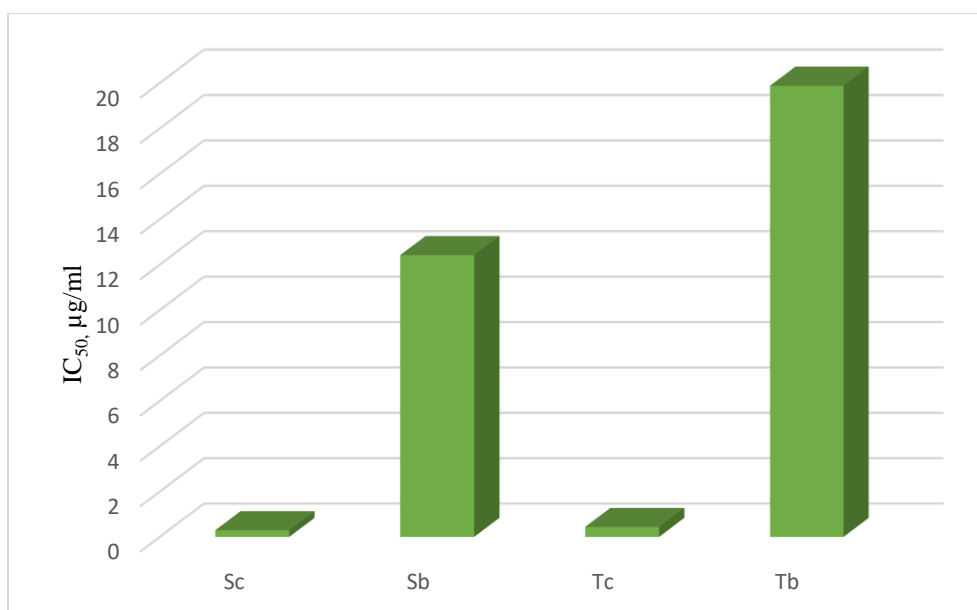
Iz dobijenih rezultata može se uočiti da je procentni sadržaj tanina bio veći u soku ( $S_b$  i  $S_c$ ) nego u tropu ( $T_b$  i  $T_c$ ) kod obje vrste duda, kao i da je veći procenat tanina u soku i tropu crnog duda u odnosu na bijeli. Detaljnim pregledom literature nisu pronađena istraživanja o taninima ploda vrste *M. nigra* i *M. alba* čije rezultate bi bilo moguće porediti sa dobijenim podacima.



#### 4.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKA I TROPA BIJELOG I CRNOG DUDA

S obzirom da sintetička antioksidativna jedinjenja mogu pokazati toksična dejstva, sve veća je potražnja za antioksidansima biljnog porijekla koja bi ih zamjenila (Amardeep Kumar et al, 2020). U ovom istraživanju korišćene su DPPH i FRAP metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda. Preporuka je da se uvijek radi više različitih testova, zasnovanih na različitim mehanizmima djelovanja kako bi se dobili što potpuniji podaci o antioksidativnoj aktivnosti ispitivanog uzorka (Schlesier, et al, 2002).

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti uzoraka bijelog i crnog duda DPPH i FRAP metodama predstavljeni su na slikama 12 i 13.



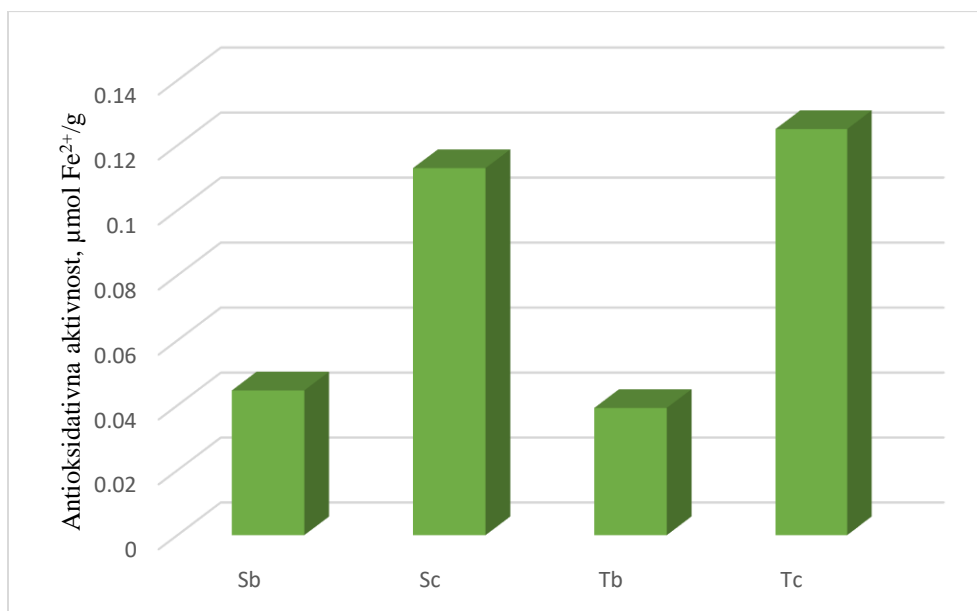
Slika 12. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda dobijena primjenom DPPH metode

Rezultati DPPH testa predstavljeni su onom količinom antioksidansa koja smanjuje koncentraciju radikala za 50 % (efikasna koncentracija-IC<sub>50</sub>). Manje IC<sub>50</sub> vrijednosti ukazuju na to da je uzorak većeg antioksidativnog potencijala (Fausto Rivero-Cruz et al., 2020). Rezultati FRAP testa su izraženi kao mikromolovi jona Fe<sup>2+</sup> po gramu ispitivanog uzorka (µmol Fe<sup>2+</sup>/g).

U ovom istraživanju dobijena  $IC_{50}$  vrijednost (Slika 12) u soku crnog duda bila je  $0,293 \mu\text{g/ml}$ , a u tropu  $IC_{50}$  vrijednost je iznosila  $0,437 \mu\text{g/ml}$ . Što se tiče bijelog duda  $IC_{50}$  vrijednost u soku iznosila je  $12,42 \mu\text{g/ml}$ , dok u tropu  $IC_{50}$  je iznosila  $19,88 \mu\text{g/ml}$ .

Rezultati su pokazali da veću antioksidativnu aktivnost mjerenu DPPH testom imaju uzorci soka nego tropa kod obje vrste duda. Dalje, znatno veću antioksidativnu aktivnost pokazuje sok i trop crnog duda u odnosu na sok i trop bijelog duda.

Pregledom literature je nađeno da su i drugi istraživači izmjerili veći antioksidativni potencijal crnog u odnosu na bijeli dud. Shivashankara i sar. su ispitivajući vrste *Morus* sa područja Indije zabilježili  $IC_{50}$  vrijednost za crni dud  $0,12 \text{ mg}$ , dok za bijeli dud  $IC_{50}$  vrijednost je iznosila  $36,26 \text{ mg}$  (Shivashankara et al., 2010). Radojković i sar. su proučavajući ekstrakte crnog i bijelog duda sa područja Srbije zabilježili antioksidativni kapacitet, izražen preko  $IC_{50}$  vrijednosti, ekstrakta bijelog duda koja je iznosila  $0,1469 \text{ mg/ml}$ , dok je kod ekstrakta crnog duda iznosila  $0,0450 \text{ mg/ml}$  (Radojkovic et al., 2012). Prema Junu i sar.  $IC_{50}$  vrijednost rastvora ekstrakta ploda crnog duda je iznosila  $146,731 \text{ ppm}$ .  $IC_{50}$  vrijednost između  $100$  i  $250 \text{ ppm}$  je klasifikovana kao srednji antioksidans (Jun et al., 2006).



Slika 13. Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda dobijena primjenom FRAP metode

Veću antioksidativnu aktivnost mjerenu FRAP testom (Slika 13) pokazuju sok (0,113  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) i trop (0,125  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) crnog dudu u odnosu na sok (0,0446  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) i trop (0,0392  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ) bijelog dudu. Detaljnim pregledom literature nije pronađeno istraživanje čije rezultate je bilo moguće porediti sa dobijenim rezultatima.

Naime, Shivashankara i sar. su odredili antioksidativnu aktivnost FRAP metodom bijelog i crnog dudu, ali su antioksidativni kapaciteti izraženi kao grami antioksidativnog kapaciteta ekvivalenta askorbinske kiseline (AEAC) na 100 g materije, i rezultati bijelog i crnog dudu su 0,09 g AEAC/100 g i 4,51 g AEAC/100 g, respektivno (Shivashankara et al., 2010).

Poređenjem rezultata dobijenih primjenom DPPH i FRAP metode uočeno je da je najveći antioksidativni kapacitet primjenom DPPH metode imao sok crnog dudu ( $S_c$ ), dok je primjenom FRAP metode najbolji antioksidativni odgovor dao trop crnog dudu ( $T_c$ ). Dobijeni rezultati potvrđuju da samo jedan test procjene antioksidativne aktivnosti nije dovoljan (Schlesier et al, 2002).

#### **4.6 MIKROELEMENTI U ISPITIVANIM UZORCIMA BIJELOG I CRNOG DUDA**

Toksični elementi u hrani se definišu kao elementi koji mogu biti prisutni u hrani u količinama koje mogu biti potencijalno opasne po ljudsko zdravlje. Svi metali su toksični ako se unose u prekomjernim količinama. Ipak, moguće je napraviti razliku između elemenata koji se smatraju esencijalnim i onih koji izazivaju toksikološke simptome pri niskim koncentracijama i koji nemaju poznate korisne fiziološke funkcije. Zbog toga je od velike važnosti kontrola njihovog sadržaja u biljci u cilju procjene toksikološkog rizika po zdravlje konzumatora (Pavón et al., 2015).

Osim u soku i tropu bijelog i crnog dudu, u ovom istraživanju sadržaj mikroelemenata određen je i u cjelokupnom plodu bijelog i crnog dudu ( $D_b$  i  $D_c$ , respektivno). Sadržaj mikroelemenata (Mn, Zn, Fe, Cu, Pb, Cd i Ni) određen je primjenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS). U tabeli 3 prikazan je dobijeni sadržaj mikroelemenata u soku ( $S_b$  i  $S_c$ ), tropu ( $T_b$  i  $T_c$ ) i cjelokupnom plodu bijelog i crnog dudu ( $D_b$  i  $D_c$ ). Rezultati su izraženi u mg/kg.

Najzastupljeniji esencijalni mikroelement u svim ispitivanim uzorcima bijelog i crnog dudu, sa područja Mitrovića, bilo je Fe (Tabela 3). Koncentracija Fe u soku bijelog dudu iznosila je 31,72 mg/kg, a u tropu 35,71 mg/kg. Koncentracija Fe u soku crnog dudu iznosila je 33,15 mg/kg, a u tropu 42,10 mg/kg. Koncentracija Fe u  $D_b$  i  $D_c$  uzorcima bila je 31,2 mg/kg i 33,61 mg/kg,

respektivno. Ispitujući plod bijelog i crnog dudu na području Srbije, Micić i sar. su zabilježili znatno veći opseg Fe (od 230,6 mg/kg do 421,3 mg/kg) (Micić et al., 2013), dok na području jugoistočne Srbije, Randelović i sar. bilježe nešto manji opseg Fe, u odnosu na rezultate koji su dobijeni ispitivanjem dudu iz Mitrovića, od 9,57 (*M. alba*) do 26,89 mg/kg (*M. nigra*) (Randelović et al., 2014). Sánchez-Salcedo i sar. daju slične rezultate rezultatima dobijenim u ovom radu (Sánchez-Salcedo et al., 2015) gdje su nivoui gvožđa varirali između 28,20 do 46,74 mg/kg i 23,92 do 37,09 mg/kg kod *M. alba* i *M. nigra*, respektivno.

Drugi po zastupljenosti esencijalni mikroelement u svim ispitivanim uzorcima bijelog i crnog dudu u ovom radu bio je Zn (Tabela 3). Njegova koncentracija u soku bijelog dudu je 2,60 mg/kg, a u tropu 7,96 mg/kg. Koncentracija Zn u soku crnog dudu je bila 5,53 mg/kg, a u tropu 7,50 mg/kg. Koncentracija Zn u D<sub>b</sub> i D<sub>c</sub> uzorcima bila je 6,43 mg/kg i 6,13 mg/kg, respektivno. Ispitujući cink u plodu bijelog i crnog dudu Micić i sar. su zabilježili vrijednosti od 22,3 mg/kg za *M. alba* i 34,0 mg/kg za *M. nigra* (Micić et al., 2013). Drugi po zastupljenosti esencijalni mikroelement u bijelom i crnom dudu na području jugoistočne Srbije je takođe bio Zn (Randelović et al., 2014). Randelović i sar. su zabilježili sadržaj Zn u opsegu 1,369-7,18 mg/kg za bijeli dud, dok je za crni dud sadržaj Zn bio u opsegu 2,69-5,48 mg/kg. Ercisli i sar. su pronašli sadržaj cinka od 2,8 mg/100 g za *M. alba* i 3,2 mg/100 g za *M. nigra* (Ercisli et al., 2007).

Koncentracija Cu u soku bijelog dudu iznosila je 2,59 mg/kg, a u tropu 2,75 mg/kg, dok je koncentracija Cu u soku crnog dudu iznosila 2,73, a u tropu 2,63 mg/kg (Tabela 3). Koncentracija Cu u D<sub>b</sub> i D<sub>c</sub> uzorcima bila je slična (2,00 mg/kg i 2,56 mg/kg, respektivno). Na području jugoistočne Srbije Randelović i sar. su zabilježili sadržaj Cu u opsegu od 1,06-2,586 mg/kg za *M. alba* i 1,52-1,56 mg/kg za *M. nigra* (Randelović et al., 2014). Ispitujući plod bijelog i crnog dudu Micić i saradnici bilježe znatno veći sadržaj Cu (8,6 mg/kg za *M. alba* i 10,7 mg/kg za *M. nigra*) (Micić et al., 2013).

Koncentracija Mn u soku bijelog dudu iznosila je je 0,79 mg/kg, a u tropu 2,36 mg/kg, dok je u soku i tropu crnog dudu koncentracija Mn iznosila 1,50 mg/kg i 2,54 mg/kg, respektivno (Tabela 3). Koncentracija Mn u D<sub>b</sub> i D<sub>c</sub> uzorcima bila je slična (1,99 mg/kg i 2,23 mg/kg, respektivno). Ispitujući plod bijelog i crnog dudu Micić i sar. bilježe znatno veće koncentracije Mn (23,3 mg/kg za *M. alba* i 8,1 mg/kg za *M. nigra*) (Micić et al., 2013), dok su Randelović i sar. zabilježili koncentracije Mn od 3,03 (*M. alba*) do 8,97 mg/kg (*M. nigra*) (Randelović et al., 2014).

Primjenom AAS metode, u svim ispitivanim uzorcima bijelog i crnog dudu ( $S_b$ ,  $S_c$ ,  $T_b$ ,  $T_c$ ,  $D_b$  i  $D_c$ ) koncentracije Pb, Cd i Ni su bile ispod granice detekcije instrumenta (Tabela 3). Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti, s obzirom da je potvrdio bezbjednu upotrebu ploda bijelog i crnog dudu, bez toksikološkog rizika. Micić i saradnici ispitujući plod bijelog i crnog dudu na jugu Srbije detektovali su 1,77 do 2,46  $\mu\text{g Cd}/100\text{ g}$ , respektivno. U njihovim istraživanjima koncentracija Ni u plodu bijelog dudu je iznosila 0,37 mg/100 g, a u crnom 0,27 mg/100 g. Takođe, su detektovali koncentraciju Pb i to u bijelom dudu 0,09 mg/100 g, a u crnom 0,14 mg/100 g (Micić et al., 2013).

Tabela 3. Koncentracija mikroelemenata [mg/kg] u soku, tropu i plodu bijelog i crnog dudu

	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Cd</b>	<b>Fe</b>
<b>S<sub>c</sub></b>	5,53±0,68	2,73±0,37	1,50±0,10	-	-	-	38,15±1,76
<b>T<sub>c</sub></b>	7,50±0,42	2,63±0,15	2,54±0,14	-	-	-	42,10±1,97
<b>D<sub>c</sub></b>	6,13±0,49	2,56±0,35	2,23±0,15	-	-	-	33,61±0,98
<b>S<sub>b</sub></b>	2,60±0,21	2,59±0,43	0,79±0,20	-	-	-	31,72±0,85
<b>T<sub>b</sub></b>	7,96±0,80	2,75±0,21	2,35±0,49	-	-	-	35,71±0,14
<b>D<sub>b</sub></b>	6,43±0,40	2,00±0,20	1,99±0,20	-	-	-	31,2±0,30

Primjenom AAS metode sličan sadržaj ispitivanih elemenata zabilježen je u soku ( $S_b$  i  $S_c$ ) i tropu ( $T_b$  i  $T_c$ ) bijelog i crnog dudu, bez obzira na vrstu (Tabela 3).

#### 4.6.1 Dnevni unos određivanih elemenata (DMI) bijelog i crnog dudu

U tabeli 4 su navedeni rezultati procentualnog dnevnog unosa ispitivanih elemenata (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Pb i Cd).

Tabela 4. Unos mikroelemenata, [%] na dnevnom nivou iz jedne porcije ispitivanih plodova bijelog i crnog duda

Esencijalni mikroelementi		RDA (mg/dan)	DMI (%)	
			D <sub>c</sub>	D <sub>b</sub>
AAS	Fe	14	11,520	10,694
	Mn	2	5,352	4,776
	Zn	10	2,940	3,084
	Cu	1	12,288	9,600
Toksični elementi		MDI (µg/dan)	DI (%)	
			D <sub>c</sub>	D <sub>b</sub>
AAS	Ni	196	/	/
	Pb	250	/	/
	Cd	25	/	/

Dnevna doza Fe koja se preporučuje iznosi 14 mg (European Economic Community-EEC, 2008). Doprinos ovog esencijalnog mikroelemenata iz 300 g ispitivanih plodova bijelog i crnog duda iznosi 11,52 % iz D<sub>c</sub>, i 10,69 % iz D<sub>b</sub> od preporučenog dnevnog unosa. S obzirom na to da Fe ulazi u sastav hemoglobina, ovaj podatak je od izuzetne važnosti. Nedostatak Fe može dovesti do anemije kao i do smanjenog dopremanja kiseonika (Grosbois et al., 2005).

Što se tiče Cu, dnevna doza koja se preporučuje iznosi 1 mg (European Economic Community-EEC, 2008), porcija ispitivanih plodova crnog i bijelog duda obezbjeđuje zadovoljenje 12,28 % (D<sub>c</sub>) odnosno 9,60 % (D<sub>b</sub>) od dnevnih potreba. Ovaj podatak je takođe od velike važnosti jer je Cu neophodan za brojne enzime koji su neophodni za normalnu metaboličku funkciju (Williams, 1983).

Preporučene dnevne potrebe Zn i Mn iznose 10 mg odnosno 2 mg, respektivno (European Economic Community-EEC, 2008). Njihov dnevni doprinos iz jedne porcije ispitivanih plodova bijelog i crnog duda je mali (do 3,08 % i 5,35 %, redom, od preporučenog dnevnog unosa).

Ni, Cd i Pb u svim ispitivanim uzorcima bijelog i crnog duda iz Mitrovića (Tabela 4) bili su ispod granice detekcije instrumenta te stoga ovaj nalaz dodatno doprinosi bezbjednoj upotrebi ploda bijelog i crnog duda, bez toksikološkog rizika.

#### **4.7 KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, MIKROELEMENATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA BIJELOG I CRNOG DUDA**

Da bi se procijenio uticaj sadržaja i sastava fenolnih jedinjenja kao i mikroelemenata na antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka bijelog i crnog duda, u ovom radu korišćena je korelaciona analiza. Dobijeni rezultati predstavljeni su u tabelama 5 i 6.

U ispitivanim uzorcima bijelog i crnog duda utvrđen je vrlo visok stepen korelacije (Tabela 5) između sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i antioksidativne vrijednosti mjerene sa obje metode, i pokazano je da su FRAP metodom stepeni korelacije iznosili  $R^2 = 0,8344$ ;  $R^2 = 0,9633$ ;  $R^2 = 0,9952$ , respektivno, a metodom DPPH  $R^2 = 0,8542$ ;  $R^2 = 0,8068$ ;  $R^2 = 0,8972$ , respektivno. Postoje brojne studije koje su potvrdile da ova jedinjenja znatno doprinose antioksidativnoj aktivnosti biljke i da njihova antioksidativna aktivnost raste sa porastom stepena hidrosilacije. Međutim, mora se uzeti u obzir i prisustvo drugih sekundarnih metabolita biljke jer na rezultat antioksidativne aktivnosti svi zajedno utiču svojim ili antagonističkim ili sinergističkim dejstvom, jer njihova antioksidativna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente. (Chew et al, 2011; Lianda, 2012).

Korelacija (Tabela 5) sadržaja ukupnih tanina sa antioksidativnom aktivnošću određenom FRAP i DPPH testom bila je slaba ( $R^2 = 0,4774$  i  $R^2 = 0,2371$ , respektivno).

Rezultati ispitivanja uzoraka duda iz Mitrovića su pokazali da fenolna jedinjenja, flavonoidi i antocijani u velikoj mjeri doprinose antioksidativnoj aktivnosti i bijelog i crnog duda (Tabela 5). Određivani nivo korelacije ispitivanih mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti je bio veoma nizak za sve elemente,  $R^2 < 0,5$  (Tabela 6).

Tabela 5. Stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, antocijana i tanina i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima bijelog i crnog duda

	DPPH	FRAP
<b>Ukupni fenoli</b>	$y = -0,1875x + 21,336$ $R^2 = 0,8542$	$y = 0,0009x + 0,0201$ $R^2 = 0,8344$
<b>Flavonoidi</b>	$y = -0,201x + 32,612$ $R^2 = 0,8068$	$y = 0,001x - 0,0437$ $R^2 = 0,9633$
<b>Antocijani</b>	$y = -18,038x + 16,37$ $R^2 = 0,8972$	$y = 0,0886x + 0,0406$ $R^2 = 0,9952$
<b>Tanini</b>	$y = -33,346x + 23,888$ $R^2 = 0,4774$	$y = 0,109x + 0,029$ $R^2 = 0,2371$

Tabela 6. Stepen korelacije mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima bijelog i crnog duda

	DPPH	FRAP
<b>Fe</b>	$y = -0,7297x + 34,287$ $R^2 = 0,1217$	$y = 0,0054x - 0,1136$ $R^2 = 0,3107$
<b>Zn</b>	$y = 5,6839x + 32,898$ $R^2 = 0,424$	$y = 0,0052x + 0,0498$ $R^2 = 0,0797$
<b>Mn</b>	$y = -0,5546x + 9,2545$ $R^2 = 0,0022$	$y = 0,0184x + 0,0473$ $R^2 = 0,1109$
<b>Cu</b>	$y = 24,12x - 56,264$ $R^2 = 0,0376$	$y = -0,0146x + 0,1195$ $R^2 = 0,0006$



## 5. ZAKLJUČAK

Podaci predstavljeni u ovom istraživanju pokazuju da plodovi *M. alba* i *M. nigra* imaju visok antioksidativni potencijal, što je utvrđeno DPPH testom (*M. alba* 12,42 – 19,88 µg/ml, *M. nigra* 0,293 – 0,437 µg/ml) i FRAP testom (*M. alba* 0,0392 – 0,0446 µmol Fe<sup>2+</sup>/g, *M. nigra* 0,113 – 0,125 µmol Fe<sup>2+</sup>/g). Na osnovu literaturnih istraživanja, postavljena je hipoteza ovog rada da se očekuje veći antioksidativni potencijal plodova *M. nigra* u odnosu na plodove *M. alba*, što je i dokazano rezultatima u ovom istraživanju.

Plodovi *M. nigra* sadrže veću količinu antocijana (0,85 – 0,922 %), ukupnih fenola (91,1 – 126,4 mg GAE/100 g), flavonoida (155,92 – 160,02 mg QE/100 g) i tanina (0,41 – 0,71 %) u odnosu na sadržaj istih u plodovima *M. alba* (antocijani 0,012 – 0,015 %; ukupni fenoli 26,91 – 34,64 mg GAE/100 g; flavonoidi 77,47 – 91,14 mg QE/100 g i tanini 0,235 – 0,52 %).

Iako je utvrđen visok stepen korelacije antocijana, ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti određene DPPH i FRAP metodom, ipak su najveću korelaciju pokazali antocijani i flavonoidi sa antioksidativnom aktivnošću mjerenom FRAP metodom ( $R^2=0,9952$ ,  $R^2=0,9633$ , respektivno).

Najzastupljeniji esencijalni mikroelement u svim ispitivanim uzorcima duda, sa područja Mitrovića, bilo je Fe (*M. alba* 31,2 - 35,71 mg/kg, *M. nigra* 33,61 – 42,1 mg/kg), što ukazuje na to da se konzumiranjem duda može unijeti potrebna količina Fe (DMI: *M. alba* 10,69 %, *M. nigra* 11,52 %), koji je neophodan za fizički rast, neurološki razvoj, ćelijsko funkcionisanje i sintezu nekih hormona.

Poređenjem dobijenih rezultata u soku i tropu bijelog i crnog duda, ustanovljeno je da i trop sadrži značajne količine bioaktivnih komponenti, stoga se trop može preporučiti za dalju upotrebu za izdvajanje ovih korisnih materija.

S obzirom na to da ove supstance koje posjeduju plodovi *M. alba* i *M. nigra* pozitivno utiču na zdravlje ljudi, ovo istraživanje može koristiti kao promocija ove biljke, koja je u Crnoj Gori zapostavljena. Takođe, ovo istraživanje može koristiti podizanju svijesti ljudi o njenim ljekovitim svojstvima i njenoj što većoj konzumaciji kao i primjeni njenih proizvoda na tržištu.

## 6. LITERATURA

1. Ahlawat T., Patel N.L., Agnihotri R., Patel, C.R., Tandel Y., Black Mulberry (*Morus nigra*); Narendra Publishing House: Delhi, India, 2016; 195–212.
2. Ajitha M., Rajnarayana K., Role of oxygen free radicals in human disease, *Indian Drug*, 2001; 38, 545-554.
3. Alam N., Bristi N.C., Rafiquzzaman M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity; *Saudi Pharm J.* 2013; 21,143–152
4. Ali M.M., Yousef A.F., Li B. et al., Effect of Environmental Factors on Growth and Development of Fruits; *Tropical Plant Biol.* 2021; 14, 226–238.
5. Amalesh S., Gouranga D., Sanjoy K.D., Roles of flavonoids in plants; *Int J Pharm Sci Tech*, 2011; 6(1), 12-35.
6. Andallu B., Suryakantham V., Srikanthi B.L., Reddy G.K., Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes; *Clin Chim Acta*, 2001; 314, 47-53.
7. Andallu B., Varadacharyulu Nch. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats; *Clin Chim Acta*, 2003; 338(1-2), 3-10.
8. Arfan M., Khan R., Rybarczyk A., Amarowicz R., Antioxidant activity of mulberry fruit extracts; *International journal of molecular sciences* vol. 2012; 13(2), 2472-80.
9. Asano N., Yamashita T., Yasuda K., et al., Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.); *J Agric Food Chem*, 2001; 49, 4208-4213.
10. Bae S.H., Suh H.J., Antioxidant activity of five different mulberry cultivars in Korea; *LWT Food Sci. Technol.* 2007; 40, 955 962.
11. Bao T., Xu Y., Gowd V., et al., Systematic study on phytochemicals and antioxidant activity of some new and common mulberry cultivars in China; *Journal of Functional Foods*, 2016; 25, 537–547.
12. Baytop T., *Therapy with Medicinal Plants in Turkey*; Istanbul University Publication. 1984; 3255, Turkey.
13. Baytop T., *Türkiye’de Bitkiler Ile Tedavi*. I.U. Yayinlari No:3255, Eczacilik Fak., 40. Istanbul, Turkey, 1996; 444.
14. Benzie IFF., Strain JJ., Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration; *Method Enzymol* 1999; 299, 15–27.
15. Bibi Sadeer N., Montesano D., Albrizio S., Zengin G., Mahomoodally M.F., The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry; Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(8), 709.
16. Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O., Oxidative stress and antioxidant defense; *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1), 9-19.
17. Blois M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical; *Nature* 1958; 181, 1199-1200.

18. Bukhari R., Kour, H., Polyploidy in Agriculture: With Special Reference to Mulberry. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2019; 8, 1795–1808.
19. Butkhup L., Samappito W., Samappito S., Phenolic composition and antioxidant activity of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits; *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013, 48, 934–940.
20. Butt M.S., Nazir A., Sultan M.T., Schroen K., *Morus alba* L. nature's functional tonic; *Trends Food Sci Technol*, 2008; 19, 505-512.
21. Calín-Sánchez Á., Martínez-Nicolás J. J., Munera-Picazo S., Carbonell-Barrachina Á. A., Legua P., & Hernández F., Bioactive compounds and sensory quality of black and white mulberries grown in Spain; *Plant Foods for Human Nutrition*, 2013; 68(4), 370–377.
22. Castañeda-Ovando A., Ma. de Pacheco-Hernández L., Ma. Páez-Hernández E., Rodríguez A.J., Galán-Vidal C.A., Chemical studies of anthocyanins: A review; *Food Chemistry* 2009; 113(4), 859-871.
23. Cavalcanti R. N., Santos D. T., Meireles, M. A. A., Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview; *Food Research International*; 2011; 44(2), 499–509.
24. Cavalu S., Damian G., Rotational Correlation Times of 3-Carbamoyl-2,2,5,5-Tetramethyl-3-Pyrrolin-1-Yloxy Spin Label with Respect to Heme and Nonheme Proteins; *Biomacromolecules*; 2003; 4, 1630–1635.
25. Chang L., Juang L., Wang B., et al., Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark; *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*; 2011; 49, 4, 785-90.
26. Chen C.C., Liu L.K., Hsu J.D., et al., Mulberry Extract Inhibits The Development of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits; *Food Chem.* 2005; 91 (4), 601–607.
27. Chen H., Chen J., Yang H., Chen W., Gao H., & Lu W., Variation in total anthocyanin, phenolic contents, antioxidant enzyme and antioxidant capacity among different mulberry (*Morus* sp.) cultivars in China; *Scientia Horticulturae*; 2016; 213, 186-192.
28. Chen H., Pu J., Liu D., Yu W., Shao Y., Yang G., Xiang Z., He N., Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.); *PLoS ONE* 2016; 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153080>
29. Chen H., Yu W., Chen G., Meng S., Xiang Z., He N., Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries; *Molecules*; 2017; 23, 4.
30. Chen J.S., Wang F.Y., Song J.J., Relation of geochemical and surface properties to heavy metal concentrations of sediments from eastern Chinese rivers; *Environ. Chem*; 1996; 15 (1), 8–14.
31. 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 Letters*; 2006; 235, 248-259.
32. Chen W., Li Y., Bao T. & Gowd V., Mulberry Fruit Extract Affords Protection against Ethyl Carbamate-Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress; *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 2017; 1–12.

33. Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Wan Aida W.M., Ho C.W., Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts; International Food Research Journal; 2011; 18, 571–578.
34. Christie P.J., Alfenito M.R., Walbot V., Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanins pigmentation in maize seedlings; Planta; 1994; 194, 541–549.
35. Chung King-Thom, Tit Yee Wong , Cheng-I Wei , Yao-Wen Huang & Yuan Lin., Tannins and Human Health: A Review; Critical Reviews in Food Science and Nutrition; 1998; 38(6), 421-464.
36. Cieslik E., Greda A., & Adamus W., Contents of polyphenols in fruit and vegetables; Food Chemistry; 2006; 94, 135–142.
37. Codex Stand, “Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed,” 1995; 31-32.
38. Council of Europe. European Pharmacopeia, 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France. 2016.
39. D’Urso G., Mes J.J., Montoro P., Hall R.D., de Vos R.C.H., Identification of Bioactive Phytochemicals in Mulberries; Metabolites; 2019; 10, 7.
40. Dalmagro A., Camargo A., Filho H., Valcanaia M., Jesus P., Zeni A., Seasonal Variation in the Antioxidant Phytocompounds Production from the *Morus nigra* Leaves; Ind. Crops Prod. 2018; 123, 323–330.
41. Datta R.K., Datta Mulberry cultivation and utilization in India. Proceedings of the FAO Electronic Conference on Mulberry for Animal Production (*Morus* 1-L), Rome, Italy 2000; 45-62.
42. DeFeudis F.V., Papadopoulos V., Drieu K., Ginko biloba extracts and cancer: a research area in its infancy; Fundam. Clin. Pharmacol. 2003; 17, 405-417.
43. Deshmukh S.V., Pathak N.V., Takalikal D.A., Nutritional effect of mulberry (*Morus alba*) leaves as sole ration of adult rabbits; World Rabbit Sci J, 1993; 1, 67-69.
44. Dimitrijević S. Danica, Analiza hemijskog sastava I antioksidativne aktivnosti ekstrakata duda (*Morus* spp. *Moraceae*); Departman za hemiju Prirodno matematički fakultet Univerzitet u Nišu, Niš, 2014; 7-8.
45. Dixon R.A., Paiva N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism; Plant Cell; 1995; 7, 1085–1097.
46. Doi K., Kojima T., Makino M., Kimura Y., Fujimoto Y., Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. Chem Pharm Bull; 2001; 49(2), 151-153.
47. Du Q., Zheng J., & Xu Y., Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity; Journal of Food Composition and Analysis; 2008; 21(5), 390–395.
48. Dudonne S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M., and Merillon J.-M., “Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays,” Journal of Agricultural and Food Chemistry; 2009; 57(5), 1768–1774.
49. Ercisli S., Orhan E., Some physic-chemical characteristic of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. Sci. Hort.; 2008; 116, 41-46.

50. Ercisli S., Orhan E., Chemical Composition of White (*Morus alba*), Red (*Morus rubra*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Fruits. *Food Chem.*; 2007, 103 (4), 1380–1384.
51. Ercisli S., Tosun M., Duralija B., Voca S., Sengul M., Turan M., Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) mulberry genotypes; *Food Technol. Biotechnol.* 2010; 48, 102–106.
52. Erden Y., Sour black mulberry (*Morus nigra* L.) causes cell death by decreasing mutant p53 expression in HT-29 human colon cancer cells; *Food Bioscience*, 2021; 42, 101113.
53. European Economic Community-EEC, Commission Directive 2008/100/EC. Amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for food stuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Off. J. Eur. Commun.*, L285, 2008; 9-12.
54. European Food Safety Authority-EFSA, Cadmium dietary exposure in the European population, *EFSA J.*, 2012;10, 2551 .
55. European Food Safety Authority-EFSA, Scientific opinion on lead in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), *EFSA J.*, 2010; 8, 1570.
56. European Food Safety Authority-EFSA, Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.*, 2015; 13, 4002.
57. Everett T.H., *New illustrated encyclopedia of gardening*. Greystone Press; New York; 1960.
58. Facciola S., *Cornucopia: a source book of edible plants*. Kampong publications, Vista, California; 1990.
59. Fahimi Z., Jahromy M.H., Effects of Blackberry (*Morus nigra*) Fruit Juice on Levodopa-Induced Dyskinesia in a Mice Model of Parkinson’s Disease; *J. Exp. Pharmacol.* 2018; 10, 29–35.
60. Fausto Rivero-Cruz J., Jessica Granados-Pineda, José Pedraza-Chaverri, Jazmin Marlen Pérez-Rojas, Ajit Kumar-Passari, Gloria Diaz-Ruiz, Blanca Estela Rivero-Cruz, Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis, *Antioxidants*; 2020; 9, 70; 10.3390.
61. Figueredo K.C., Guex C.G., Reginato F.Z., da Silva A.R.H., Cassanego G.B., Lhamas C.L.; Boligon A.A.; Lopes G.H.H.; de Freitas Bauermann L., Safety Assessment of *Morus nigra* L. Leaves: Acute and Subacute Oral Toxicity Studies in Wistar Rats; *J. Ethnopharmacol.* 2018; 224, 290–296.
62. Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Przeor M., Korczak J., Remiszewski M., Korbas E., Buchowski M., Chemical Characterization and Antioxidative Properties of Polish Variety of *Morus alba* L. Leaf Aqueous Extracts from the Laboratory and Pilot-Scale Processes; *Agric. Sci.* 2013; 4, 141–147.
63. Folin O. and Ciocalteu V., On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins; *The Journal of Biological Chemistry*, 1927; 73, 627-650.
64. Fotakis G. and Timbrell J. A., “Role of Trace Elements in Cadmium Chloride Uptake in Hepatoma Cell Lines,” *Toxicology Letters*, 2006; 164, 2, 97-103.
65. Frankel E.N. and Meyer A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants; *J. Sci. Food Agric.*, 2000; 80: 1925-1941.

66. Gecer M.K, Akin M., Gundogdu M., Eyduran S.P., Ercisli S., Eyduran E., Organic acids, sugars, phenolic compounds, and some horticultural characteristics of black and white mulberry accessions from Eastern Anatolia; *Canadian Journal of Plant Science*. 2016; 96, 27-33.
67. Gerasopoulos D., & Stavroulakis G., Quality characteristics of four mulberry (*Morus spp.*) cultivars in the area of Chania, Greece; *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1997; 73, 261–264.
68. Gonzalez A., Bd E. M., and Pilar Cano M., “Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2000; 48, 10, 4565–4570.
69. Grosbois B., Decaux O., Cador B., Cazalets C., Jego P., Les carences en fer chez l'homme [Human iron deficiency]; *Bull Acad Natl Med*. 2005; 189(8), 1649-1664.
70. Gulcin I., Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview; *Arch. Toxicol*. 2020; 94, 651–715.
71. Ha U.S., Koh J.S., Kim H.S., Woo J.C., Kim S.J., Jang H., Yoon B.I., Hwang S.Y., Kim S.W., Cyanidin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside concentrated materials from mulberry fruit have a potency to protect erectile function by minimizing oxidative stress in a rat model of diabetic erectile dysfunction; *Am J Chin Med*; 2012; 40(2), 349-356.
72. Hakkinen S. and Torronen R., Content of Flavonols and Selected Phenolic Acids in Strawberries Vaccinium Species: Influence of Cultivar, Cultivation Site and Technique; *Food Reviews International*; 2000; 33, 517-524.
73. Haminiuk C.W.I., Maciel G.M., Plata-Oviedo M.S.V., Peralta R.M., Phenolic compounds in fruits – an overview; 2012; 47(10), 2023-2044.
74. Hamurcu M., “Mineral and Heavy Metal Levels of Some Fruits Grown at the Roadsides,” *Food and Chemical Toxicology*; 2010; 48, 6, 1767-1770.
75. Han Q., Gao H., Chen H., Fang X., Wu W., Precooling and Ozone Treatments Affects Postharvest Quality of Black Mulberry (*Morus nigra*) Fruits. *Food Chem*. 2017; 221, 1947–1953.
76. Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P., *Phytochemical Dictionary; A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999; 976.
77. Hasimoto N.M., Genovese M.I., Lajola F.M., Absorption and metabolism of cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats; *Natr Res*; 2008; 28(3), 198-207.
78. Hassimotto N. M. A., Genovese M. I., & Lajolo F. M., Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2005; 53(8), 2928–2935.
79. Hassimotto N.M.A., Genovese M.I. and Lajolo F.M., Identification and characterization of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil; *Food Sci. Technol. Int.*; 2007; 13, 17-25
80. Heleno S.A., Martins A., Queiroz M.J.R.P., Ferreira I.C.F.R., Bioactivity of Phenolic Acids: Metabolites versus Parent Compounds: A Review; *Food Chem.*; 2015; 173, 501–513.
81. Hidalgo G.-I., Almajano M.P., Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review; *Antioxidants* 2017; 6, 7.

82. Homa Hajimehdipoor, Roxana Shahrestani, Maryam Shekarchi, Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds; Research Journal of Pharmacognosy (RJP); 2014; 1(3), 35-40.
83. Hooshmand S., Mahdinezhad M.R., Taraz Jamshidi S., Soukhtanloo M., Mirzavi F., Iranshahi M., Hasanpour M., Ghorbani A., *Morus nigra* L. Extract Prolongs Survival of Rats with Hepatocellular Carcinoma; Phytoter. Res. PTR 2021; 35, 3365–3376.
84. Houben D., Evrard L. and Sonnet P., Mobility, bioavailability and pH-dependent leaching of cadmium, zinc and lead in a contaminated soil amended with biochar; Chemosphere; 2013; 92(11), 1450-1457.
85. Imran M., Khan H., Shah M., Khan R., Khan F., Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species, J. Zheijang Univ.-Sci. B; 2010; 11, 973–980.
86. Jabeen S., Shah M. T., Khan S. and Hayat M. Q., “Determination of Major and Trace Elements in Ten Important Folk Therapeutic Plants of Haripur Basin, Pakistan,” Pakistan Journal of Medicinal Plants Research; 2010; 4(7), 559-566.
87. Jan Bisma, Rabea Parveen, Sultan Zahiruddin, Mohammad Umar Khan, Sradhanjali Mohapatra, Sayeed Ahmad, Nutritional constituents of mulberry and their potential applications in food and pharmaceuticals: A review; Saudi Journal of Biological Sciences; 2021; 28 (7),3909-3921.
88. Jiang S., Yan X., Gong X., Huang R., Lei M., Jiang Y., Long T., Jothimani P., Ponmani S. and Sangeetha R., Phytoremediation of heavy metals-a review. Int. J. Studies in Biosci.; 2013; 1(2), 17-23.
89. Jiang Y., Dai M., Nie W.-J., Yang X.-R., Zeng X.-C., Effects of the Ethanol Extract of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Fruit on Experimental Atherosclerosis in Rats; J. Ethnopharmacol; 2017; 200, 228–235.
90. Jiang Y., Nie W.-J., Chemical Properties in Fruits of Mulberry Species from the Xinjiang Province of China; Food Chem.; 2015; 174, 460–466.
91. Jin Q., Yang J., Ma L., Cai J., Li J., Comparison of Polyphenol Profile and Inhibitory Activities Against Oxidation and  $\alpha$ -Glucosidase in Mulberry (Genus *Morus*) Cultivars from China; J. Food Sci. 2015; 80, C2440–C2451.
92. Jun MHY., Fu J., Hong X., Wang CS., Yang CT., Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (*Pueraria lobata* Ohwi); J Food Sci. 2006; 68, 2117–22.
93. Kamiloglu S., Capanoglu E., Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (*Morus nigra* L.) products; J. Berry Res. 2013; 3, 41–51.
94. Kang T. H., Hur J. Y., Kim H. B., Ryu J. H., Kim S. Y., Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O- $\beta$ -d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia; Neuroscience Letters; 2006; 391(3), 122–126.
95. Khalifa I., Zhu W., Li K., Polyphenols of Mulberry Fruits as Multifaceted Compounds: Compositions, Metabolism, Health Benefits, and Stability—A Structural Review; J. Funct. Foods 2018; 40, 28–43.
96. Kim I., Lee J., Variations in Anthocyanin Profiles and Antioxidant Activity of 12 Genotypes of Mulberry (*Morus* spp.) Fruits and Their Changes during Processing; Antioxidants 2020; 9, 242.

97. Kim M., Nam D.-G., Ju W.-T., Choe J.-S., Choi A.-J., Response Surface Methodology for Optimization of Process Parameters and Antioxidant Properties of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves by Extrusion; *Molecules* 2020; 25, 5231.
98. Kim S.Y., Gao J.J., Lee W.C., Ryu K.S., Lee K.R., Kim Y.C., Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Arch Pharm Res*, 1999; 22(1), 81-85.
99. Kim, Hyo & Ju, Mi & Shim, Jin & Kim, Min Cheol & Lee, Sang-Hun & Huh, Youngbuhm & Kim, Sun & Oh, Myung., Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models; *The British journal of nutrition*; 2010; 104, 8-16.
100. Kimura T., Nakagawa K. & Kubota H, "Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2007; 55, 5869-5874.
101. Kohen R., and Nyska A., Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*; 2002; 30, 620-650.
102. Kostić E., Arsić B., Mitić M., Dimitrijević D., Marinković E.P., Optimization of the Solid-Liquid Extraction Process of Phenolic Compounds from Mulberry Fruit. *Not. Bot. Horti Agrobot; Cluj-Napoca* 2019; 47, 629–633.
103. Krishna H., Dhurendra Singh, Rama Shanker Singh, Lokesh Kumar, Brijesh Dutt Sharma, Pyare Lal Saroj, Morphological and antioxidant characteristics of mulberry (*Morus* spp.) genotypes; *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*; 2020;19(2), 136-145.
104. Kumar A., Ahmad F., Zaidi S., Importance of Bioactive Compounds Present in Plant Products and Their Extraction: A Review; *Agricultural Reviews* 2020; 40(4), 249-260.
105. Kurian J.C., *Plants That Heal*. Oriental Longman Publishing House. 2007; 2, 92-93.
106. Kutlu, Türkan & Durmaz, Gokhan & Ates, Burhan & Yilmaz, Ismet & Çetin, M., Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.); *Turk J Biol*. 2011; 35, 103-110.
107. Kwak E.J., Lee J.Y., Choi I.S., Physicochemical properties and antioxidant activities of Korean traditional alcoholic beverage, Yakju, enriched with mulberry; *Semin Cutan Med Surg*, 2012; 31(2), 133-139.
108. Lee C.Y., Sim S.M., Cheng H.M., Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rats administered with low-dose mulberry leaf extract; *Nutr Res*, 2008; 28, 555-563.
109. Lee J.S., Synytsya A., Kim H.B., Choi D.J., Lee S., Lee J., ... Park Y. I., Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic poly- saccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.); *International Immunopharmacology*, 2013; 17(3), 858–866.
110. Lee J.Y., Moon S.O., Kwon Y.J., Lee S.J., Choi S.W., Identification and quantification of anthocyanins and flavonoids in mulberry (*Morus* sp.) cultivars; *Food Sci Biotechnol*. 2004; 13, 176–184
111. Li Y., Bao T., Chen W., Comparison of the Protective Effect of Black and White Mulberry against Ethyl Carbamate-Induced Cytotoxicity and Oxidative Damage; *Food Chem*. 2018; 243, 65–73.
112. Lian F., Wang X.D., Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells; *Int J. Cancer*. 2008; 123(6), 1262-1268.



113. Lianda R.L.P., Sant' Ana L.D.O., Echevarria A., Castro R.N., Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts; *Journal of the Brazilian Chemical Society*; 2012; 23, 618–627.
114. Liang L., Wu X., Zhu M., Zhao W., Li F., Zou Y., Yang L., Chemical composition, nutritional value, and antioxidant activities of eight mulberry cultivars from China; *Pharmacognosy Magazine*, (2012b); 8(31), 215–224.
115. 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.* 2007; 101: 140–147.
116. Liu P., Li W., Hu Z., Qin X., Isolation, Purification, Identification, and Stability of Anthocyanins from *Lycium Ruthenicum* Murr. *LWT* 2020; 126, 109334.
117. Liu X., Xiao G., Chen W., Xu Y., Wu J., Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins; *BioMed Research International*, 2004(5); 326–331.
118. Liu Y., Application prospect of mulberry plants to vegetation restoration in three gorges reservoir area *Science of Sericulture*, 2011; 37(1), 0093-0097. (In Chinese)
119. Lu J., Lin P. H., Yao Q., & Chen C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems; *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010; 14(4), 840–860.
120. Mates J.M., Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species *Toxicology*; *Toxicology*, 2000; 153, 83-104.
121. Medina-Torres L., García-Cruz E. E., Calderas F., González Laredo R. F., Sánchez-Olivares G., Gallegos-Infante J. A., ... Rodríguez-Ramírez J., Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*); *LWT – Food Science and Technology*, 2013; 50(2), 642–650.
122. Mehdy M.C., Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens; *Journal of Plant Physiology*, 1994; 105, 467-472.
123. Memete A.R., Timar A.V., Vuscan A.N., Miere F., Venter A.C., Vicas S.I., Phytochemical Composition of Different Botanical Parts of *Morus* Species, Health Benefits and Application in Food Industry; *Plants* 2022; 11, 152.
124. Micić Ruzica & Dimitrijevic Danica & Kostic Danijela & Stojanović Gordana & Mitic Snezana & Mitic Milan & Pavlović Aleksandra & Randelović Saša, Content of Heavy Metals in Mulberry Fruits and Their Extracts-Correlation Analysis; *American Journal of Analytical Chemistry*. 2013; 4,674-682.
125. Miljković V., Nikolić L., Radulović N., Arsić B., Nikolić G., Kostić D., Bojanić Z., Zvezdanović J., Flavonoids in Mulberry Fruit. Identification of Nonanthocyanin Phenolics in Some Mulberry Fruit Species (*Morus alba* L., *Morus rubra* L. and *Morus nigra* L.); *Agro Food Ind. Hi-Tech* 2015; 26, 38–42.
126. Miyahara C., Miyazawa M., Satoh S., Sakai A., Mizusaki S., Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats; *J Nutr Sci Vitaminol*, 2004; 50, 161-164.
127. Mohamed Y. Mahmoud., Natural Antioxidants Effect of Mulberry Fruits (*Morus nigra* and *Morus alba* L.) On Lipids Profile and Oxidative Stress in Hypercholesterolemic Rats; *Pakistan Journal of Nutrition*, 2013; 12, 665-672.

128. Moise A., Marghitas L., Bobis O., Copaciu F., Dezmarean D., *Morus* spp. Material Conservation and Characterization and Its Importance for Romanian Sericulture and GCEARS-PSP Development-A Review; Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Anim. Sci. Biotechnol. 2018; 75, 57.
129. Moser P., Telis V. R. N., de Andrade Neves N., García-Romero E., Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I., Storage stability of phenolic compounds in powdered BRS Violeta grape juice microencapsulated with protein and maltodextrin blends; Food Chemistry, 2017; 214, 308–318.
130. Mutić Jelena, Analiza makroelemenata i mikroelemenata u hrani, Beograd, 2022; 6-9.
131. Nakagawa K., Ogawa K., Higuchi O., Kimura T., Miyazawa T., & Hori M., Determination of iminosugars in mulberry leaves and silkworms using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry; Analytical biochemistry, 2010; 404(2), 217–222.
132. Nazarian H., Amouzgar D., Sedghianzadeh H., Effects of different concentrations of cadmium on growth and morphological changes in basil (*Ocimum basilicum* L.); Pak J Bot. 2016; 48(3), 945–952.
133. Negro C., Aprile A., De Bellis L., Miceli A., Nutraceutical Properties of Mulberries Grown in Southern Italy (Apulia); Antioxidants 2019; 8, 223.
134. Nemanja S. Stanisavljević, Karakterizacija i in vitro biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja graška (*Pisum sativum* L.), Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet (2015).
135. Nitra Nuengchamng, Kornkanok Ingkaninan, Wiroje Kaewruang, Sathaporn Wongareonwanakij, Bhinai Hongthongdaeng, Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007; 44 (4) , 853-858.
136. Noctor G, Foyer CH., Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control; Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology; 1998; 49, 249-279.
137. Nozolino C., Isabelle P., Das G., Seasonal changes in phenolics constituents of jack pine seedling (*Pinus banksiana*) in relation to the purpling phenomenon; Can. J. Bot. 1990; 68, 2010–2017.
138. O’Connell D.W., C. Birkinshaw and T. F. O’Dwyer, “Heavy Metal Adsorbents Prepared from the Modification of Cellulose: A Review,” Bioresource Technology; 2008; 99(13), 6709-6724.
139. Okatan Volkan, Phenolic compounds and phytochemicals in fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from the Aegean region in Turkey; Folia Horticulturae; 2018; 30.
140. Özgen M., Serçe S., Kaya C., Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits; Sci. Hortic. 2009; 119, 275–279.
141. Pantelidis G. E., Vasilakakis M., Manganaris G. A., & Diamantidis G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries; Food Chemistry, 2007; 102, 777–783.
142. Paunović S.M., Mašković P., Milinković M., Determination of Primary Metabolites, Vitamins and Minerals in Black Mulberry (*Morus nigra*) Berries Depending on Altitude; Erwerbs-Obstbau 2020; 62, 355–360.

143. Pavón J. M. C., de Torres A. G., Rojas F. S., Ojeda C. B., & Alonso E. V., The toxic elements; Handbook of Mineral Elements in Food. 2015; 123–152.
144. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L., Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases; Indian J. Clin. Biochem. IJCB 2015; 30, 11–26.
145. Prior R. L., Cao G. H., Martin A. et al., “Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species,” Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998; 46, 7, 2686–2693.
146. Qin C., Li Y., Niu W., Ding Y., Zhang R., Shang X., Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit; Czech J. Food Sci. 2010; 28, 117–126.
147. Radojkovic M., Zekovic Z., Vidovic S., Kocar D., & Maskovic P., Free radical scavenging activity, total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts; Hemijska Industrija, 2012; 66(4), 547–552.
148. Radojković M., Zekovic Z., Dojcinovic B., Stojanovic Z., Cvetanovic A., Manojlovic D., Characterization of *Morus* species in respect to micro, macro, and toxic elements; Acta periodica technologica. 2014; 45, 229-237.
149. Randjelović S., Kostić D., Arsić B., Stojanović G., Bioaccumulation of metals in different species of mulberry; Advanced Technologies. 2014; 3, 105-110.
150. Raymond V., Barbehenn C., Peter Constabel, Tannins in plant–herbivore interactions; Phytochemistry, 2011; 72(13), 1551-1565.
151. Rodrigues E.L., Marcelino G., Silva G.T., Figueiredo P.S., Garcez W.S., Corsino J., Guimarães R.d.C.A., Freitas K.d.C., Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions; Int. J. Mol. Sci. 2019; 20, 301.
152. Sanchez-Salcedo E. M., Mena P., García-Viguera C., Martínez J. J., & Hernández F., Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties; Journal of Functional Foods, 2015; 12, 399–408.
153. Sánchez-Salcedo E.M., Mena P., García-Viguera C., Hernández F., Martínez J.J., (Poly)Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of White (*Morus alba*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Leaves: Their Potential for New Products Rich in Phytochemicals; J. Funct. Foods 2015; 18, 1039–1046.
154. Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M. M., & Toth-Markus M., Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables; Food Research International, 2005; 38, 1023–1029.
155. Scalzo Jessica et al., “Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit.” Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 2005; 21(2), 207-13.
156. Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Roland Bitsch, Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods; Free Radical Research 2002; 36(2),177-87.
157. Seal T., Chaudhuri K., Effect of Solvent Extraction System on the Antioxidant Activity of Some Selected Wild Leafy Vegetables of Meghalaya State in India; Int. Res. J. Nat. Appl. Sci. 2015; 2, 69–83.
158. Sengül M., Fatih Ertugay M., Sengül M., Rheological, physical and chemical characteristics of mulberry pekmez; Food Control, 2005; 16(1), 73–76.

159. Shahidi F. and Ambigaipalan P., Phenolics and Polyphenolics in Foods, Beverages and Spices: Antioxidant Activity and Health Effects—A Review; *Journal of Functional Foods*, 2015; 18, 820-897.
160. Shahidi F. and Zhong Y., Measurement of Antioxidant Activity; *Journal of Functional Foods*, (2015); 18, 757-781.
161. Sharma V., Chand S. and Singh P. Mulberry: A Most Common and Multi-Therapeutic Plant; *International Journal of Advanced Research*, 2013; 1, 375-378.
162. Shebis Y., Iluz D., Kinel-Tahan Y., Dubinsky Z., Yehoshua Y., Natural Antioxidants: Function and Sources; *Food Nutr. Sci.* 2013; 4, 643–649.
163. Shen Nan, Tongfei Wang, Quan Gan, Sian Liu, Li Wang, Biao Jin, Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity; *Food Chemistry*, 2022; 383, 132531,
164. Shih P.H., Chan Y.C., Liao J.W., Wang M.F., Yen G.C., Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea*) on senescence accelerated mice and prevention of Alzheimer’s disease; *Plant Foods Hum Nutr*, 2009; 64(2), 116-121.
165. Shikha Bathla, Tanu Jain, Heavy Metals Toxicity; *International Journal of Health Sciences & Research* 2016; 6(5),361.
166. Shivashankara K.S., Jalikop S.H., & Roy T.K., Species Variability for Fruit Antioxidant and Radical Scavenging Abilities in Mulberry; *International Journal of Fruit Science*, 2010; 10(4), 355–366.
167. Singh K.P., Singh Medicinal properties of mulberry; a review *Indian Drugs*, (1997); 34, 488-492.
168. Singh P. A., Kumar S., Applications of Tannins in Industry. Tannins; Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge, 2020.
169. Singhal B.K., Khan M.A., Dhar A., Baqual F.M., Bindroo B.B., Approaches to industrial exploitation of mulberry (*Morus* sp.) fruits. *J Fruit Ornament Plant Res*, 2010; 18(1), 83-99.
170. Singhanian N., Puri D., Madhu S.V., Sharma S.B., Assessment of oxidative stress and endothelial dysfunction in Asian Indians with type 2 diabetes mellitus with and without macroangiopathy, *QJM*, 2008; 101(6), 449-455.
171. Skender A., Kurtovic M., Becirspahic D., Some physicochemical characteristics of black and white mulberry genotypes from Bosnia and Herzegovina; *Genetika*; 2019; 51,1089-1101.
172. Song N., Yang H., Pang W., Qie Z., Lu H., Tan L., ... Qin C., Mulberry extracts alleviate A $\beta$ 25–35-induced injury and change the gene expression profile in PC12 cells; *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*; 2014.
173. Song W., Wang H.J., Bucheli P., Zhang P.F., Wei D. Z., & Lu Y. H., Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009; 57, 9133–9140.
174. Song W., Wang H.J., Bucheli P., Zhang P.F., Wei D.Z., Lu Y.H., Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus*) species from China; *J Nutr Biochem*, 2010; 21(7), 598-605.
175. Sreelatha S., Padma P.R., Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity; *Plant Foods Hum Nutr*, 2009; 64, 303-311.

176. Srivastava R., Kapoor A., Thathola R.P., Srivastava, Mulberry (*Morus alba*) leaves as human food: a new dimension of sericulture; *Int J Food Sci Nutr*, 2003; 54, 411-416.
177. Ștefănuț, M.N., Căta, A., Pop, R., Moșoarcă, C., Zamfir, A.D., Anthocyanins HPLC-DAD and MS Characterization, Total Phenolics and Antioxidant Activity of Some Berries Extracts; *Anal. Lett.* 2011; 44, 2843–2855.
178. Ștefănuț, M.N., Cata, A., Pop, R., Tanasie, C., Boc, D., Ienascu, I., Ordodi, V., Anti-hyperglycemic effect of bilberry, blackberry and mulberry ultrasonic extracts on diabetic rats; *Plant Foods Hum. Nutr.* 2013; 68, 378–384.
179. Suttisansanee U., Charoenkiatkul S., Jongruaysup B., Tabtimsri S., Siriwan D., Temviriyankul P., Mulberry Fruit Cultivar “Chiang Mai” Prevents Beta-Amyloid Toxicity in PC12 Neuronal Cells and in a *Drosophila* Model of Alzheimer’s Disease; *Molecules* 2020; 25, 1837.
180. Sývacý A., Sökmen M., Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the steams of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.); *Plant Growth Regul.* 2004; 44, 251–256.
181. Tan X.Y., Liu Y., Gu G., Zeng X., Wang X., Hu Z., Sun and Z. Yang., Immobilization of cd (ii) in acid soil amended with different biochars with a long term of incubation. *Environ; Sci. Pollut.* 2015; 1-8.
182. Tang C., Wu J., Luo G., Wu F., Yang Q., Xiao G., Wine-making experiment using mulberry fruits from different fruit mulberry varieties; *Acta Sericologica Sinica*, 2008; 34, 24–27.
183. Thabti I., Elfalleh W., Hannachi H., Ferchichi A., Campos M.D.G., Identification and Quantification of Phenolic Acids and Flavonol Glycosides in Tunisian *Morus* Species by HPLC-DAD and HPLC–MS; *J. Funct. Foods* 2012; 1, 367–374.
184. Timberlake C.F., Bridle P., Jackson M.G., Vallis L., Correlations between quality and pigment parameters in young Beaujolais red wines; *Ann Nutr Aliment.* 1978; 32(5), 1095-101.
185. Tomak E.D. & O. Gonultas., The Wood Preservative Potentials of Valonia, Chestnut, Tara and Sulphited Oak Tannins; *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 2018; 38,3, 183-197.
186. Tomas M., Toydemir G., Boyacioglu D., Hall R., Beekwilder J., & Capanoglu E. The effects of juice processing on black mulberry antioXidants; *Food Chemistry*, 2015; 186, 277–284.
187. Turan I., Demir S., Kilinc K., Burnaz N.A.; Yaman S.O., Akbulut K., Mentese A., Aliyazicioglu Y., Deger O., Antiproliferative and Apoptotic Effect of *Morus nigra* Extract on Human Prostate Cancer Cells; *Saudi Pharm. J.* 2017; 25, 241–248.
188. Veberić R., Slatnar A., Bizjak J., Stampar F., Mikulic-Petkovsek, M., Anthocyanin Composition of Different Wild and Cultivated Berry Species. *LWT—Food Sci. Technol.* 2015; 60, 509–517.
189. Vega E.N., Molina A.K., Pereira C., Dias M.I., Heleno S.A., Rodrigues P., Fernandes I.P., Barreiro M.F., Stojkovic´ D., Sokovic´ M., et al., Anthocyanins from *Rubus fruticosus* L. and *Morus nigra* L. Applied as Food Colorants: A Natural Alternative; *Plants* 2021; 10, 1181.

190. Velioglu Y.S, Mazza G., Gao L., Oomah B.D., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products; *J Agric Food Chem.* 1998; 46, 4113–7.
191. Venkatesh Kumar R., Seema Chauhan. Mulberry: Life enhancer.; *J Medicinal Plants Research*, 2008; 2(10), 271-278.
192. Vertuani S., Angusti A. & Manfredini S., The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview; *Current pharmaceutical design.* 2004; 10, 1677-94.
193. Vijayan K, Srivastava PP, Awasthi AK., Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers; *Genome*, 2004; 47, 439-448.
194. Wang F., Du B. L., Cui Z. W., Xu L. P., Li C. Y., Effects of high hydrostatic pressure and thermal processing on bioactive compounds, antioxidant activity, and volatile profile of mulberry juice; *Food Science and Technology International*, 2016.
195. Wang H., Cao G., & Prior R. L., Oxygen radical absorbing capacity of antho- cyanins; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997; 45(2), 304–309.
196. Wang H., Meng B. and Han H., The discussion on mulberry as a green afforestation tree species; *North Sericulture*, 2010; 31(1), 45-47. (In Chinese)
197. Wang K., Chen C., Gong H., Wan J. and Zhang G., The models of agro-ecological regulation and safe efficient utilization of farmland polluted by cadmium; *China Environ. Sci.*, 1998; 18(2), 97-101. (In Chinese)
198. Wang K., Tolerance of cultivated plants to cadmium and their utilization in polluted farmland soils; *Acta Biotechnologica*, 2002; 22(1-2), 189-198.
199. Wang R.J., Hu M.L., Antioxidant capacities of fruit extracts of five mulberry genotypes with different assays and principle components analysis; *International Journal of Food Properties*, 2011; 14(1), 1–8.
200. Wang S.Y. and H. S. Lin, “Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000; 48(2), 140–146.
201. Wang Y. and Bjom, L.O., Heavy Metal Pollution in Guangdong Province, China, and the Strategies to Manage the Situation; *Frontiers in Environmental Science*, 2014; 2, 9.
202. Wang Y., Xiang L., Wang C., Tang C., He X., Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS ONE*, 2013; 8(7), e71144.
203. Wei H., Liu S., Liao Y., Ma C., Wang D., Tong J., Feng J., Yi T., Zhu L., A Systematic Review of the Medicinal Potential of Mulberry in Treating Diabetes Mellitus; *Am. J. Chin. Med.* 2018; 46, 1743–1770.
204. WHO, “Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials,” Revised, Geneva, 2005.
205. Williams DM., Copper deficiency in humans; *Semin Hematol.* 1983;20(2),118-128.
206. Xiao H., Zhang YQ., Ding XW., Huang XZ., Li R., Shen YH. Shen YH. (corresponding author), State Key Lab Silkworm Biol, Chongqing 400715, Peoples R China; *International food research journal*, 2020; 27 (3), 516.
207. Xiao T., Guo Z., Sun B., Zhao Y., Identification of Anthocyanins from Four Kinds of Berries and Their Inhibition Activity to  $\alpha$ -Glycosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B by HPLC-FT-ICR MS/MS; *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65, 6211–6221.
208. Yamamoto J., Naemura A., Ura M., Ijiri Y., Yamashita T., Kurioka A., Koyama A., Testing various fruits for anti-thrombotic effect: I. Mulberries; *Platelets*, 2006; 17(8), 555–564.

209. Yang J., Liu X., Zhang X., Jin Q., Li J., Phenolic Profiles, Antioxidant Activities, and Neuroprotective Properties of Mulberry (*Morus Atropurpurea* Roxb.) Fruit Extracts from Different Ripening Stages; *J. Food Sci.* 2016; 81, C2439–C2446.
210. Yuan Q., & Zhao L., The Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit—A Review of Characteristic Components and Health Benefits; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017; 65 (48), 10383–10394.
211. Zadernowski R., Naczek M. and Nesterowicz J., Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53, 2118-2124.
212. Zelová H., Hanáková Z., Cermáková Z., Šmejkal K., Dal'Acqua S., Babula P., Cvacka J., Hošek, J., Evaluation of AntiInflammatory Activity of Prenylated Substances Isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*; *J. Nat. Prod.* 2014; 77, 1297–1303.
213. Zeng Q., Chen H., Zhang C., Han M., Li T., Qi X., Xiang Z., and He N., Definition of eight mulberry species in the genus *Morus* by internal transcribed spacer-based phylogeny. *PLoS ONE* 2015; 10 (8).
214. Zeng Q.-W., Zhang C., Chen H.-Y., Ding L., Zhao A.-C., Xiang Z.-H., He N.-J., Introduction trial of medicine mulberry (*Morus nigra*) in Chongqing; *China J. Chin. Mater. Med.* 2016; 41, 1450–1455.
215. Zhang H., Ma Z.F., Luo X., Li X.; Effects of mulberry fruit (*Morus alba* L.) consumption on health outcomes: a mini-review; *Antioxid. Basel Switz.* 2018; 7 (5), 69.
216. Zhang W., Han F., He J., & Duan C., HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and antioxidant activities of nonanthocyanin phenolics in mulberry (*Morus alba* L.); *Journal of Food Science*, 2008; 73(6), C512–C518.
217. Zhishen J., Mengcheng T., & Jianming W., The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals; *Food Chemistry*, 1999; 64(4), 555–559.
218. Zoofishan Z., Hohmann J., Hunyadi A., Phenolic Antioxidants of *Morus nigra* Roots, and Antitumor Potential of Morusin; *Phytochem. Rev.* 2018; 17, 1031–1045.
219. Zorzi M., Gai F., Medana C., Aigotti R., Peiretti P.G., Identification of Polyphenolic Compounds in Edible Wild Fruits Grown in the North-West of Italy by Means of HPLC-DAD-ESI HRMS; *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* 2020; 75, 420–426.