

**UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

Ranka Dujović

**ISPITIVANJE RAZLIČITIH POSTUPAKA EKSTRAKCIJE
ANTIOKSIDATIVNIH JEDINJENJA PITOME NANE (*MENTHA
PIPERITA*) I DIVLJE NANE (*MENTHA LONGIFOLIA*)**

MASTER RAD

Podgorica, 2024. godine

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

Ranka Dujović

ISPITIVANJE RAZLIČITIH POSTUPAKA EKSTRAKCIJE
ANTIOKSIDATIVNIH JEDINJENJA PITOME NANE (*MENTHA*
***PIPERITA*) I DIVLJE NANE (*MENTHA LONGIFOLIA*)**

MASTER RAD

Podgorica, 2024. godine

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Ranka Dujović

Datum i mjesto rođenja: 08.07.1998. godine; Pljevlja

Institucija: Univerzitet Crne Gore, Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa: Hemijska tehnologija

Godina završetka studija: 2021. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Ispitivanje različitih postupaka ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja pitome nane (*Mentha piperita*) i divlje nane (*Mentha longifolia*)

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 01.03.2023. godine

Datum prihvatanja teme: 28.04.2023. godine

Mentor: Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, redovni profesor MTF-a, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, vanredni profesor MTF-a, član

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, redovni profesor MTF-a, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, vanredni profesor MTF-a, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 2024. godine

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Ranka Dujović

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom

Ispitivanje različitih postupaka ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja pitome nane (*Mentha piperita*) i divlje nane (*Mentha longifolia*) rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta:

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Biljani Damjanović-Vratnici na zalaganju, uloženom trudu, razumijevanju, smjernicama i stručnim savjetima kako tokom izrade ovog rada, tako i tokom studiranja.

Zahvaljujem se i prof. dr Nadi Blagojević i prof. dr Vesni Vukašinović-Pešić na izdvojenom vremenu i sugestijama koje su značajno doprinijele kvalitetu ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na razumijevanju, podršci i što su uvijek tu za mene.

Ranka Dujović

IZVOD

U okviru ovog rada ispitivana je ekstrakcija antioksidativnih jedinjenja odabranih vrsta roda *Mentha* (*Mentha piperita* i *Mentha longifolia*), sa dva geografski različita područja Crne Gore, tačnije sa područja Pljevalja (sjeverni region) i Herceg Novog (južni region). Primjenjene su različite tehnike ekstrakcije (ultrazvučna ekstrakcija, digestija, maceracija i Sokslet (Soxhlet) ekstrakcija) u cilju utvrđivanja najefikasnije metode za izolovanje antioksidativnih jedinjenja. Ispitano je kojom se metodom ekstrakcije dobija ekstrakt sa najvećim sadržajem antioksidativnih jedinjenja i utvrđeno da je najpogodnija ultrazvučna ekstrakcija. Takođe, prilikom ekstrakcije, korišćeni su različiti rastvarači i utvrđeno je da etanolni ekstrakti imaju najveći sadržaj antioksidativnih jedinjenja.

Sadržaj antioksidativnih jedinjenja u etanolnim i vodenim ekstraktima pitome nane i divlje nane (*Mentha piperita* i *Mentha longifolia*) ispitivan je primjenom UV-VIS spektrofotometrijske metode. Folin-Ciocalteu metodom određen je sadržaj fenola u svim uzorcima, dok je za kvantitativno određivanje flavonoida primjenjena metoda sa aluminijum-hloridom. Analizom dobijenih rezultata uočeno je da se u etanolnim ekstraktima pitome nane vrijednosti ukupnog sadržaja fenola kreću u intervalu od 97,04 mg GAE/g suve biljke do 210,5 mg GAE/g suve biljke, a flavonoida od 71,02 mg Qc/g suve biljke do 184,8 mg Qc/g suve biljke. U vodenim ekstraktima pitome nane sadržaj fenola je iznosio od 56,44 mg GAE/g suve biljke do 121,5 mg GAE/g suve biljke, a flavonoida 51,76 mg Qc/g suve biljke do 116,28 mg Qc/g suve biljke. Sadržaj fenola u etanolnim ekstraktima divlje nane se kretao od 139,07 mg GAE/g suve biljke do 241,35 mg GAE/g suve biljke, dok se sadržaj flavonoida kretao od 60,42 Qc/g suve biljke do 115,52 Qc/g suve biljke. U vodenim ekstraktima divlje nane sadržaj fenola se kretao u intervalu od 79,97 mg GAE/g suve biljke do 140,04 mg GAE/g suve biljke, a sadržaj flavonoida od 51,76 mg Qc/g suve biljke do 184,8 mg Qc/g suve biljke.

Antioksidativna aktivnost vodenih i etanolnih ekstrakata pitome i divlje nane određivana je DPPH i FRAP testom. U etanolnim ekstraktima antioksidativna aktivnost pitome nane određivana DPPH testom se kretala u intervalu od 25,02 $\mu\text{g/mL}$ do 83,71 $\mu\text{g/mL}$, a mjerena FRAP testom od 1,53 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke do 3,92 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke. U vodenim ekstraktima antioksidativna aktivnost pitome nane određivana DPPH testom se kretala od 70,33 $\mu\text{g/mL}$ do 148,07 $\mu\text{g/mL}$, a mjerena FRAP testom od 0,73 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke do 2,42 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata divlje nane određivana DPPH testom je iznosila od 16,50 $\mu\text{g/mL}$ do 58,84 $\mu\text{g/mL}$, a mjerena FRAP testom od 2,24 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke do 4,27

$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke, dok je antioksidativna aktivnost vodenih ekstrakata mjerena DPPH testom iznosila od 62,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do 162,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a mjerena FRAP testom 0,62 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke do 2,68 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke.

Ključne riječi: *Mentha piperita*, *Mentha longifolia*, ekstrakcija, fenoli, flavonoidi, antioksidativna aktivnost, DPPH, FRAP.

ABSTRACT

Within of this study the extraction of antioxidant compounds of selected species *Mentha*, (*Mentha piperita* and *Mentha longifolia*) were examined, from two geographically different areas of Montenegro, exactly from the area of Pljevlja (northern region) and Herceg Novi (southern region). Various extraction techniques (ultrasonic extraction, digestion, maceration and Soxhlet extraction) were performed in order to determine the most effective methods for isolating antioxidant compounds. It was examined which extraction method produces the extract with the highest content of antioxidant compounds and it was determined that ultrasonic extraction is the most suitable. Also, during the extraction, different solvents were used and it was determined that ethanolic extracts have the highest content of antioxidant compounds.

In ethanol and aqueous extracts of cultivated and wild mint (*Mentha piperita* and *Mentha longifolia*) content of antioxidant compounds was examined using the UV-VIS spectrophotometric method. Folin-Ciocalteu method determined the phenol content in all samples, while the aluminum chloride method was applied for quantitative determination of flavonoids. Analyzing the obtained results, it was observed that in ethanol extracts of cultivated mint, the values of the total phenol content ranged from 97,04 mg GAE/g dry plant to 210,5 mg GAE/g dry plant and flavonoids from 71,02 mg Qc/g dry plant to 184,8 mg Qc/g dry plant. In aqueous extracts of cultivated mint, phenol content was from 56,44 mg GAE/g dry plant to 121,5 mg GAE/g dry plant and flavonoids 51,76 mg Qc/g dry plant to 116,28 mg Qc/g dry plant. The phenol content in wild mint ethanol extracts ranged from 139,07 mg GAE/g dry plant to 241,35 mg GAE/g dry plant, while flavonoid content ranged from 60,42 Qc/g of dry plant to 115,52 Qc/g of dry plant. In wild mint aqueous extracts, phenol content ranged in the interval 79,97 mg GAE /g dry plant to 140,04 mg GAE/g dry plant, and flavonoid content from 51,76 mg Qc/g dry plant to 184,8 mg Qc/g dry plant.

Antioxidant activity of aqueous and ethanol extracts of cultivated and wild mint was determined by DPPH and FRAP test. In ethanol extracts, antioxidant activity of cultivated mint determined by DPPH test ranged from 25,02 $\mu\text{g/mL}$ to 83,71 $\mu\text{g/mL}$, and measured by FRAP test of 1,53 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant to 3,92 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant. In aqueous extracts, antioxidant activity of cultivated mint determined by DPPH test ranged from 70,33 $\mu\text{g/mL}$ to 148,07 $\mu\text{g/mL}$, and measured by FRAP test from 0,73 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant to 2,42 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant. Antioxidant activity of ethanol wild mint extracts determined by DPPH test ranged from 16,50 $\mu\text{g/mL}$ to 58,84 $\mu\text{g/mL}$, and measured by FRAP test from 2,24 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant to 4,27 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant,

while antioxidant activity of aqueous extracts measured by DPPH test was from 62,15 $\mu\text{g/mL}$ to 162,54 $\mu\text{g/mL}$, and measured by FRAP test 0.62 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant up to 2,68 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ dry plant.

Key words: *Mentha piperita*, *Mentha longifolia*, extraction, phenols, flavonoids, antioxidant activity, DPPH, FRAP.

SADRŽAJ

1	UVOD	12
2	TEORIJSKI DIO	14
2.1	OSNOVNE KARAKTERISTIKE RODA <i>MENTHA</i>	14
2.1.1	<i>Mentha piperita</i> (pitoma nana)	16
2.1.2	<i>Mentha longifolia</i> (divlja nana)	17
2.1.3	Upotreba pitome i divlje nane	18
2.2	Antioksidativna jedinjenja	19
2.2.1	Definicija i podjela antioksidativnih jedinjenja	19
2.2.2	Antioksidativna aktivnost	19
2.2.3	Fenolna jedinjenja	21
2.2.4	Flavonoidi	22
2.2.5	Hemijski sastav pitome i divlje nane	23
2.3	Postupci ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja	26
2.3.1	Ultrazvučna ekstrakcija	27
2.3.2	Maceracija	28
2.3.3	Digestija	28
2.3.4	Soxhlet ekstrakcija	28
3	EKSPERIMENTALNI DIO	30
3.1	Karakteristike sjevernog i južnog regiona Crne Gore	30
3.2	Hemikalije, aparature i instrumenti	31
3.3	Priprema biljnog materijala	32
3.4	Kvantitativne metode određivanja sadržaja antioksidativnih jedinjenja	34
3.4.1	Određivanje sadržaja ukupnih fenola	34
3.4.2	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	36
3.5	Metode za određivanje antioksidativnog potencijala	37
3.5.1	DPPH test- određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala	37
3.5.2	FRAP test- određivanje sposobnosti redukcije feri jona	38
4	REZULTATI I DISKUSIJA	40
4.1	Ukupni sadržaj fenola u ekstraktima pitome i divlje nane	40
4.2	Ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktima pitome i divlje nane	45
4.3	Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom DPPH testa	49

4.4	Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom FRAP testa	54
5	KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM EKSTRAKTIMA PITOME I DIVLJE NANE.....	59
6	ZAKLJUČAK.....	62
7	LITERATURA	65

1 UVOD

Biljni ekstrakti i drugi produkti biljnih sirovina su baza za proizvodnju različitih ljekovitih proizvoda. Bilo da su samonikle ili gajene, ljekovite biljne vrste se zbog sadržaja antioksidativnih materija koriste u liječenju, a imaju i veoma važnu ulogu u ekonomskom, socijalnom, kulturnom i ekološkom razvoju jedne države. Ljekovita svojstva se pripisuju prisustvu aktivnih materija, tzv. sekundarnih metabolita. Ljekovite biljne vrste iz roda *Mentha* čovjek koristi u svakodnevnom životu, u ishrani, medicini, kozmetičkoj industriji, industriji boja, deterdženata, parfema, ali i za druge namjene. Koristi se cijela biljka ili njeni pojedini dijelovi, a koji dio biljke će biti upotrijebljen zavisi od sadržaja ljekovitih supstanci.

Specifičan geografski položaj, različiti reljefni i klimatski uslovi sredine usloveli su veliku raznovrsnost biljnog svijeta u Crnoj Gori. Velike površine šuma i livada predstavljaju idealna staništa mnogobrojnih ljekovitih biljaka, pa je sakupljanje i upotreba ljekovitog bilja na našim prostorima duga tradicija. Iako Crna Gora predstavlja veoma povoljno područje za intenzivno gajenje ljekovitog bilja plantažni uzgoj ljekovitog bilja u Crnoj Gori, uključujući i pitomu nanu, je prisutan samo na malim porodičnim gazdinstvima kao sporedna aktivnost (Jovović i sar., 2020). Plantažnim gajenjem ljekovitog bilja dobija se veća količina i postiže se ujednačen kvalitet biljne sirovine, u poređenju sa prikupljanjem samoniklog bilja (Živanović-Turudija, 2015). Sakupljanje samoniklog ljekovitog bilja je sastavni dio aktivnosti mnogih domaćinstava u Crnoj Gori. Berači prodaju bilje direktno preduzećima ili su organizovani u beračke grupe gdje je vođa grupe lice odgovorno za ubrane količine, kvalitet i dr. (Jovović, 2014).

Biljke posjeduju veliku sposobnost sinteze hemijski raznovrsnih sekundarnih metabolita. Sintaza ovih supstanci, je važna za razvoj i opstanak biljke (Kovačević i Kundaković, 2007). Velika pažnja se posvećuje izolaciji takvih jedinjenja iz biljaka. Hemijski sastav različitih vrsta nane pokazuje značajnu varijabilnost zbog hibridne prirode i postojanja različitih hemotipova, ali i klimatskih i geografskih prilika (Padalia i sar., 2013).

Pitoma i divlja nana (*Mentha piperita* i *Mentha longifolia*) sa područja Crne Gore su biljne vrste malo ispitane u pogledu njihovog hemijskog sastava, prisutnih biološki aktivnih materija kao i njihovog antioksidativnog potencijala. Od davnina su poznate po svojim aromatičnim i terapijskim svojstvima. Pitoma nana je isključivo gajena biljka, dok je divlja nana samonikla biljka planinskih područja, a javlja se i u nizijskom pojasu.

Predmet ovog istraživanja je određivanje sadržaja antioksidativnih jedinjenja, iz etanolnih i vodenih ekstrakata pitome nane i divlje nane (*Mentha piperitae* i *Mentha longifolia*) sa područja Crne Gore, odnosno sa područja Pljevalja (sjeverni region) i Herceg Novog (južni region). Ispitivan je uticaj različitih metoda ekstrakcije na sadržaj antioksidativnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala dobijenih ekstrakata. Nakon eksperimentalnog dijela istraživanja, dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima iz dostupne literature.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE RODA *MENTHA*

Porodica Lamiaceae (porodica Usnatice) je veoma rasprostranjena, karakteriše se značajnim morfološkim diverzitetom i uključuje zeljaste, žbunaste i drvenaste forme, kao i lijane (Tucker i Naczi, 2007). Osnovna morfološka karakteristika po kojoj je porodica Lamiaceae i dobila ime usnatice je građa cvijeta koji je dvousnat i zigomorfan (Dragumilo 2021). Vrste ove familije su bogate polifenolnim jedinjenjima i posjeduju antioksidativna svojstva (Džamić i sar., 2010). Rod *Mentha* pripada ovoj porodici i predstavljaju višegodišnje, zeljaste biljke sa jednostavnim, karakterističnim listovima prijatnog mirisa. Biljke iz roda *Mentha* su rasprostranjene u različitim dijelovima svijeta i mogu se naći na teritoriji Evrope, zatim Azije, Australije kao i Južne Afrike. Ove vrste predstavljaju zeljaste, ljekovite biljke kod kojih stabljika može biti prilegla, uzlazeća ili uspravna. Karakteristično za ove vrste je da imaju najsitnije cvjetove među svim članovima porodice Lamiaceae (Jakovljević i sar., 2017). Određivanje vrsta u rodu *Mentha* je teško jer rod ima složenu taksonomiju, odnosno većina vrsta može proizvesti hibride (Mamadalieva i sar., 2020). Vrste, podvrste i sorte se razlikuju po boji lista, sadržaju antioksidativnih jedinjenja, habitusu, kao i nizu drugih osobina (Šarić-Kundalić i sar., 2009). Prema literaturnim podacima najčešće se upotrebljavaju *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Mentha longifolia* i *Mentha spicata*, a u manjoj mjeri vrste poput *Mentha arvensis*, *Mentha suaveolens*, *Mentha villosa*, *Mentha gentilis*, *Mentha gracilis* i *Mentha rotundifolia*. Pojedine vrste iz roda *Mentha* se gaje i kao kultivisane biljke, što predstavlja pogodnost za uporednu analizu sadržaja sekundarnih metabolita i utvrđivanje eventualnih kvantitativnih razlika između gajenih i samoniklih biljaka (Bokić, 2021). Karakteriše ih moćno razvijen sistem rizoma i mali cvjetovi koji su sakupljeni u različito grupisane cvasti. To su vrste koje za svoj rast i razvoj zahtijevaju hranjive elemente i humusna zemljišta (Jovović i sar., 2020). Predstavljaju izvor mnogih bioloških i hemijski aktivnih jedinjenja za koje se zna da su od velikog ekonomskog, farmaceutskog i nutritivnog značaja. Kao najznačajnija biološka jedinjenja u rodu *Mentha* izdvajaju se sekundarni biomolekuli biljaka, posebno fenoli i flavonoidi (Mamadalieva i sar., 2020).

Sadržaj aktivnih komponenti određuje ljekovitost biljne vrste, a razlika u sadržaju i vrsti sekundarnih metabolita postoji i u biljkama iste vrste. Tako, hemijski sastav ekstrakta nane značajno zavisi od ekoloških činilaca (npr. klima, toplota, vlaga, svjetlosno zračenje, zemljište, geografska

širina i nadmorska visina) i antropogenih uticaja (npr. genotip, oplemenjivanje i dr.) (Aflatuni, 2005). Uslovi rasta na različitim geografskim širinama značajno variraju u zavisnosti od sezone, dužine dana, intenziteta i trajanje svjetlosti kao i visine temperature. Mnoge biljne vrste se prilagođavaju uslovima sredine kroz različite strategije opstanka, od kojih je jedna sinteza dodatnih sekundarnih metabolita (Jaakola i Hohtola, 2010).

Geografski faktori naročito reljef i oblačnost uslovljavaju znatne razlike u broju sunčanih časova u pojedinim mjestima. Od reljefa znatno zavisi vrijeme insolacije, tako da najviše insolacije primaju južne padine i ravnice, a sjeverne padine mnogo manje. U planinama se, zbog pada temperature sa visinom skraćuje vegetacioni period, pa je zbog toga vrijeme insolacije vrlo važan klimatski element (Radojičić, 2008). Kako nana ima širok areal rasprostranjenosti gaji se i u vlažnim primorskim oblastima, ali i na većim nadmorskim visinama. Značajno manji prinosi se dobijaju ako se nana gaji iznad 800 m, dok se gajenjem nane na nižim nadmorskim visinama količina aktivnih materija smanjuje (Jovović i sar., 2020). Sunčani dani u fazi berbe su najbolji za visok prinos i dobar kvalitet nane (Salehi i sar., 2018). Niske temperature ne pogoduju nani, tačnije usporavaju akumulaciju etarskih ulja, dok se sa povećanjem temperature povećava koncentracija mentola (Salehi i sar., 2018). Optimalne temperature za uzgajanje i cvjetanje nane su između 21 °C i 26 °C (Ringuelet i sar., 2003). Vrste iz roda *Mentha* imaju dugačke, tanke rizome, koje se obično nazivaju stoloni (Tucker i Naczi, 2007). Pošto nana ima veoma plitak korijenov sistem, razvoj podzemnih i nadzemnih stolona je slabiji u toku sušnih ljeta, što dalje dovodi do lošeg prinosa ove biljne vrste (Jovović i sar., 2020).

Padavine izrazito ističu i specifičnost klime pojedinih mjesta Crne Gore. Na količinu i složenost padavina, uz složenost reljefa, bitno utiče udaljenost mjesta od Jadranskog mora. Najveće relativno kolebanje padavina je u mjestima bližim moru, tj. u Herceg Novom, a najmanje u Pljevljima. Mjesta na većim nadmorskim visinama i dalja od mora imaju veću relativnu vlažnost. Pljevlja imaju male količine padavina i prosječno dosta visoku relativnu vlažnost (Radojičić 2008). Ako se padavine jave u periodu prije berbe nane, dolazi do ispiranja aktivnih materija rastvorljivih u vodi i samim tim do smanjenja kvaliteta (Jovović i sar., 2020).

Tehnike gajenja nane imaju veliki uticaj na rast biljke, kao i na njen fitohemijski sastav (Salehi i sar., 2018). Razmak redova je važan faktor u određivanju mikrookruženja prilikom sadnje nane. Optimizacija ovog faktora može dovesti do većeg prinosa i povoljno uticati na apsorpciju hranljivih materija (Aflatuni 2005). Zbog plitkog korijenovog sistema nani najviše odgovaraju laka, humusna zemljišta (Jovović i sar., 2020).

Na kvalitet i količinu aktivnih materija nane značajan uticaj ima genotip i oplemenjivanje. Novi genotipovi sa poboljšanim svojstvima odlikuju se značajno većim sadržajem etarskih ulja sa visokim sadržajem mentola (Aflatuni 2005).

2.1.1 *Mentha piperita* (pitoma nana)

Mentha piperita poznatija kao pitoma nana (slika 1), komercijalno važnija od drugih vrsta nane, je isključivo gajena biljka (Jovović i sar., 2020).



Slika 1. *Mentha piperita* <https://www.divineplantsonline.com.au/products>

Ova vrsta je višegodišnja zeljasta biljka sa snažno razvijenim podzemnim stablom - rizomom, sa velikim brojem izdanaka, tj. stolona. Stoloni se razvijaju po površini zemljišta kao i na dubini oko 5 cm i služe za vegetativno razmnožavanje pitome nane. Podzemni stoloni su bijele, a površinski ljubičasto-zelene boje. Iz površinskih stolona se razvija korijenov sistem i novi nadzemni izdanci koji omogućavaju ovoj vrsti brzo širenje i zauzimanje prostora (Aflatuni, 2005).

Velike potrebe za herbom pitome nane, listom (*Mentha piperitae folium*) i nadzemnim dijelom (*Mentha piperitae herba*), kao i njenim etarskim uljem (*Aetheroleum menthae piperitae*) dovele su do toga da se ova vrsta gaji širom svijeta, u Evropi, Sjedinjenim Američkim Državama, Indiji, Kini i u zemljama bivšeg SSSR-a (Aflatuni, 2005). U Crnoj Gori pitoma nana se proizvodi uglavnom u baštama.

Mentha piperita je jedna od najpopularnijih i najčešće korišćenih biljaka, najviše zbog svojih glavnih komponenti mentola i mentona (Dragumilo, 2021). Gaji se kao dvogodišnja ili trogodišnja biljka. Na kvalitetnom zemljištu i sa dobrom kultivacijom može se gajiti i više od tri

godine. Obrada zemljišta je od velikog značaja za uzgoje pitome nane, jer su stoloni prilično nježni, pa za njihov razvoj treba što bolje pripremiti površinski sloj. Adekvatno navodnjavanje, dodavanje mikroelemenata bora, molibdena, kobalta i mangana povoljno utiče na prinos herbe pitome nane (Jovović i sar., 2020).

Ova nana se isključivo razmnožava vegetativnim putem, jer ova vrsta predstavlja višestruki hibrid koji je nastao ukrštanjem vrsta *Mentha aquatica* i *Mentha spicata* (Abbaszadeh i sar., 2009).

2.1.2 *Mentha longifolia* (divlja nana)

Crna Gora je bogata i divljom vrstom nane (slika 2). *Mentha longifolia* je varijabilna vrsta u pogledu visine stabla, veličine i oblika listova, a njena identifikacija je dodatno iskomplikovana čestom hibridizacijom sa drugim vrstama iz porodice *Mentha* (Jovović i sar., 2020; Bokić 2021).



Slika 2. *Mentha longifolia* <https://plantsam.com/mentha-longifolia>

Sreće se kao samonikla biljka na zapuštenim zemljištima, ivicama šuma, a naseljava i vlažne livade i čistine pored obala potoka i rijeka planinskih područja, ali se javlja i u nizijskom pojasu na suvljim livadama, duž puteva i kanala (Tucker i Naczi, 2007). Divlja nana je višegodišnja, zeljasta biljka sa snažno razvijenim sistemom rizoma, prijatnog mirisa na mentol ili limun. Stablo je visine od 60 cm do 180 cm, najčešće uspravno, veoma razgranato, na poprečnom presjeku četvorouglasto, gotovo golo ili u gornjem dijelu prekriveno jednostavnim dlakama. Liska je istaknutija ukoliko su listovi pri osnovi zaobljeni. Listovi su tamnozeleni ili sivobijeli, a čašica zvonasta. Krunica je dugačka 4–5 mm, ružičaste ili ljubičaste boje, rijetko bijele (obično kod ženskih cvjetova). Cvjeta od jula do septembra (Harley, 1972).

2.1.3 Upotreba pitome i divlje nane

Među ljekovitim biljkama, vrste roda *Mentha* ispoljavaju višestruka zdravstvena dejstva npr. antimikrobna, antiinflamatorna, antidijabetička i kardioprotektivna, kao rezultat svog antioksidativnog potencijala (Brahmi i sar., 2017; Mamadalieva i sar., 2020), niske toksičnosti i visoke efikasnosti djelovanja (Tafrihi i sar., 2021). Biljke iz roda *Mentha* prepoznate su kao ljekovite biljke, koje se tradicionalno koriste za liječenje i prevenciju velikog broja oboljenja. Veliki broj taksona roda *Mentha* se još od davnina gaji zbog jedinstvenog ukusa, mirisa i terapijskih svojstava, kao svjež ili suv materijal se koristi za pripremu čajeva i pića, kao začini, dodaci hrani, ljekovima za gastrointestinalne, kardiovaskularne, respiratorne ili neurološke probleme, kozmetički proizvodi ili insekticidi (Mamadalieva i sar., 2020).

Svježi i sušeni biljni materijali biljaka iz roda *Mentha* se koriste u industriji konditorskih proizvoda, u proizvodnji farmaceutskih proizvoda, kozmetike itd. Fitokemikalije dobijene iz roda *Mentha* su pokazale antikancerogeno dejstvo protiv različitih vrsta karcinoma kod ljudi, tako je dokazano da djeluju na karcinom grlića materice, pluća i dojke (Tafrihi i sar., 2021). Mogu da se koriste za snižavanje nivoa holesterola, liječenje hipertenzije, prehlade, mučnine i povraćanja, djeluju umirujuće kao sedativ, ublažuju glavobolje i vrtoglavice. Osim toga, pozitivno djeluju na bolesti izazvane narušenim metabolizmom (Hanildou i sar., 2004; Karousou i sar., 2006; Redžić 2007; Tsioutsiou i sar., 2019). Dodatno, poznat je i značaj fitohemikalija iz roda *Mentha* za čišćenje urinarnog trakta, liječenje insomnije, anksioznosti, depresije, aritmije, upale grla, astme, prehlade i stomačnih problema (Šarić-Kundalić i sar., 2010; Šarić-Kundalić i sar. 2011).

U terapiji oboljenja nervnog i krvnog sistema biljni preparati se najčešće upotrebljavaju u obliku čaja (Bektić i sar., 2019). Brojna ljekovita svojstva pitome nane su naučno dokazana i priznata, a svakodnevno se primjenjuje i u narodnoj medicini, kao čaj i kao začim (Dragumilo 2021). *Mentha piperita* se često koristi kao narodni lijek jer je bogat izvor sekundarnih metabolita. Pripisuju joj se antigljivično, antivirusno, antimikrobno, insekticidno, antioksidativno dejstvo, ali se takođe koristi kao supresor centralnog nervnog sistema (sedativ). Vodeni i etanolni ekstrakti pitome nane posjeduju i antibakterijsko dejstvo (Patil i Godghate, 2016). Navedeno je i da se primjenjuje i kao lijek za bolesti srca, visoki pritisak, crijevne upale, parazite, kao i za njegu usta, zuba, stopala, povoljno utiče na metabolizam žuči i kod poremećaja varenja a koristi se i za respiratorne, kožne i stomačne probleme (Brahmi i sar., 2017).

Mentha longifolia se koristi za čišćenje krvi, liječenje groznice, glavobolje, migrene, visokog pritiska, crijevnih parazita, kamena u bubregu, sunčanice, pozitivno djeluje na metabolizam

holesterola, žuči, varenje, zarastanje rana, primjenjuje se nakon ujeda, za higijenu usta i zuba, kod respiratornih i kožnih problema. U vidu čaja se konzumira kao sedativ jer djeluje opuštajuće na nervni sistem i probleme gastrointestinalnog sistema (Jarić i sar., 2006; Pieroni i sar., 2011; Jarić i sar., 2014; Bokić, 2021).

Pitoma i divlja nana su korisne i za opšte jačanje organizma (Bokić, 2021). Navode se i kao "biljke koje mogu da liječe sve" (Pieroni i sar., 2011; Nedelcheva i sar. 2017).

2.2 Antioksidativna jedinjenja

2.2.1 Definicija i podjela antioksidativnih jedinjenja

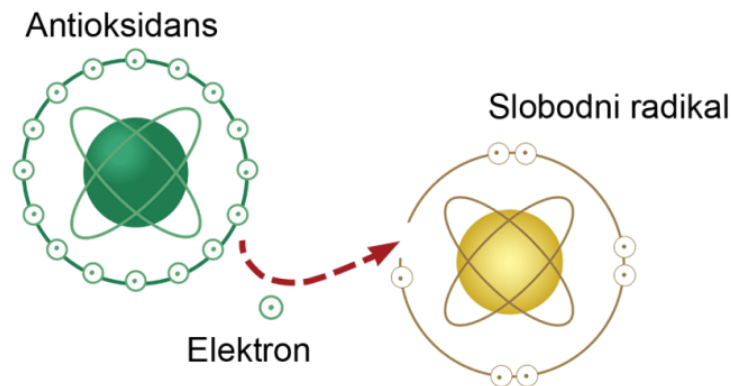
Antioksidansi se definišu kao komponente koje mogu da odlože ili spriječe oksidaciju drugih biomolekula (enzima, proteina, lipida i nukleinskih kiselina), jer predstavljaju donore atoma vodonika, elektrona i mogu da heliraju katjone metala i na taj način neutrališu slobodne radikale. Kao najznačajniji izdvajaju se antioksidativna jedinjenja, odnosno fenolne kiseline, flavonoidi, lignani, tanini i drugi (Dai i Mumper, 2010).

Organska jedinjenja koje biljke sintetišu se mogu podijeliti na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti utiču na rast i razvoj biljaka, a nastaju u raznim procesima kao što su fotosinteza, sinteze aminokiselina, proteina, enzima, proces glikolize i slično. U primarne metabolite spadaju šećeri, aminokiseline, nukleinske kiseline i njihovi polimeri, koje biljke koriste za svoj rast, razvoj i reprodukciju. Sekundarni proizvodi metabolizma su jedinjenja koja su od velikog značaja za opstanak biljke, bez energetskog su značaja i nijesu u direktnoj vezi sa rastom i razvićem biljaka (Šarčević-Todosijević i sar., 2019). Hemijska raznolikost sekundarnih metabolita predstavlja izuzetno bogat biogeni resurs za otkrivanje novih i za razvoj inovativnih lijekova. Sekundarni metaboliti se nalaze u tkivu biljke ili reaguju sa drugim sastojcima biljnog tkiva, pri čemu se stvaraju različiti kompleksi (Šarčević-Todosijević i sar., 2019).

2.2.2 Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi su u organizmu prisutni u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje i značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata. Djelovanje antioksidanasa zasniva se na njihovoj sposobnosti da djeluju kao hvatači slobodnih radikala tj. kao donori elektrona ili H-atoma peroksil ili hidroksil radikalima, zatim kao akceptori elektrona ili H-atoma ugljenikovih slobodnih radikala, pri čemu se slobodni radikali stabilizuju

(slika 3) (Masella i sar., 2005). Mogu da djeluju i tako što kompleksiraju jone metala čime sprečavaju katalizu reakcije stvaranja inicijatora oksidacije lipida (Vaya i Aviram, 2001).



Slika 3. Dejstvo antioksidansa (<https://www.glutathionpremium.com/oksidativni-stres>)

Slobodni radikali (SR) su termodinamički nestabilni atomi, molekuli ili fragmenti molekula koji u svom sastavu sadrže jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 1985). Obilježavaju se velikim latiničnim slovom R sa tačkom (R•) koja simbolizuje nespareni elektron, a ovaj elektron je uzrok visoke i neselektivne reaktivnosti slobodnih radikala. U slobodne radikale se ubrajaju reaktivne vrste kiseonika i reaktivne vrste azota. U organizmu su tokom normalnih metaboličkih procesa, prisutni u veoma niskim koncentracijama (10^{-5} - 10^{-9} mol/dm³) i u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma (Zirojević i sar., 2002; Finkel, 2003). Međutim, pri nekontrolisanom stvaranju slobodnih radikala dolazi do oksidativnog stresa i tada količina slobodnih radikala prevazilazi antioksidativni kapacitet ćelije (Macip i sar., 2006). Nastajanje slobodnih radikala u biološkim sistemima može biti uzrokovano različitim endogenim (prooksidativni enzimski sistemi, proces ćelijske respiracije, fagocitoze, itd.) i egzogenim (zračenje, kontaminiran vazduh, itd.) faktorima (Valko i sar., 2007).

Mehanizam oksidativnog oštećenja odvija se u više faza:

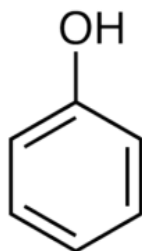
1. stvaranje slobodnih radikala;
2. nastali radikali iniciraju stvaranje još reaktivnijih oksidansa, i
3. oksidansi oštećuju i inaktiviraju biomolekule (Fridovich i Porter, 1981; Bielski i sar., 1983)

Aerobni organizmi svakodnevno su izloženi djelovanju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) čiji su efekti pod kontrolom odgovarajućih antioksidantnih sistema (AOS). Kada u biološkim sistemima dođe do velike produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota, ovi molekuli dalje reaguju sa

ćelijskim komponentama izazivajući oštećenja DNK, oksidativnu modifikaciju proteina i polinezasićenih masnih kiselina. Što dalje vodi ka nastanku degenerativnih procesa, oboljenja centralnog nervnog sistema i kancera (Halliwell i Gutteridge, 1999). Oksidativni stres dovodi do oštećenja primarnih biomolekula: proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata, što dalje može dovesti do čitavog niza poremećaja u metabolizmu i nastanka mnogih oboljenja. Uklanjanje reaktivnih oblika kiseonika kao i ublažavanje njihovih štetnih dejstava preduslov je života u aerobnim uslovima (Halliwell i sar., 2005). Antioksidativna jedinjenja u biljkama imaju značajnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala, obezbeđujući tako zaštitu ljudima od oksidativnog oštećenja DNK (Arumugam i sar., 2006). Slobodni radikali oksidišu makromolekule predajući im svoje nesparene elektrone i time mijenjaju njihovu funkciju a samim tim dovode do oštećenja ćelije. Nasuprot tome antioksidansi neutrališu slobodne radikale i tako štite tkiva od oštećenja, odnosno organizam od različitih bolesti (Đorđević, 2019). Biljni ekstrakti i fitokonstituenti su efikasani antioksidansi jer uklanjaju slobodne radikale i inhibiraju lipidnu peroksidaciju (Matejić, 2013). Sadržaj antioksidativnih jedinjenja u ekstraktu direktno zavisi od brojnih faktora, kao što su postupak ekstrakcije, rastvarač, stepen usitnjenosti biljnog materijala, organa biljke koji je upotrebljen za ekstrakciju (Gupta i sar., 2012).

2.2.3 Fenolna jedinjenja

Fenoli predstavljaju veliku grupu hemijskih jedinjenja koji u svom sastavu sadrže najmanje jedan aromatični prsten, sa jednom hidroksilnom grupom ili više hidroksilnih grupa koje mogu biti metilovane ili esterifikovane (slika 4) (Leucuta i sar., 2005).



Slika 4. Strukturna formula fenola <https://www.chemistrystudent.com>

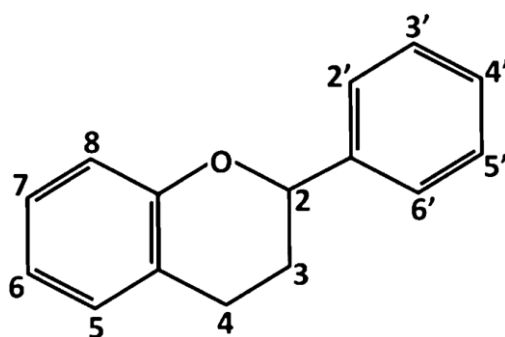
Fenolna jedinjenja iako su kao produkti sekundarnog metabolizma, podložni promjenama usled dejstva abiotičkih i biotičkih faktora, mogu ukazati na hemijsku varijabilnost biljnih taksona. Kao sekundarni metaboliti značajno su zastupljeni kod ljekovitih i aromatičnih biljaka i

antioksidativno djelovanje biljnih ekstrakata uglavnom se vezuje za njihovo prisustvo (Dai i Mumper, 2010). Ova jedinjenja su rastvorljiva u vodi i javljaju se kao bezbojne tečnosti ili bijele čvrste materije na sobnoj temperaturi. U zavisnosti od strukture, koja može biti sa jednim aromatičnim prstenom do složenih polimera kao što su tanini i lignini, fenolna jedinjenja su podijeljena u veliki broj klasa. Smatra se da obuhvataju više od 8.000 poznatih jedinjenja. (Gurib-Fakim, 2006; Wade, 2018). Zbog svoje strukture, veoma su efikasni hvatači slobodnih radikala, a služe i kao helatori metala (Hedges i sar., 2007). Posjeduju snažnu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Šarčević-Todosijević i sar., 2019).

Dodatno, biljni fenoli mogu da utiču na esencijalne fiziološke procese kao što je regulacija transkripcije, permeabilnost membrane, signalna transdukcija, mogu da indukuju ili inhibiraju oksidativne procese i utiču na intenzitet fotosinteze i ćelijskog disanja (Bidel i sar., 2010).

2.2.4 Flavonoidi

Flavonoidi su jedinjenja široko rasprostranjena u biljkama, različitih hemijskih struktura i funkcionalnih uloga (Jaakola i Hohtola, 2010). To su sekundarni metaboliti koji nemaju direktan uticaja na rast i razvoj biljaka. Ova jedinjenja su moćni antioksidansi koji djeluju kao hvatači slobodnih radikala. Osnovnu strukturnu jedinicu flavonoida čini difenilpropan (C₆-C₃-C₆) (slika 5) (Guntarti i sar., 2017; Milić i sar., 2000; Ku-Vera i sar., 2020). Većina flavonoida su žute boje i od njih potiče karakteristična boja cvjetova mnogih biljaka. Zbog različite strukture njihova funkcija u organizmu je različita, a za neke od njih još uvijek i nepoznata (Gurib-Fakim, 2006).



Slika 5. Osnovna strukturna jedinica flavonoida (Ku-Vera i sar., 2020)

Flavonoidi imaju širok spektar pozitivnog djelovanja na zdravlje (antioksidativno, antiinflamatorno, antimutageno i antikancerogeno dejstvo) i nalaze primjenu u različitim farmaceutskim i kozmetičkim preparatima (Panche i sar., 2016). Pored navedenih karakteristika, ova

jedinjenja su odgovorna i za organoleptičke i nutritivne karakteristike hrane i pića (Gutierrez i sar., 2017). Sintetišu se u biljnim ćelijama kako u normalnim uslovima, tako i kao odgovor na određeni stres. Ova jedinjenja su važna karika u procesu razmnožavanja, odbrane i u odnosima sa biotičkim i abiotičkim faktorima spoljašnje sredine. Na akumulaciju flavonoida u biljnim tkivima utiče više faktora, uključujući i stres koji može biti posledica povrede ili nekog vida interakcije sa patogenim bakterijama, virusima ili gljivicama (Cheynier i sar., 2013). Flavonoidi štite biljku od UV-štetnih efekata. Koncentrisani su u sjemenu, plodu, listu, cvijetu, kori ljekovitih biljaka, a njihov sadržaj varira u zavisnosti od biljne vrste, ekoloških i antropoloških faktora (Gurib-Fakim, 2006, Šarčević-Todosijević i sar., 2019).

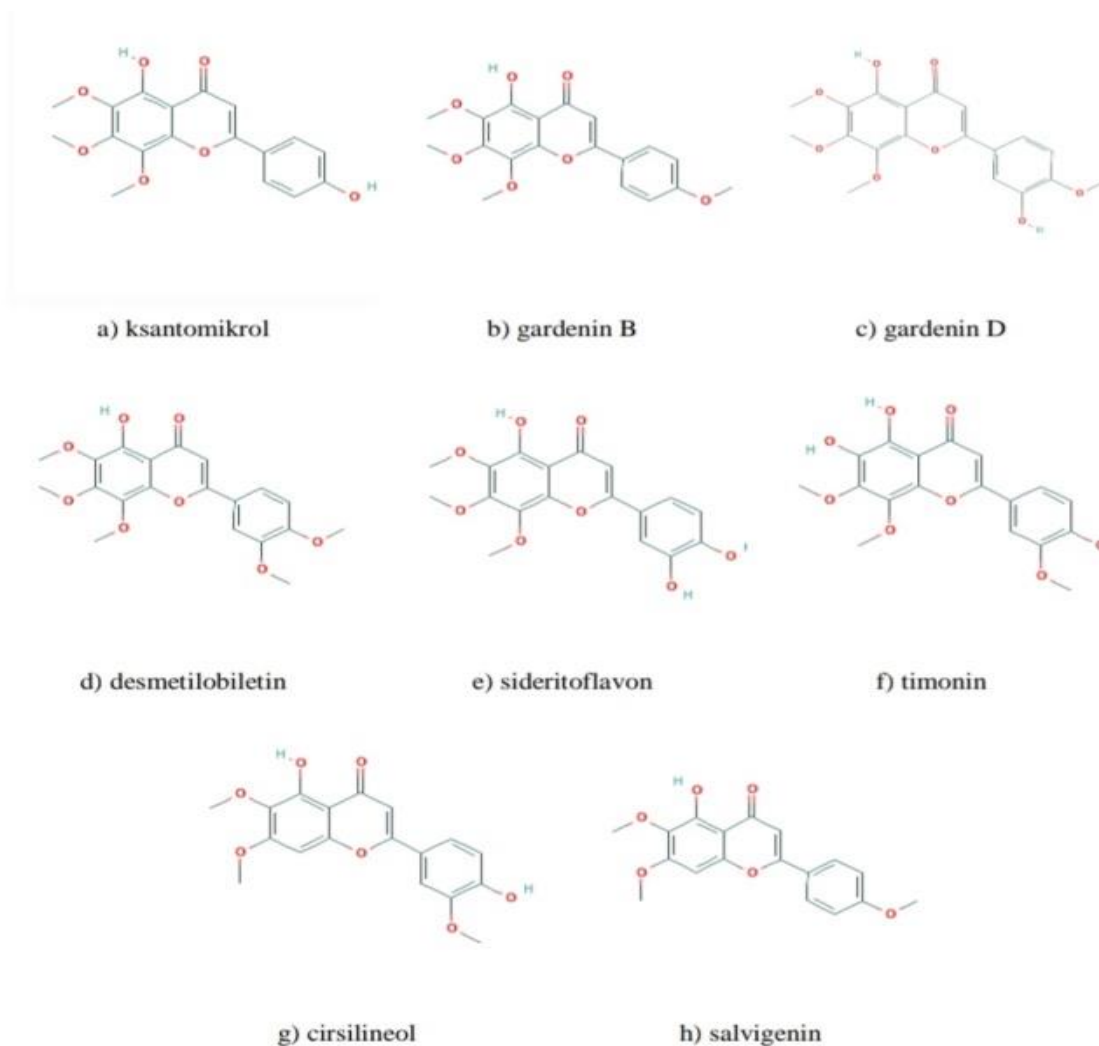
2.2.5 Hemijski sastav pitome i divlje nane

Vrste roda *Mentha* sadrže veliki broj biološki aktivnih komponenti, a njihov sadržaj u velikoj mjeri varira među vrstama (Salehi i sar., 2018). Kvantitativno-kvalitativni sastav sekundarnih metabolita se može mijenjati u zavisnosti od vegetativne faze, godišnjeg perioda, stanja i ispitivanog dijela biljke, ali i oksidativnog stresa. Fenolne kiseline (npr. ruzmarinska i kafeinska kiselina), flavoni (npr. derivati luteolina) i flavanoni (npr. derivati eriocitrina) su glavni antioksidansi dok vitamini antioksidansi (npr. askorbinska kiselina i karotenoidi) imaju mali doprinos ukupnom antioksidativnom potencijalu (Brahmi i sar., 2017). Sumirajući istraživanja o fenolnom sadržaju roda *Mentha*, izdvojeni su kafeinska kiselina i njeni derivati (npr. ruzmarinska i hlorogenska kiselina) kao glavna fenolna jedinjenja, zabilježena kod najvećeg broja vrsta i u najvećoj koncentraciji (Pereira i Cardoso, 2013; Brahmi i sar., 2017). Neke masne kiseline kao što su linolna, linolenska i palmitinska kiselina identifikovane su u biljkama *Mentha* (Mamadaliyeva i sar., 2020).

Flavonoidi pitome nane su zastupljeni u obliku lipofilnih polisupstituisanih flavon glikozida (O-metilovani apigenin i luteolin) i kao flavon i flavanon glikozida, čiji sadržaj ponekad doseže i do 17%. Ustanovljeno je da su najzastupljenija fenolna jedinjenja pitome nane eriocitrin, kvercetin, apigenin, luteolin, rutin i ruzmarinska kiselina (Mišan, 2020). Flavonoidni glikozidi, eriocitrin, narirutin, hesperidin, luteolin-7-O-rutinozid, izorhoifolin, diosmin i ruzmarinska kiselina izolovani su iz nadzemnog dijela *Mentha piperita* (Inoue i sar., 2002).

Za rod *Mentha* su generalno karakteristični niskopolarni visokometilovani flavonoidi, kao što su ksantomikrol, gardenin B i D, desmetilobiletin, sideritoflavon, timonin, cirsilineol, salvigenin. Na slici 6 su prikazane hemijske strukture najznačajnijih niskopolarnih visokometilovanih

flavonoida u rodu *Mentha*. Pored navedenih jedinjenja bilježe se i luteolin i apigenin i njihovi derivati, timuzin, peberlin, sorbiofolin, landanein i drugi. Od flavanona, najčešće su registrovani eriodiktiol, eriocitrin, naringenin i hesperidin, dok se flavonoli i dihydroflavonoli (kvercetin, rutin i kemferol) navode u manjoj mjeri i to za vrstu *Mentha piperita* (Mimica-Dukić i Božin, 2007; Mimica-Dukić i Božin, 2008; Pereira i Cardoso 2013; Bokić, 2021).



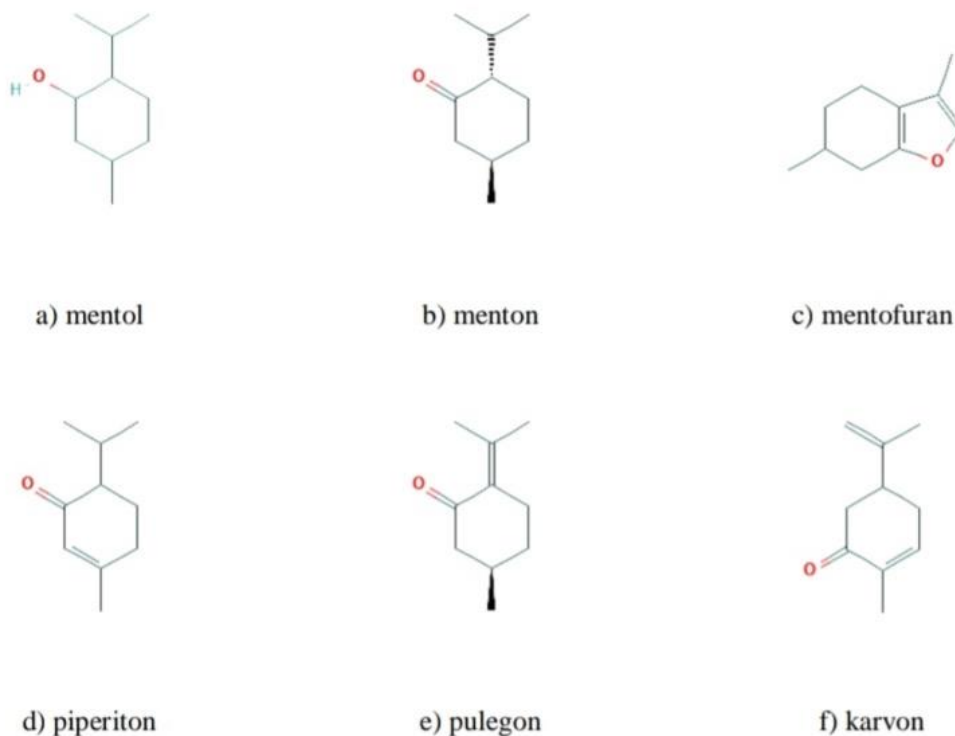
Slika 6. Hemijske strukture najznačajnijih niskopolarnih visokometilovanih flavonoida u rodu *Mentha* (Bokić, 2021).

Analiza isparljivih bioaktivnih komponenata se smatra veoma značajnom za bolje poznavanje biljnih vrsta (Bokić, 2021). Salehi i sar. (2018) izdvajaju ruzmarinsku kiselinu, glikozide luteolin, salvianoličnu kiselinu, eriocitrin i hesperidin kao glavne fenolne komponente u vrstama roda *Mentha*. Vodeni ekstrakti pitome nane sadrže glikozid eriocitrin i ruzmarinsku

kiselinu (Mišan, 2020).

Najvažnija jedinjenja koja se izdvajaju u etarskom ulju pitome nane su mentol, menton, mentil acetat, mentofuran, pulegon, izomentol, izomenton, limonen i eukaliptol, dok su kod divlje nane to mentol, menton, karvon, cineol (ESCOP 1992; Hussain i sar., 2010; Al-Okbi i sar., 2015). Mamadalieva i saradnici (2020) kao najbrojnija i uglavnom dominantna jedinjenja navode monoterpene C3-oksidovalane p-mentanske klase (npr. mentol i menton i njihovi derivati, pulegon, piperiton i piperitenon) ili C6-oksidovalane p-mentane (npr. karvon).

Na slici 7 su prikazane hemijske strukture najznačajnijih isparljivih jedinjenja u rodu *Mentha* (Bokić, 2021).



Slika 7. Hemijske strukture najznačajnijih isparljivih jedinjenja roda *Mentha* (Bokić, 2021)

Nikšić i saradnici (2012) su kao glavna antioksidativna jedinjenja vrste *Mentha longifolia* sa područja Bosne i Hercegovine izdvojili piperiton oksid (63,58%) i 1,8-cineol (12,03%). Mastelić i Jerković (2002) su kao glavna antioksidativna jedinjenja vrste *Mentha longifolia* sa područja Hrvatske izdvojili karvon (33,48%) i piperitenon oksid (28,95%).

Na sastav isparljivih jedinjenja utiče genetski sklop, skup spoljašnjih faktora koji djeluju na biljku, tehnika uzgajanja i čuvanja, stepen ontogenetskog razvoja, tip biljnog organa koji je korišćen

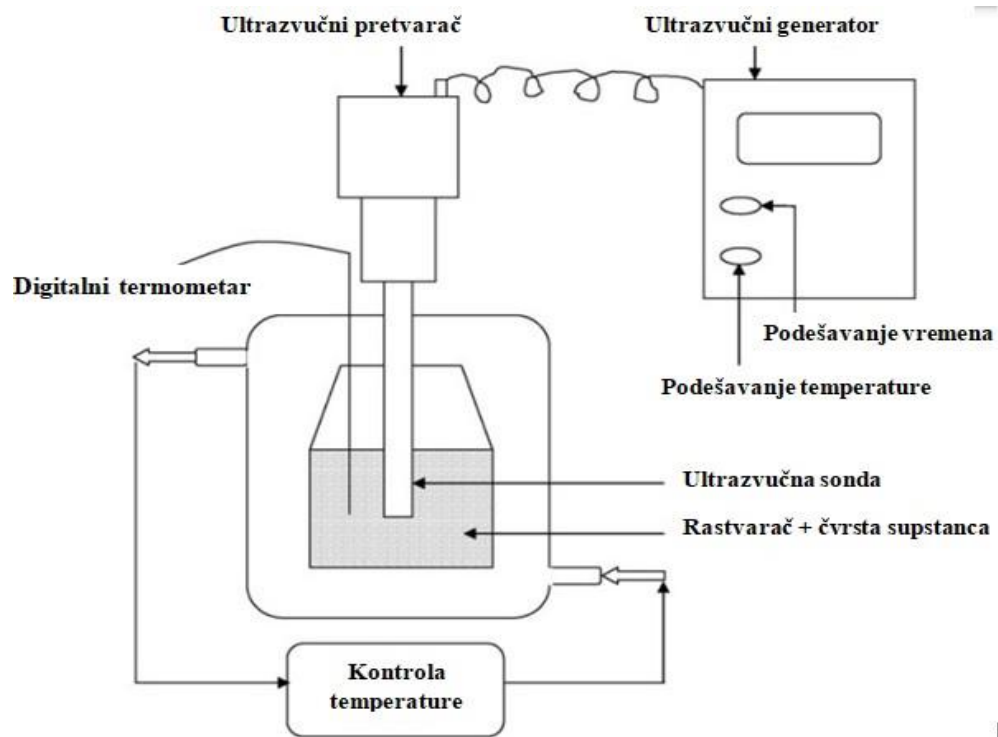
u analizi, primjenjene tehnike izolovanja i rastvarača prilikom obrade biljnog materijala (Fialova i sar., 2015; Salehi i sar., 2018).

2.3 Postupci ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja

Proces prerade ljekovitog bilja sastoji se od nekoliko tehnoloških operacija, koje obuhvataju pranje, sušenje, mehaničku preradu i ekstrakciju. Priprema uzoraka je od velikog značaja za analizu komponenata prisutnih u biljkama i biljnim preparatima (Gupta i sar., 2012). Pranje se primjenjuje samo za biljne djelove koji se razvijaju u zemlji, kao što je korijen i slično. Sušenje biljne sirovine je veoma važan proces koji se obavlja prirodnim ili mehaničkim putem. Mehanička obrada obuhvata usitnjavanje, prosijavanje i otprašivanje biljnog materijala. Usitnjavanjem se dobijaju frakcije različite veličine, koje se zatim koriste u daljoj preradi (Živanović-Turudija, 2015). Ekstrakcija predstavlja postupak izdvajanja i koncentrisanja ciljanih jedinjenja iz biljnih tkiva primjenom selektivnih rastvarača i standardnih procedura (Savić, 2014). Potvrđeno je da prilikom izolovanja i identifikacije različitih bioaktivnih materija iz biljaka veoma važnu ulogu imaju metode ekstrakcije i izbor odgovarajućeg rastvarača, koji utiču i na stabilnost i na kvalitet dobijenog ekstrakta (Gupta i sar., 2012). Najčešće korišćene metode ekstrakcije biološki aktivnih materija iz ljekovitih i aromatičnih biljaka su: maceracija, digestija, ultrazvučna, turboekstrakcija, (re)perkolacija i cirkulatorna ekstrakcija (Savić, 2014). Ekstrakti ljekovitog bilja služe kao aktivna ili pomoćna komponenta u izradi velikog broja proizvoda farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije. Prinos hemijske ekstrakcije zavisi od vrste rastvarača sa različitim polaritetima i pH, vremena ekstrakcije i temperature, kao i od hemijskog sastava i fizičkih karakteristika uzorka (Xu i Chang, 2007). Savremenim metodama ekstrakcije biološki aktivnih materija iz biljaka se daje prednost u poređenju sa konvencionalnim metodama, posebno u smislu smanjenja potrošnje rastvarača, minimalne degradacije komponenata i eliminacije nepoželjnih komponenti iz ekstrakta (Gupta i sar., 2012). Ne postoji univerzalni postupak ekstrakcije koji bi bio pogodan za ekstrakciju svih biljnih fenola. Najčešći polarni rastvarači koji se upotrebljavaju za tečno-čvrstu ekstrakciju su metanol, etanol, voda i smješa etanola/metanola i vode u različitim odnosima. Prilikom ekstrakcije aktivnih komponenti iz vrsta roda *Mentha* uglavnom se koriste smješe metanola i vode kao i etanola i vode u različitim odnosima, ali i petroletar, butanol, aceton, n-heksan itd. (Hassan i sar., 2020). Tehnologija ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja iz ljekovitog bilja je danas na visokom tehnološkom nivou što omogućava dobijanje ekstrakta definisanog kvaliteta (Xu i Chang, 2007; Hassan i sar., 2020; Azahar i sar., 2020; Bokić, 2021).

2.3.1 Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija predstavlja metodu koja se koristi za izolovanje antioksidativnih jedinjenja iz različitih dijelova ljekovitih biljaka (Mussatto, 2015). Princip metode se zasniva na korišćenju ultrazvuka, pri čemu se usled ultrazvučnih vibracija formiraju mikro pukotine i pore na površini ćelijskog zida i dolazi do povećanja ćelijske propustljivosti. Ultrazvuk su mehanički talasi čija je frekvencija veća od opsega čujnih frekvencija ljudskog sluha (20 Hz do 20 kHz) (Kumar i sar., 2021). Tačnije, ćelijski zid postaje propustljiv za rastvarač i dolazi do oslobađanja sadržaja iz biljnih ćelija i difuzije jedinjenja iz čvrste u tečnu fazu (Trifunović-Špirović i Tojić, 2022). Ekstrakcija se izvodi tako što se materijal prelije određenim rastvaračem i stavi u ultrazvučno kupatilo, a vrijeme i temperatura ekstrakcije se kontrolišu (Altemimi i sar., 2017). Postupak ultrazvučne ekstrakcije je prikazan na slici 8 (Zhao i sar., 2007). Nakon ekstrakcije, ekstrakt se mora odvojiti od uzorka filtracijom ili centrifugiranjem (Kim i sar., 2012). Sposobnost ultrazvuka da izazove i poboljša efikasnost ekstrakcije zavisi od osobina samog zračenja (frekvencije i snage), osobina rastvarača i uslova sredine (Henglein i Kormann, 1985). Prednost ove metode je što omogućava ekstrakciju i termički labilnih komponenti.



Slika 8. Ultrazvučna ekstrakcija (Zhao i sar., 2007).

2.3.2 Maceracija

Maceracija je klasična, vrlo jednostavna metoda ekstrakcije koja se izvodi na sobnoj temperaturi tako što se usitnjeni biljni materijal potopi u rastvarač na određeno vrijeme. Efikasnost ekstrakcije zavisi od vremena i primjenjenog rastvarača (Gurib-Fakim, 2006).

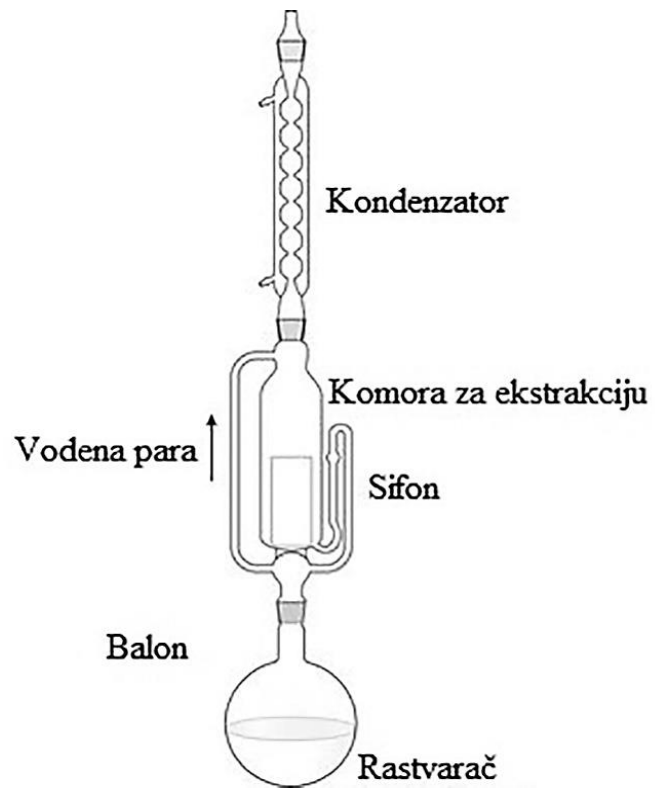
Rastvarač se bira na osnovu hemijske prirode jedinjenja sadržanih u biljci. Najčešće se koristi alkohol jer ekstrahuje veći dio aktivnih sastojaka sadržanih u biljci, uključujući molekule koji su hidrofilni, rastvorljivi u vodi ili lipofilni i rastvorljivi u ulju ili drugim organskim rastvaračima (Drinić, 2020). Tokom ovog procesa ćelijski zid biljke puca, prilikom čega dolazi do oslobađanja biološki aktivnih materija biljke. Dodirna površina između biljnog materijala i rastvarača može biti povećana miješanjem tokom procesa, čime se može povećati i efikasnost ekstrakcije određenog biološki aktivnog jedinjenja (Fonmboh i sar., 2020).

2.3.3 Digestija

Digestija predstavlja metodu koja se bazira na primjeni povišene temperature koja povećava efikasnost djelovanja primjenjenog rastvarača (Savić, 2014). Ova metoda se odvija tako što se biljni materijal potopi u rastvarač i zagrijava u vodenom kupatilu na temperaturi od 50 °C (Rudraswamy i sar., 2021). U cilju povećanja rastvorljivosti slabo rastvorljivih materija biljni material se tretira rastvaračima koji imaju nisku tačku ključanja npr. etanol (Handa i sar., 2008).

2.3.4 Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet (Sokslet) ekstrakcija je metoda koja traje dugo sa ciljem veće efikasnost ekstrakcije i nije pogodna za organska jedinjenja koja su termički nestabilna. Sokslet ekstraktor napravljen je od stakla i sastoji se od balona sa okruglim dnom, komore za ekstrakciju, sifonske cijevi i kondenzatora na vrhu (slika 9). Proces ekstrakcije zasniva se na kretanju pare, stvorene ključanjem rastvarača, prema uzorku koji se nalazi unutar Sokslet ekstraktora. Fino samljeven biljni materijal se stavlja u filter papir u obliku čaure, dobro se zatvara i postavlja u komoru za ekstrakciju. Rastvarač se nalazi u balonu koji se zagrijava. Nakon dostizanja temperature ključanja rastvarača, njegove pare prolaze kroz bočnu cijev do kondenzatora gdje se kondenzuje kada dođe u kontakt sa hladnom površinom. Kondenzovani rastvarač u obliku kapljica natapa čauru sa biljnim materijalom. Kada površina rastvarača premaši maksimalnu visinu sifona, rastvarač koji sadrži ekstrakt se vraća sifonom u balon sa rastvaračem. Ovaj proces je kontinuiran i izvodi se do trenutka kada se iscrpi biljni materijal, tj. kada korišćeni rastvarač u komori za ekstrakciju postane neobojen (Azahar i sar., 2020).

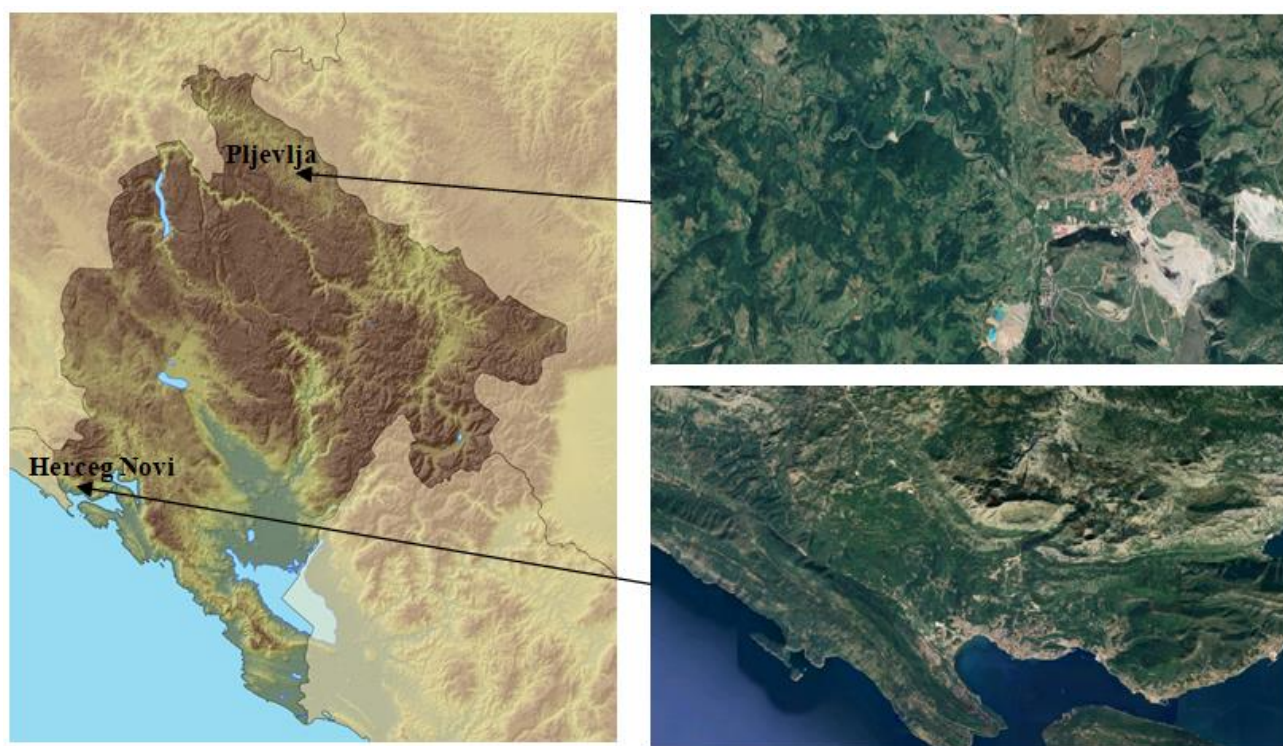


Slika 9. Soxhlet ekstraktor (<https://glossary.periodni.com/>)

3 EKSPERIMENTALNI DIO

Ekperimentalni dio ove master teze rađen je u laboratorijama za Organsku hemijsku tehnologiju, Analitičku hemiju i Instrumentalne metode analize na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici. U ovom radu je korišćen suvi nadzemni dio pitome (gajene) i divlje (samonikle) nane sa teritorije Crne Gore, tačnije sjevernog regiona (okolina Pljevalja) i južnog regiona (okolina Herceg Novog).

3.1 Karakteristike sjevernog i južnog regiona Crne Gore



Slika 10. Satelitska mapa Crne Gore i lokaliteti odabranih vrsta roda *Mentha*

Prema [Radojičiću \(2008\)](#) u Crnoj Gori se izdvajaju sjeverna, središnja i južna regija. Pljevlja pripadaju sjevernoj regiji Crne Gore, prosječne nadmorske visine 770 m. Pljevaljski kraj ima kontinentalnu klimu sa svježim ljetima i dugim i hladnim zimama. Sjeverna geografska širina ovog grada je $43^{\circ}22'$, a istočna geografska dužina $19^{\circ}22'$ (<https://geoportal.co.me/Geoportal01/>).

Herceg Novi je grad koji pripada južnoj regiji Crne Gore. U zaleđu ovog grada je masiv Orijena nadmorske visine 1850 m. Klima je mediteranska sa toplim ljetima i blagim zimama ([Radojičić 2008](#)). Sjeverna geografska širina ovog grada je $42^{\circ}29'$, dok je istočna geografska dužina $18^{\circ}32'$ (<https://geoportal.co.me/Geoportal01/>).

Razlike u klimi pojedinih krajeva na relativno malom rastojanju, specifičnost je Crne Gore. Među faktorima koji bitno utiču na klimu Crne Gore prioritet imaju geografska širina, udaljenost od mora, reljef, nadmorska visina, jezera, tlo, biljni pokrivač i rad čovjeka (Radojčić 2008).

3.2 Hemikalije, aparature i instrumenti

Za ispitivanje antioksidativnih jedinjenja u ovom eksperimentalnom radu korišćeni su sledeći reagensi i rastvori: etanol, destilovana voda, natrijum-karbonat (Na_2CO_3), Folin–Ciocalteu reagens (FC reagens), galna kiselina, aluminijum(III)-hlorid heksahidrat ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), quercetin 95%, acetatni pufer, hlorovodonična kiselina (HCl, 35%), 2,4,6-tripiridil-triazin (TPTZ), gvožđe(III)-hlorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), natrijum-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), glacijalna sirćetna kiselina.

Od instrumenata je korišćen BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar, ultrazvučno kupatilo SONIC ViMS 4GT (slika 11), aparatura za Sokslet ekstrakciju (slika 12), sušnica.



Slika 11. Ultrazvučno kupatilo (Autor: Ranka Dujović)



Slika 12. Korišćeni Soxhlet ekstraktor (Autor: Ranka Dujović)

3.3 Priprema biljnog materijala

U master radu vršena je ekstrakcija nadzemnog dijela pitome i divlje nane, upotrebom 70% etanola i destilovane vode, a korišćene su četiri metode ekstrakcije (ultrazvučna ekstrakcija, digestija, maceracija i Sokslet ekstrakcija). Materijal je čuvan u papirnim vrećama na tamnom i suvom mjestu do analize, kako bi se spriječio uticaj spoljašnje sredine. Osušeni materijal je usitnjen kako bi se od njega dobila homogena praškasta masa (slika 13). Određen je stepen usitnjenosti, pri čemu je za prosijavanje biljnog materijala korišćen set sita ERWEKA (3mm, 2mm, 1mm, 0,2mm i 0,1mm). Stepen usitnjenosti utvrđen je pomoću veličine srednjeg prečnika čestica (d), koji se dobija primjenom sledećeg izraza:

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i}$$

Gdje je: m_i – maseni procenat i -te frakcije, d_i – prečnik otvora sita.



Slika 13. Usitnjeni biljni materijal (Autor: Ranka Dujović)

U nastavku eksperimentalnog dijela uzorci su korišćeni za proces dobijanja biljnih ekstrakata različitim metodama ekstrakcije. Kao rastvarači u eksperimentima korišćeni su etanol i destilovana voda. Dobijeni ekstrakti su dalje tretirani u cilju analize hemijskog sastava kao i procjene antioksidativne aktivnosti.

Za ultrazvučnu ekstrakciju: oko 5 g osušenog, usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 50 mL rastvarača (70% etanol ili voda). U ultrazvučnom kupatilu vršena je ekstrakcija u vremenu od 30 minuta na frekvenciji od 50 Hz i na sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakti su profiltrirani i odloženi u frižider (4 °C) do upotrebe.

Za digestiju: Oko 5 g osušenog, usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 50 mL rastvarača (70% etanol ili voda). Ekstrakcija je izvođena na temperaturi od 50 °C tokom 30 minuta, uz povremeno miješanje. Dobijeni ekstrakti su profiltrirani i odloženi u frižider (4 °C) do upotrebe.

Za maceraciju: Oko 5 g osušenog, usitnjenog biljnog materijala preliveno je sa 50 mL korišćenog rastvarača (70% etanol i voda). Ekstrakcija je izvođena na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, uz povremeno miješanje. Dobijeni ekstrakti su profiltrirani i odloženi u frižider (4 °C) do upotrebe.

Za ekstrakciju po Soksletu: 10 g osušenog, usitnjenog biljnog materijala je stavljeno u čauru od filter papira i dobro zatvoreno. Čaura je postavljena u komoru za ekstrakciju. U balon je nasuto 200 mL 70% etanola, a cijela aparatura stavljena na grejno tijelo. Ekstrakcija je vršena na

temperaturi ključanja rastvarača i cijeli proces se nastavlja više puta, odnosno sifoniranje je vršeno pet puta. Ekstrakti su profiltrirani i odloženi u frižider (4 °C) do upotrebe.

3.4 Kvantitativne metode određivanja sadržaja antioksidativnih jedinjenja

Spektrofotometrija je analitička metoda kojom se mjeri količina svjetlosti koju uzorak apsorbira, pri čemu je opseg talasnih dužina svjetlosti u oblasti ultraljubičastog i vidljivog dijela spektra. Ova metoda proučava linearna optička svojstva materijala, kako se svjetlost koja pada na materijal reflektuje, prenosi, apsorbira i raspršuje medijum. Svaka supstanca apsorbira svjetlost na drugačiji način i ima jedinstven UV-VIS spektar. Samim tim, spektrofotometrijska mjerenja se koriste za identifikaciju ili kvantifikaciju supstance. Spektrofotometrijska mjerenja se takođe mogu koristiti za ispitivanje unutrašnje fizičke prirode materijala, kao što je njegov indeks prelamanja. Metoda se može koristiti i za kvalitativnu hemijsku analizu jer izgled apsorpcionog spektra zavisi od sastava i strukture supstance (Germer i sar., 2014).



Slika 14. Korišćeni spektrofotometar (Autor: Ranka Dujović)

3.4.1 Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj antioksidativnih jedinjenja (fenola) u ekstraktima pitome i divlje nane određen je spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteu, prema protokolu Jakovljevića i saradnika (2015) uz određene modifikacije. Ova reakcija predstavlja antioksidativni test koji se bazira na transferu elektrona, koji mjeri redukcionu kapacitet antioksidansa (Lamuela-Raventós, 2017). Fenolna jedinjenja formiraju plavo obojeni kompleks sa Folin Ciocalteu reagensom u alkalnoj sredini, i intenzitet boje se mjeri na talasnoj dužini od 760 nm (Bancuta i sar., 2016). Intenzitet boje je

proporcionalan koncentraciji polifenola (slika 15). Ovaj test je jednostavan i široko se koristi za kvantifikaciju fenolnih jedinjenja u biljnim materijalima i ekstraktima (Dai i Mumper, 2010). Smatra se poželjnijim u poređenju sa drugim metodama jer ima široku primjenu u određivanju ukupnog sadržaja polifenola u hrani biljnog porijekla i biološkim uzorcima (Lamuela-Raventós, 2017).

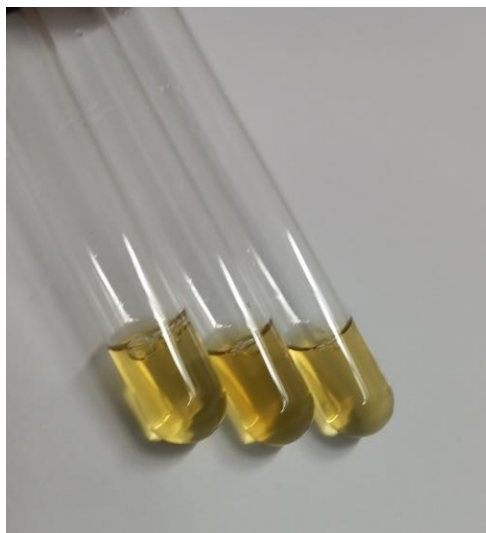
Postupak metode je koncipiran prema klasičnoj proceduri (Singleton i sar., 1999). U staklenu epruvetu se odmjeri 20 μ L ekstrakta uzorka, zatim se dodaje 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa (koji je prethodno razblažen destilovanom vodom deset puta) i 2 mL destilovane vode. Nakon 3 minuta stajanja na sobnoj temperaturi dodaje se 1 mL zasićenog 7,5% rastvora natrijum karbonata. Dobijena smješa se zatim inkubira 30 minuta na temperaturi od 50 °C u vodenom kupatilu. Nakon završenog perioda inkubacije očita se apsorbancija na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 760 nm. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali umjesto ekstrakta herbe nane dodat je korišćeni rastvarač. Rezultati su izraženi pomoću standardne krive. Kao standard za izradu kalibracione krive korišćena je galna kiselina. Rezultati ukupnog sadržaja fenola prikazani su kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u miligramima po gramu suve biljke prema dobijenoj formuli $Y=0,0057 X + 0,1203$, uz koeficijent determinacije $R^2=0,9913$. Mjerenje je izvršeno tri puta radi preciznosti i izračunata je srednja vrijednost dobijenih rezultata.



Slika 15. Plavo obojenje prilikom određivanja koncentracije fenola (Autor: Ranka Dujović)

3.4.2 Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Za određivanje sadržaja flavonoida korišćena je metoda sa aluminijum-hloridom uz određene modifikacije (Chandra i sar., 2014). Sadržaj ukupnih flavonoida određivan je spektrofotometrijski, metodom koja se zasniva na formiranju kompleksa između flavonoida i aluminijum hlorida (slika 16). U staklenu epruvetu se odmjeri 1,5 mL biljnog ekstrakta, zatim se doda 1,5 mL 2% rastvora $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. Pripremljena smješa je inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancije ovako pripremljenih rastvora su očitavane, nakon perioda inkubacije, na talasnoj dužini od 420 nm pomoću spektrofotometra. Za izradu kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora kvercetina (početne koncentracije 1 mg/L). Na osnovu izmjerenih apsorbanci, iz kalibracione krive određena je koncentracija flavonoida korišćenjem jednačine prave: $Y=0,0157 X + 0,3033$, uz koeficijent determinacije $R^2=0,9756$. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima ispitivanim u ovom radu je izražen kao mg ekvivalenta kvercetina na jedan gram suve biljke. Mjerenje je izvršeno tri puta radi preciznosti i izračunata je srednja vrijednost dobijenih rezultata.



Slika 16. Žuto obojenje prilikom određivanja koncentracije flavonoida (Autor: Ranka Dujović)

3.5 Metode za određivanje antioksidativnog potencijala

3.5.1 DPPH test- određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala

Pošto polifenolna jedinjenja i druga bioaktivna jedinjenja u biljnim ekstraktima ispoljavaju antioksidativnu aktivnost u biološkim sistemima na više načina potrebno je koristiti više metoda za procjenu antioksidativnog potencijal, kako bi se dobili što bolji rezultati. Za procjenu antioksidativne aktivnosti pitome i divlje nane korišćene su dvije metode, aktivnost uklanjanja slobodnih radikala DPPH testom i FRAP testom koji se bazira na mehanizmu heliranja metalnih jona.

Za procjenu antioksidativnog potencijala biljnih ekstrakata najčešće se koristi DPPH test. DPPH metoda je brza, jednostavna, jeftina i široko primjenjivana metoda za određivanje antioksidativnog potencijala (Kedare i Singh, 2011). DPPH[•] (molekul 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila) se karakteriše kao stabilan slobodni radikal zbog delokalizacije nesparenog elektrona u cijelom molekulu, tako da molekuli ne dimerizuju. DPPH molekul u etanolnom rastvoru ima tamnoljubičastu boju, koja se karakteriše apsorbancijom na oko 517 nm. Kada se rastvor DPPH pomiješa sa supstancom koja može donirati atom vodonika, dolazi do redukcije pri čemu rastvor gubi ljubičastu boju i prelazi u žutu (slika 17) (Kedare i Singh 2011, Behrendorff i sar., 2013).



Slika 17. Reakcija redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Behrendorff i sar., 2013)

Procenat inhibicije DPPH izračunat je prema sledećoj formuli (Blois, 1958):

$$\% \text{ DPPH} = 100 - [(A_s - A_b) \times 100 / A_c]$$

gdje je:

As – apsorbanca uzoraka koji su tretirani DPPH rastvorom,

Ab – apsorbanca uzoraka bez tretiranja DPPH rastvorom,

Ac – apsorbanca etanolnog rastvora DPPH.

Dobijeni rezultati korišćenjem DPPH metode su izraženi kao IC₅₀ vrijednosti koje predstavljaju koncentraciju uzorka koji dovodi do 50% neutralizacije DPPH· (Rivero-Cruz i sar., 2020). Promjena boje djeluje kao pokazatelj antioksidativne aktivnosti (slika 18).

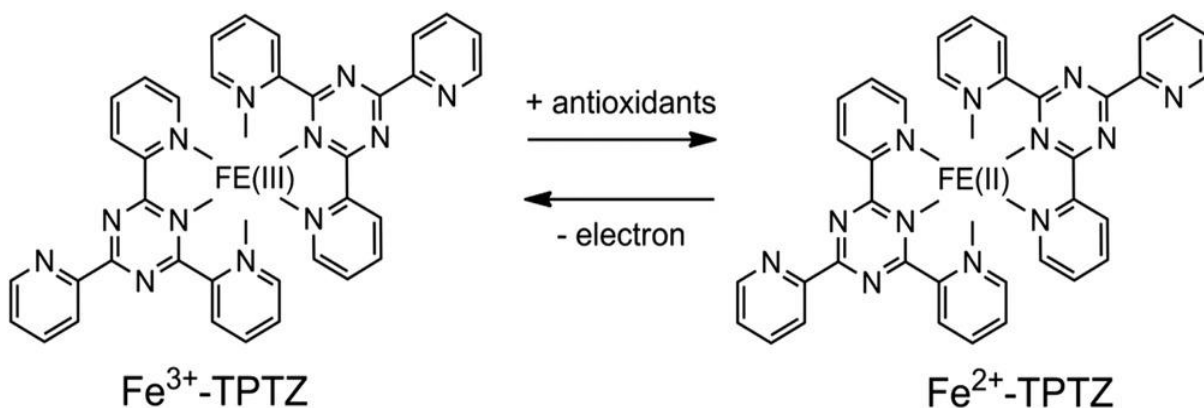
Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom, ekstrakta nane vrši se tako što se u 300 µL rastvora uzoraka (različitih koncentracija) doda po 2700 µL 0,1 mM rastvora DPPH i nakon pola sata čuvanja na tamnom mjestu izmjeri apsorbanca na λ=517 nm, koristeći rastvarač kao slijepu probu.



Slika 18. Promjena boje prilikom redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Autor: Ranka Dujović)

3.5.2 FRAP test- određivanje sposobnosti redukcije feri jona

Pored DPPH testa, za određivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata korišćen je i FRAP test. FRAP metoda se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da redukuju, žuto obojen kompleks $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$ do intenzivno plavo obojenog kompleksa $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$ u kiseloj sredini (Fernandes i sar., 2016). Redukcija jona Fe(III) u Fe(II) pri niskom pH dovodi do formiranja obojenog kompleksa Fe(III)-tripiridiltriazina koji dostiže apsorpcioni maksimum na 539 nm (Pavlović, 2012). FRAP analiza je jeftina, reagensi se jednostavno pripremaju, rezultati su veoma ponovljivi, a procedura je jednostavna i brza (Benzie i Strain, 1999). Na slici 19 je prikazana reakcija redukcije feri-TPTZ kompleksa (Xiao i sar., 2020).



Slika 19. Reakcija redukcije Fe (III)-TPTZ kompleksa (Xiao i sar., 2020)

Za procjenu antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata pripremljen je radni reagens FRAP upotrebom acetatnog pufera, TPTZ/HCl i gvožđe (III)- hlorid heksahidrata. Svježe pripremljeni FRAP reagens je inkubiran 10-15 minuta na temperaturi od 37 °C. U epruvetu je dodat 1 mL destilovane vode nakon čega su epruvete inkubirane 5 minuta na 37 °C. Po završetku perioda inkubacije, dodato je 20 µL test uzorka, 80 µL korišćenog rastvarača i 3 mL radnog FRAP reagensa. Pripremljena smješa je ponovo inkubirana 4 minuta na temperaturi od 37 °C, nakon čega se mjeri apsorbancija spektrofotometrom na talasnoj dužini od 593 nm uz slijepu probu za koju se koristi smješa od 100 µL rastvarača i 3 mL FRAP rastvora.



Slika 20. Plavo obojen kompleks $[\text{Fe}(\text{II})-(\text{TPTZ})_2]^2$ (Autor: Ranka Dujović)

Za konstrukciju kalibracione krive korišćena je serija standarnih rastvora gvožđa koji su pravljani od $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u FRAP reagensu. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ suve biljke (Benzie i Strain, 1999).

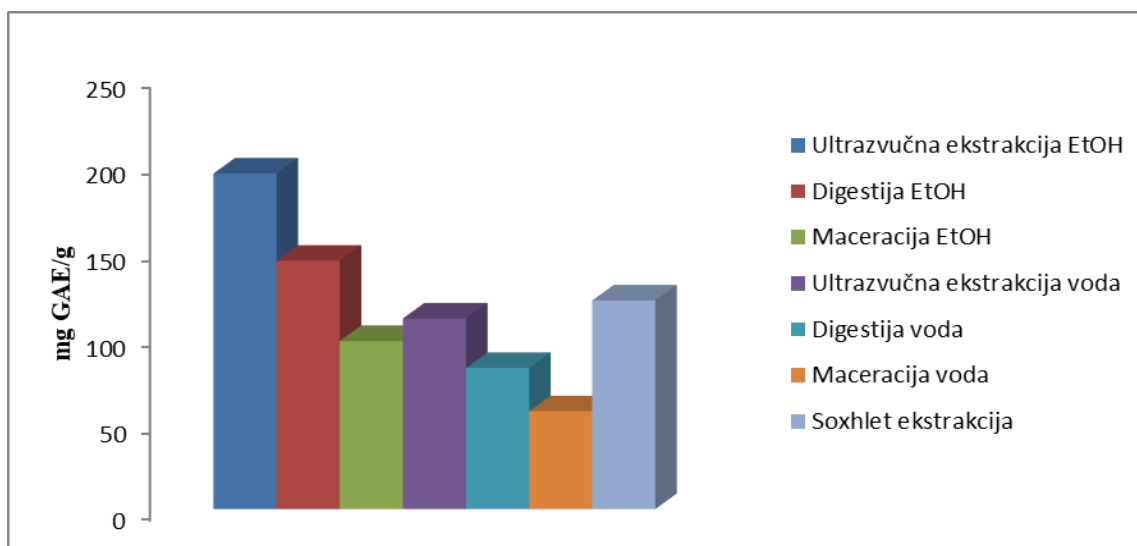
4 REZULTATI I DISKUSIJA

Na hemijski sastav ljekovitih biljaka utiču brojni faktori, kao što su vrsta, uslovi uzgajanja, berba, faza zrelosti, uslovi čuvanja, metoda ekstrakcije i izbor rastvarača. Veoma je komplikovano interpretirati podatke zbog razlika u metodama koje se zasnivaju na različitim mehanizmima koji se koriste za procjenu sadržaja antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti. Rezultati analize antioksidativne aktivnosti iste biljke mogu značajno da variraju u zavisnosti od primjenjene metode. Osnovni ciljevi ovog istraživanja su:

- determinacija sadržaja polifenolnih jedinjenja (fenola i flavonoida) primjenom kvantitativnih metoda za određivanje količine antioksidativnih jedinjenja u ekstraktima herbe pitome i divlje nane,
- utvrđivanje kojom od primjenjenih metoda ekstrakcije je moguće, ostvariti maksimalnu ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja iz odabranih vrsta roda *Mentha*,
- uticaj upotrebe različitih rastvarača (vode i etanola) na ekstrakciju pomenutih komponenti,
- određivanje antioksidativnog potencijala dobijenih ekstrakata DPPH i FRAP metodom,
- upoređivanje sadržaja antioksidativnih jedinjenja u ekstraktima vrsta roda *Mentha* porijeklom iz sjevernog (Pljevlja) i južnog (Herceg Novi) regiona Crne Gore .

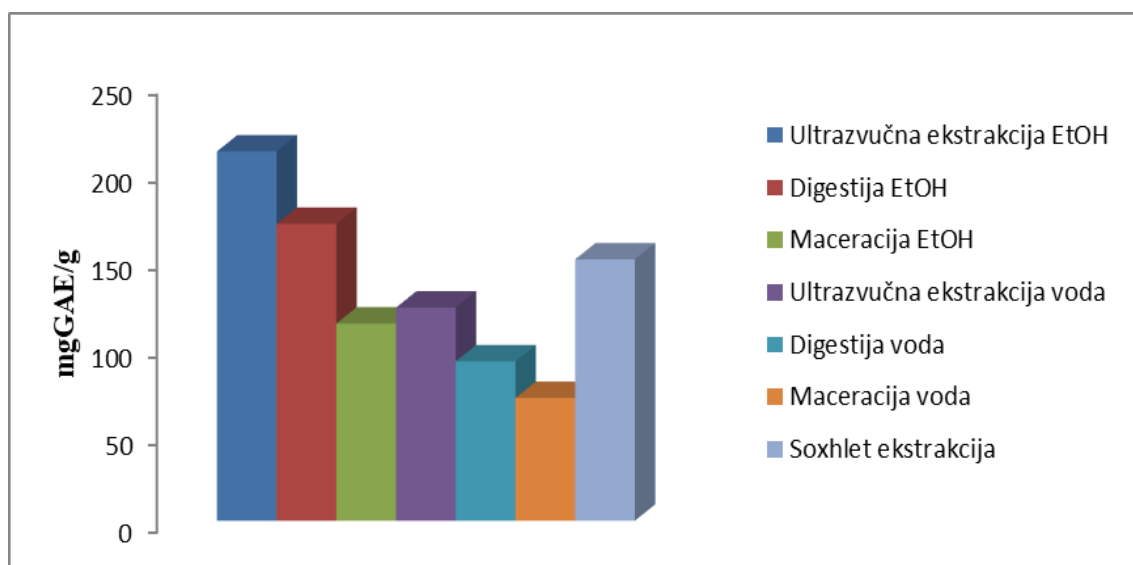
4.1 Ukupni sadržaj fenola u ekstraktima pitome i divlje nane

U vodenim i etanolnim ekstraktima pitome i divlje nane, sa područja Pljevalja (sjeverni region) i Herceg Novog (južni region), dobijenim postupcima ultrazvučne ekstrakcije, digestije, maceracije i Sokslet ekstrakcije određen je sadržaj ukupnih fenola. Dobijene vrijednosti za količinu ukupnih fenolnih jedinjenja predstavljene su kao ekvivalent galne kiseline - mg GAE/g suve biljke. Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti tri mjerenja. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima pitome nane prikazan je na grafikonima 1 i 2, dok je sadržaj ukupnih fenola divlje nane prikazan na grafikonima 3 i 4.



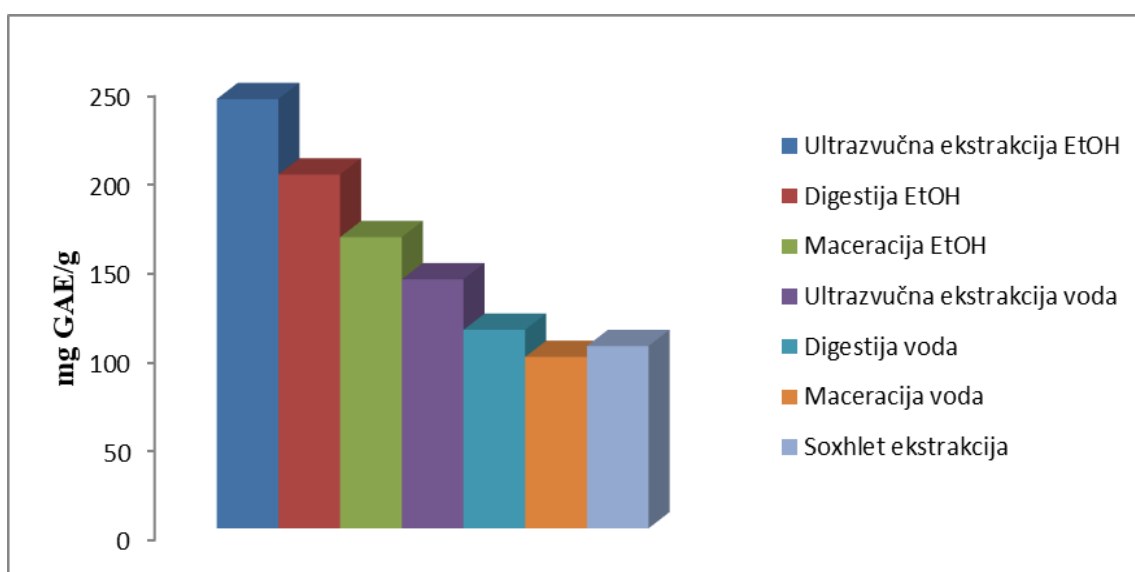
Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *Mentha piperita* – Pljevalja

Na osnovu podataka iz grafikona 1 sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima pitome nane sa područja Pljevalja, upotrebom 70% etil-alkohola kao rastvarača, iznosio je: 193,74 mg GAE/g suve biljke (ultrazvučna ekstrakcija), 143,39 mg GAE/g suve biljke (digestija), 97,04 mg GAE/g suve biljke (maceracija) dok je korišćenjem vode kao rastvarača sadržaj ukupnih fenola iznosio: 110,04 mg GAE/g suve biljke (ultrazvučna ekstrakcija), 81,46 mg GAE/g suve biljke (digestija), 56,44 mg GAE/g suve biljke (maceracija). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu koji je dobijen Sokslet ekstrakcijom iznosio je 120,42 mg GAE/g suve biljke.



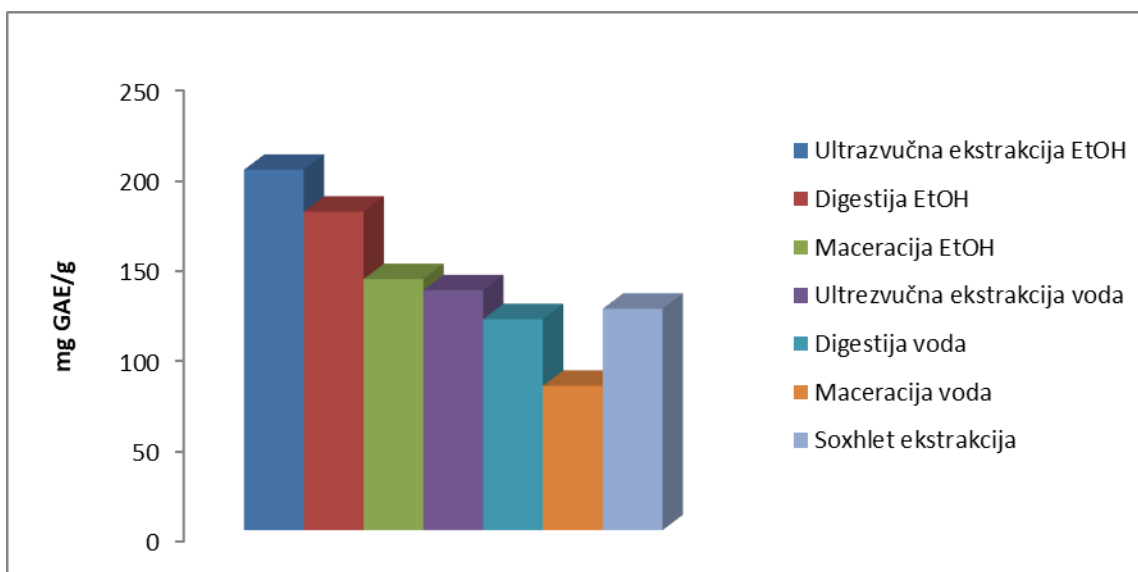
Grafikon 2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *Mentha piperita* – Herceg Novi

Na osnovu podataka iz grafikona 2 uočava se da je sadržaj ukupnih fenola pitome nane, sa područja Herceg Novog, najviši u ekstraktu koji je dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije i to korišćenjem 70% etanola kao rastvarača (210,05 mg GAE/g suve biljke), slijedi ekstrakt dobijen postupkom digestije (169,25 mg GAE/g suve biljke). Sadržaj ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu koji je dobijen postupkom maceracije iznosio je 112,41 mg GAE/g suve biljke. U vodenim ekstraktima sadržaj ukupnih fenola je iznosio 121,5 mg GAE/g suve biljke za ultrazvučnu ekstrakciju, 90,85 mg GAE/g suve biljke za digestiju, a najmanje fenola ima u vodenom ekstraktu koji je dobijen postupkom maceracije, 70,01 mg GAE/g suve biljke. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu dobijenom Sokslet ekstrakcijom iznosio je 148,98 mg GAE/g suve biljke.



Grafikon 3. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *Mentha longifolia* – Pljevlja

Iz grafikona 3 se uočava da je najveći sadržaj fenola iz herbe divlje nane (*Mentha longifolia*) sa sjevera Crne Gore izolovano primjenom etanola kao rastvarača i metodom ultrazvučne ekstrakcije, (241,35 mg GAE/g suve biljke). Najmanji sadržaj fenola, u etanolnom ekstraktu dobijen je postupkom maceracije (112,41 mg GAE/g suve biljke). Takođe, u vodenom ekstraktu, sadržaj ukupnih fenola dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom (140,04 mg GAE/g suve biljke) je veći u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu dobijenog postupkom maceracije (96,34 mg GAE/g suve biljke). Sadržaj fenola dobijenih postupkom digestije, u etanolnom ekstraktu je iznosio 198,9 mg GAE/g suve biljke, dok je u vodenom ekstraktu iznosio 121,61 mg GAE/g suve biljke. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu dobijenom Sokslet ekstrakcijom iznosio je 102,5 mg GAE/g suve biljke.



Grafikon 4. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *Mentha longifolia* – Herceg Novi

U etanolnim ekstraktima divlje nane sa južnog područja dobijena je veća količina fenola (199,64 mg GAE/g suve biljke - ultrazvučna ekstrakcija, 176,44 mg GAE/g suve biljke – digestija, 139,07 mg GAE/g suve biljke - maceracija) u odnosu na vodene ekstrakte (132,93 mg GAE/g suve biljke - ultrazvučna ekstrakcija, 116,88 mg GAE/g suve biljke - digestija, 79,97 mg GAE/g suve biljke - maceracija). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu dobijenom Sokslet ekstrakcijom iznosio je 122,67 mg GAE/g suve biljke. Kao što je prije navedeno temperatura, svjetlost, pH vrijednost zemljišta i drugi faktori utiču na metabolizam i sintezu antioksidativnih jedinjenja, što je i razlog zabilježenih različitih koncentracija. Takođe svaka metoda ekstrakcije se bazira na drugačijem mehanizmu izolacije fenolnih jedinjenja, što utiče na njihovu vrijednost.

U studiji [Ganzera i saradnici \(2008\)](#) potvrđeno je da je ukupni sadržaj fenola u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem nadmorske visine. [Jaakola i Hohtola \(2010\)](#) navode da duža obdanica i viša prosječna temperatura vazduha utiču na veću koncentraciju fenola u pitomoj nani. Visoka koncentracija antioksidativnih jedinjenja u potomoj nani povezuje se sa odbrambenim sistemom ove biljke ([Hossain i sar., 2014](#)).

Rezultati u ovom master radu ukazuju da viša prosječna temperatura vazduha u južnom dijelu Crne Gore utiče na povećan sadržaj fenola kod pitome nane u poređenju sa na pitomom nanom iz sjevernog regiona gdje su karakteristične niže temperature.

[Lupsor i saradnici \(2019\)](#) su korišćenjem etanola kao rastvarača postupkom maceracije, iz biljnog materijala *Mentha piperita*, dobili ukupni sadržaj fenola 1560 mg GAE/100g svježe mase. [Jakovljević i saradnici \(2017\)](#) su ispitivali fitohemijski sadržaj različitih ekstrakata, dobijenih

postupkom maceracije različitih vrsta roda *Mentha*, i u ovom istraživanju sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima vrste *Mentha piperita* iznosi $154,28 \pm 2,11$ mg GAE/g suve biljke, dok je za vrstu *Mentha longifolia* $113,75 \pm 1,75$ mg GAE/g suve biljke. Poređenjem rezultata ukupnih fenola i rezultata dobijenih u ovom master radu uočava se da su dobijene vrijednosti približne vrijednostima dobijenim u ovom istraživanju.

[Benedec i saradnici \(2013\)](#) su u etanolnim ekstraktima vrste *Mentha longifolia* dobijenim postupkom digestije dobili sadržaj ukupnih fenola 219,20 mg GAE/g suve biljke, što je više nego vrijednosti dobijene istom metodom u ovoj master tezi (198,9 GAE/g suve biljke i 176,44 GAE/g suve biljke).

[Stagos i saradnici \(2012\)](#) su korišćenjem vode kao rastvarača izolovali 216 mg GAE/g suve biljke ukupnih fenola. Najveći sadržaj ukupnih fenola za vodeni ekstrakt u ovom master radu je iznosio 140,04 mg GAE/g suve biljke, primjećuje se da su u istraživanju [Stagos i saradnici](#) dobili veće vrijednosti.

Pojedini literaturni podaci koji se odnose na ispitivanje vrste *Mentha longifolia* pokazuju da je u etanolnom ekstraktu, manja koncentracija fenolnih jedinjenja (67,05 mg GAE/g suve biljke) u odnosu na vodeni ekstrakt (92,38 mg GAE/g suve biljke) ([Bahadori i sar., 2018](#)), što nije slučaj u našem istraživanju kada je u pitanju metoda maceracije.

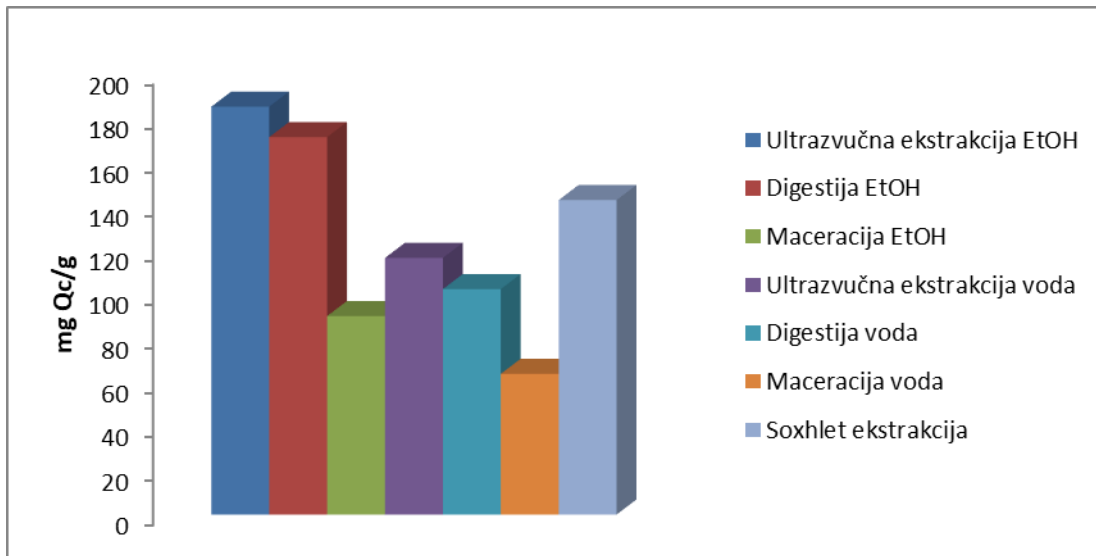
U istraživanju koje su sproveli [Stanisavljević i saradnici \(2012\)](#) nađeno je i da tehnika sušenja ima uticaj na prinos tj. da ekstrakt prirodno sušene divlje nane sadrži više ukupnih fenola 6.52 ± 0.11 mg GAE/g svježe biljke) od divlje nane koja je sušena u sušnici. Najveća koncentracija polifenola u etanolnom ekstraktu pitome nane u istraživanju koji je sproveo [Hayat \(2020\)](#) dobijena je postupkom ultrazvučne ekstrakcije i to iz uzorka koji je sušen u mikrotalasnoj peći (406,7 mg GAE/100 g svježe biljke, zatim iz svježeg lista ukupni polifenoli su iznosili 229 mg GAE/100 g svježe biljke, dok je najmanji sadržaj polifenola (183 mg GAE/100 g svježe biljke) i lista osušenog u peći sa vrelim vazduhom.

Poređenjem sa rezultatima prethodno publikovanih istraživanja, potvrđeno je da na sadržaj ukupnih fenola u biljnim ekstraktima veliki uticaj ima izbor rastvarača sa aspekta njegove polarnosti, ali i primjenjeni način ekstrakcije. [Patonay i saradnici \(2017\)](#) su primjenom ultrazvučne ekstrakcije određivali ukupni sadržaj fenola divlje mente. Ukupni sadržaj fenola primjenom metanola kao rastvarača se kretao u intervalu od 20,111 GAE/kg suve biljke do 47,516 GAE/kg suve biljke, etanola od 14,261 GAE/kg suve biljke, do 40,724 GAE/kg suve biljke, smješe etanola i vode od

19,348 GAE/kg suve biljke do 46,986 GAE/kg suve biljke. Ekstrakcija vrste *Mentha longifolia* sa 70% metanolom dala je ekstrakt bogat fenolima (275 mg/g suve biljke) (Berselli i sar., 2010).

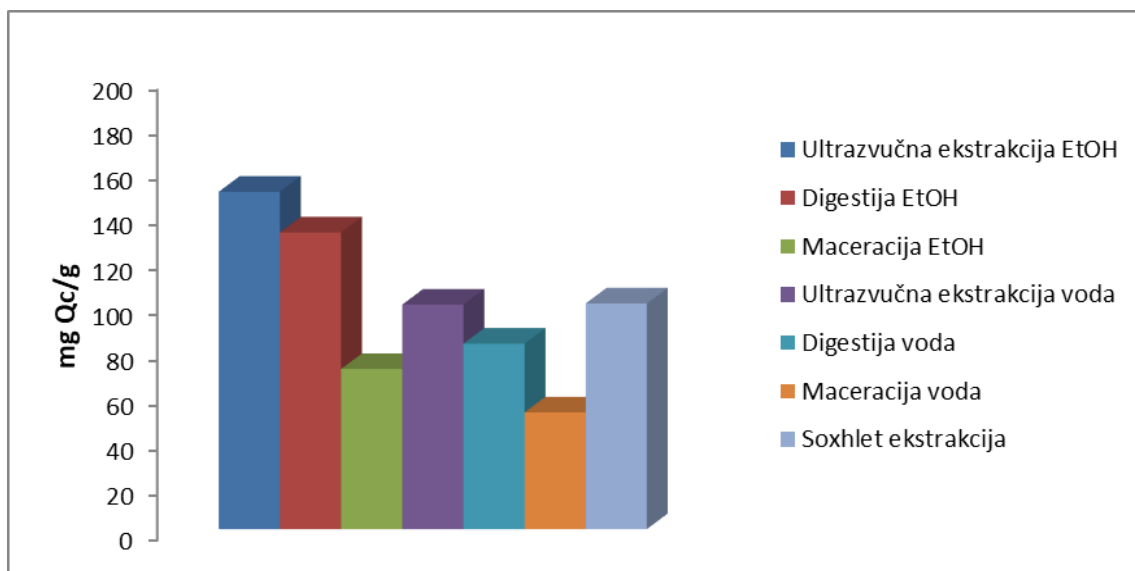
4.2 Ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktima pitome i divlje nane

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen u etanolnim i vodenim ekstraktima pitome i divlje nane sa područja Pljevalja (sjeverni region) i Herceg Novog (južni region), koji su dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom, digestijom, maceracijom i Sokslet ekstrakcijom. Rezultati ukupnih flavonoida su izraženi u mg Qc (kvercetin) po gramu suve biljke. Navedeni rezultati su dati kao srednje vrijednosti tri mjerenja. Sadržaj ukupnih flavonoida pitome nane sa sjevernog i južnog područja Crne Gore prikazan je na grafikonima 5 i 6, dok je sadržaj ukupnih flavonoida divlje nane sa sjevernog i južnog područja Crne Gore prikazan na grafikonima 7 i 8.



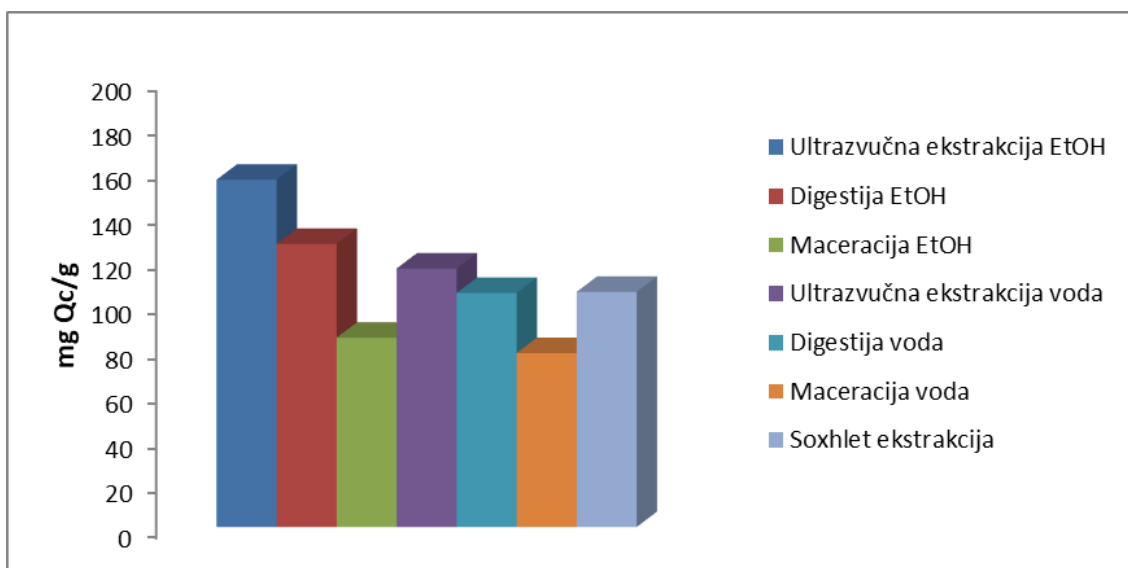
Grafikon 5. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima *Mentha piperita* – Pljevlja

Rezultati dobijeni nakon određivanja količine ukupnih flavonoida uzorka pitome nane sa sjevernog područja Crne Gore (okolina Pljevalja), u etanolnim ekstraktima, pokazuju da je najveći sadržaj dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije, 184,8 mg Qc/g suve biljke, slijedi ekstrakt dobijen postupkom digestije, 171,02 mg Qc/g suve biljke, a zatim ekstrakt dobijen postupkom maceracije, 89,92 mg Qc/g suve biljke. U vodenom ekstraktu sadržaj ukupnih flavonoida je iznosio 116,28 mg Qc/g suve biljke, 102,15 mg Qc/g suve biljke, 63,75 mg Qc/g suve biljke za ultrazvučnu ekstrakciju, digestiju i maceraciju, respektivno. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktu izolovanog Sokslet ekstrakcijom bio je 142,5 mg Qc/g suve biljke.



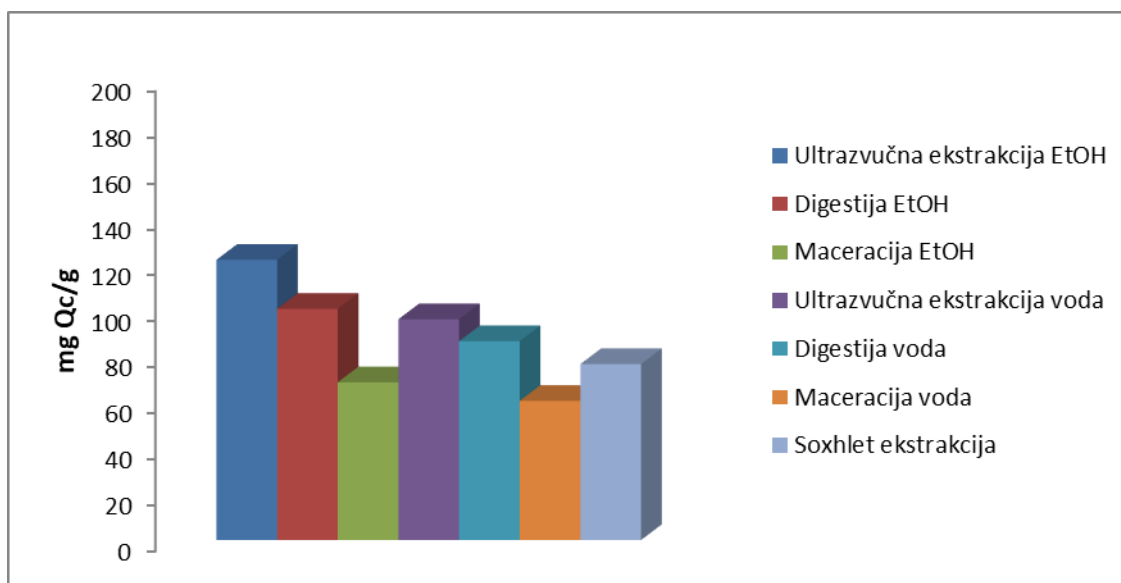
Grafikon 6. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima *Mentha piperita*- Herceg Novi

Na osnovu dobijenih rezultata za pitomu nanu porijeklom iz južnog regiona Crne Gore (okolina Herceg Novog), može se zaključiti da je sadržaj flavonoida u etanolnim ekstraktima bio veći u odnosu na vodene ekstrakte. Dakle, sadržaj ukupnih flavonoida dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije za etanolni ekstrakt je iznosio 149,62 mg Qc/g suve biljke, dok je za vodeni ekstrakt iznosio 99,57 mg Qc/g suve biljke. Postupkom digestije za etanolni ekstrakt sadržaj flavonoida je 131,57 mg Qc/g suve biljke, a za vodeni ekstrakt 82,25 mg Qc/g suve biljke, dok je postupkom maceracije za etanolni ekstrakt dobijeno 71,02 mg Qc/g suve biljke, a za vodeni ekstrakt 51,76 mg Qc/g suve biljke. Sadržaj ukupnih flavonoida dobijen Sokslet ekstrakcijom je iznosio 100,09 mg Qc/g suve biljke.



Grafikon 7. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima *Mentha longifolia* – Pljevlja

Na osnovu rezultata prikazanih na grafikonu 7, sadržaja flavonoida u ekstraktima divlje nane sjevernog regiona Crne Gore (okolina Pljevalja) primjećuje se da je najviše flavonoida ekstrahovano metodom ultrazvučne ekstrakcije, uz korišćenje etanola kao rastvarača, dok se maceracijom, korišćenjem vode kao rastvarača, izolovao najmanji sadržaj flavonoida. U etanolnim ekstraktima divlje nane sadržaj ukupnih flavonoida iznosio je 155,2 mg Qc/g suve biljke (ultrazvučna ekstrakcija), 126,5 mg Qc/g suve biljke (digestija), 84,6 mg Qc/g suve biljke (maceracija). U vodenim ekstraktima divlje nane sadržaj ukupnih flavonoida je 115,52 mg Qc/g suve biljke (ultrazvučna ekstrakcija), 104,6 mg Qc/g suve biljke (digestija), 77,75 mg Qc/g suve biljke (maceracija). Sadržaj ukupnih flavonoida izolovanih Sokslet ekstrakcijom je bio 105,08 mg Qc/g suve biljke.



Grafikon 8. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima *Mentha longifolia* – Herceg Novi

Upoređivanjem grafikona 7 i grafikona 8 uočava se da je sadržaj ukupnih flavonoida divlje nane sa južnog regiona Crne Gore (okolina Herceg Novog) manji u odnosu na sadržaj ukupnih flavonoida za divlju nanu sa sjevernog područja. Sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu divlje nane sa južnog područja dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije iznosio je 121,64 mg Qc/g, slijedi etanolni ekstrakt dobijen postupkom digestije sa sadržajem flavonoida 100,37 mg Qc/g suve biljke, zatim vodeni ekstrakti dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom 95,86 mg Qc/g suve biljke i digestijom 86,31 mg Qc/g suve biljke. Nešto manji sadržaj flavonoida je dobijen Soxhlet ekstrakcijom i iznosi 76,38 mg Qc/g suve biljke. Najmanji sadržaj flavonoida je u ekstraktima dobijenim postupkom maceracije i to za etanolni ekstrakt 68,48 mg Qc/g suve biljke i vodeni ekstrakt 60,42 mg Qc/g suve biljke.

Flavonoidi su moćni hvatači slobodnih radikala i na taj način sprečavaju peroksidaciju lipida u biljnim tkivima. Poznato je da kod nekih biljaka veća insolacija podstiče veću sintezu flavonoida, pri čemu ih biljke koriste kao zaštitni UV faktor u uslovima stresa (Treutter 2006, Idris i sar., 2018), što može biti jedan od razloga zašto su u ovom istraživanju vrijednosti flavonoida visoke. U istraživanju (Liu i sar., 2016) pokazano je da se sa porastom nadmorske visine povećava i koncentracija ukupnog sadržaja flavonoida, što je prikazano i u ovom istraživanju. Dugi dani sa hladnim noćnim temperaturama – uglavnom mogu imati pozitivan efekat na biosintezu flavonoida u biljkama, iako postoje varijacije u odgovoru između vrste i unutar pojedinih grupa flavonoida (Jaakola i Hohtola 2010).

Jakovljević i saradnici (2017) su ispitivali fitohemijski sadržaj različitih ekstrakata vrsta roda *Mentha*. Ukupna količina flavonoida u etanolnim ekstraktima vrste *Mentha piperita* je iznosila 218.13 ± 3.17 mg RU/g suve biljke dok je količina flavonoida u ekstraktima vrste *Mentha longifolia* 101.70 ± 0.56 mg RU/g suve biljke.

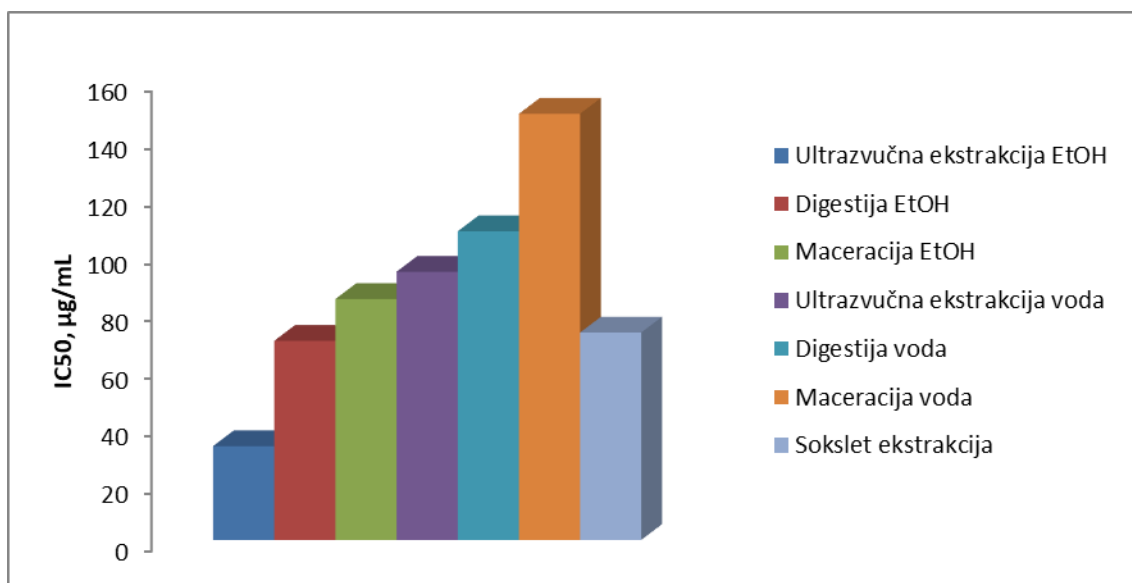
U pojedinim literaturnim podacima ekstrakti vrste *Mentha longifolia* dobijeni postupkom maceracije pokazuju manji sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnom ekstraktu (23,68 mg RE/g suve biljke) u odnosu na vodeni ekstrakt (46,18 mg RE/g suve biljke) (Bahadori i sar., 2018).

Stanisavljević i saradnici (2012) ispitali su sadržaj ukupnih flavonoida ekstrakata herbe divlje nane osušene različitim tehnikama. Najveći prinos ekstrakta dobijen je iz herbe sušene prirodnim putem, 6.08 ± 0.02 mg RU/g svježe biljke.

Najveći ukupni sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu pitome nane dobijen je iz uzorka koji je sušen u mikrotalasnoj peći (247 mg CE/100 g svježe mase), dok je najniža vrijednost (181 mg CE/100 g svježe mase) bila u uzorku lista osušenog u peći sa vrelim vazduhom (Hayat , 2020).

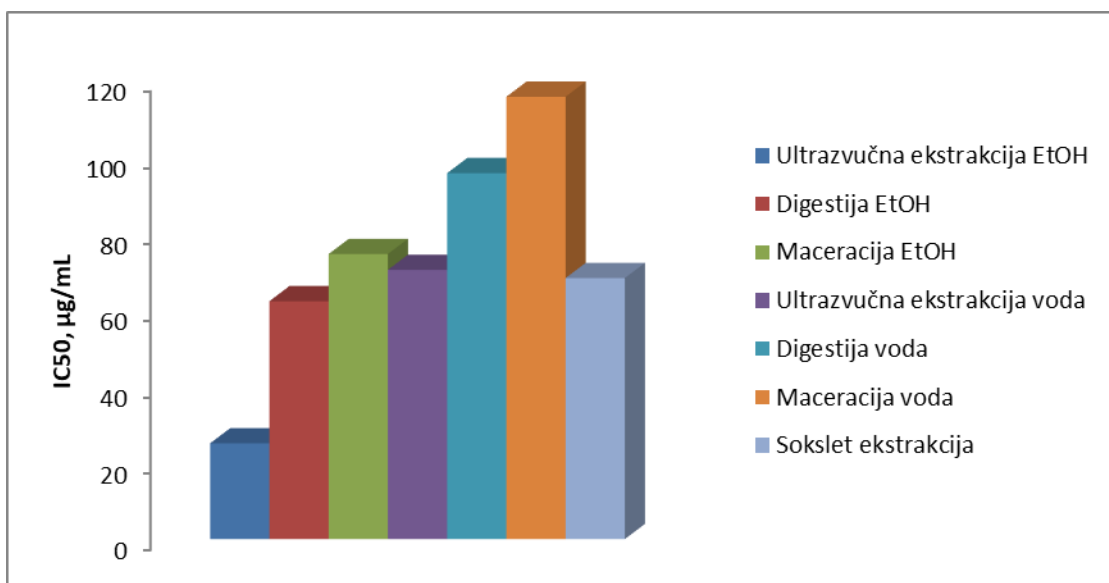
4.3 Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom DPPH testa

Antioksidativna aktivnost pitome i divlje nane ispitivana je primjenom DPPH metode. Dobijeni rezultati antioksidativne aktivnosti su izraženi kao IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$. Što je veća antioksidativna aktivnost ekstrakata to je manja IC_{50} vrijednost. Na grafikonima 9 i 10 su predstavljeni rezultati antioksidativne aktivnosti pitome nane, a na grafikonima 11 i 12 su predstavljeni rezultati antioksidativne aktivnosti divlje nane dobijeni korišćenjem DPPH testa.



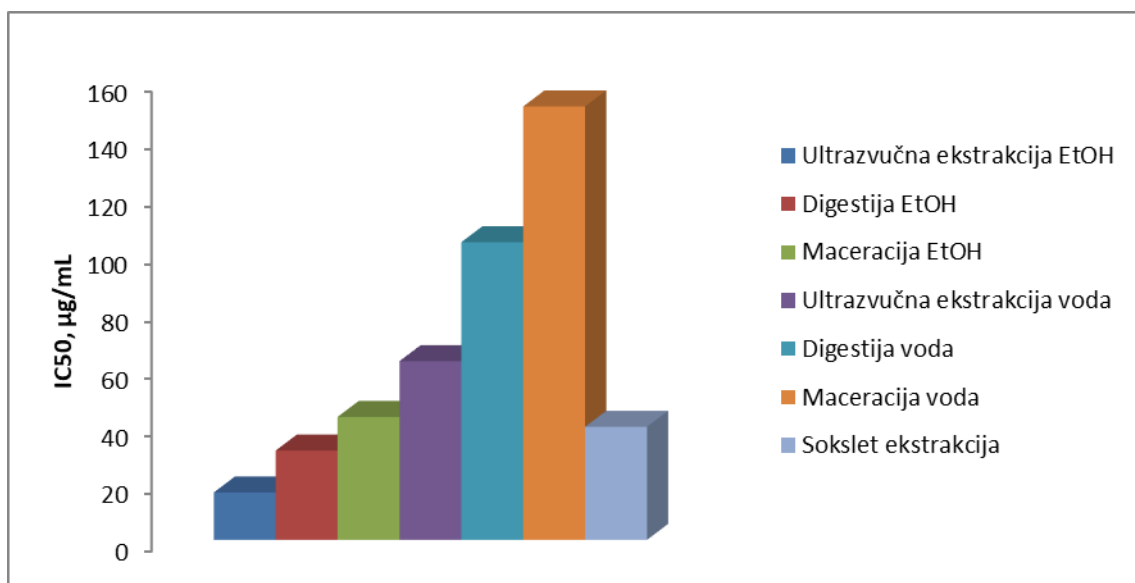
Grafikon 9. Antioksidativni aktivnost ekstrakata *Mentha piperita* dobijena DPPH testom- Pljevalja

Kako najveću antioksidativnu aktivnost ima onaj uzorak čija je vrijednost IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$ najmanja, znači da najveću antioksidativnu aktivnost, kada se radi o pitomoj nani sa područja Pljevalja, ima etanolni ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom ($IC_{50}=32,60 \mu\text{g/mL}$). Antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog Sokslet ekstrakcijom iznosi $IC_{50}=72,06 \mu\text{g/mL}$. Vodeni ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom pokazao je antioksidativni kapacitet od $93,20 \mu\text{g/mL}$. Najmanju antioksidativnu aktivnost je pokazao vodeni ekstrakt dobijen maceracijom ($IC_{50}=148,07 \mu\text{g/mL}$), dok je etanolni ekstrakt dobijen istom metodom pokazao antioksidativni kapacitet od $83,71 \mu\text{g/mL}$. Antioksidativna aktivnost za etanolni i vodeni ekstrakt koji su dobijeni postupkom digestije iznose $69,19 \mu\text{g/mL}$ i $107,25 \mu\text{g/mL}$, respektivno.



Grafikon 10. Antioksidativni aktivnost ekstrakata *Mentha piperita* dobijena DPPH testom- Herceg Novi

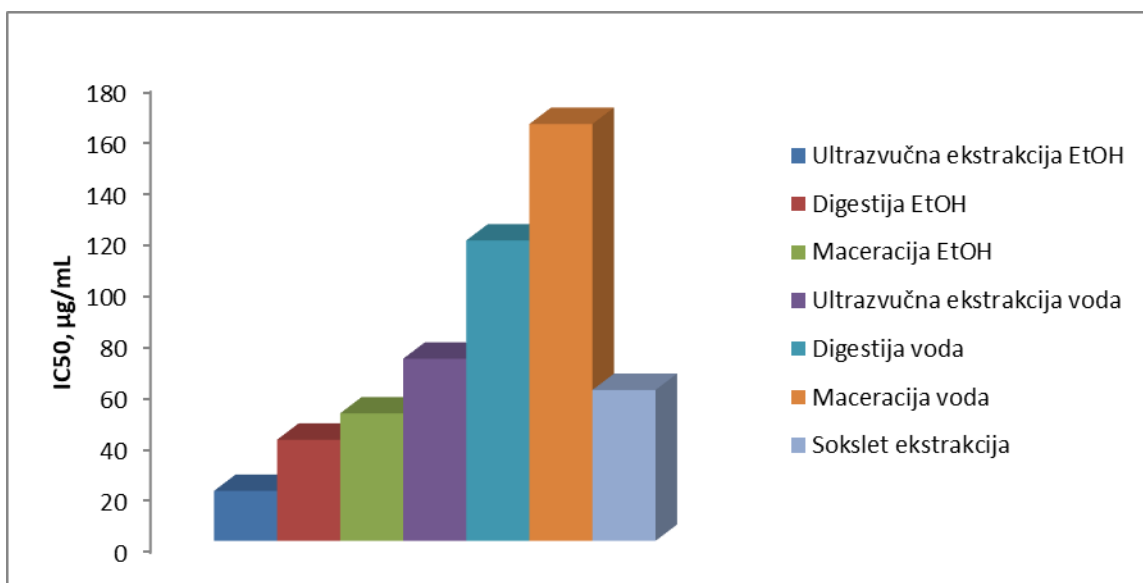
Na osnovu podataka prikazanih na grafikonu 10 uočava se da je etanolni ekstrakt pitome nane sa područja Herceg Novog dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije pokazao najveću antioksidativnu aktivnost (25,02 µg/mL) u odnosu na ostale etanolne ekstrakte porijeklom sa pomenutog područja. Upoređivanjem vodenih ekstrakata, takođe se izdvaja ekstrakt dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije (70,33 µg/mL) u odnosu na ostale vodene ekstrakte. Takođe upoređivanjem etanolnog i vodenog ekstrakata dobijenih postupkom digestije, veći sadržaj se uočava u etanolnom ekstraktu u odnosu na vodeni (62,15 µg/mL i 95,61 µg/mL, respektivno), kao i kada se radi o maceratima (74,47 µg/mL za etanolni i 115,57 µg/mL za vodeni). IC₅₀ vrijednost za ekstrakt dobijen Sokslet ekstrakcijom je 68,20 µg/mL.



Grafikon 11. Antioksidativni aktivnost ekstrakata *Mentha longifolia* dobijena DPPH testom-
Pljevlja

Kada je riječ o divljoj nani sa područja Pljevalja, kao što se primjećuje na grafikonu 11 najveću vrijednost IC₅₀ ima vodeni ekstrakt dobijen maceracijom i to 115,72 µg/mL, zatim slijedi vodeni ekstrakt dobijen postupcima digestije, 103,53 µg/mL i ultrazvučne ekstrakcije 62,15 µg/mL. Najveću antioksidativnu aktivnost ima etanolni ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom, 16,50 µg/mL, slijede etanolni ekstrakti dobijeni digestijom (31,07 µg/mL), Sokslet ekstrakcijom (39,33 µg/mL) i maceracijom (42,77 µg/mL).

Najveću antioksidativnu aktivnost, određenu DPPH testom, kako u slučaju divlje nane tako i upoređujući sa pitomom nanom, sa oba područja, ima etanolni ekstrakt sa područja Pljevalja, dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom, 16,50 µg/mL.



Grafikon 12. Antioksidativni aktivnost ekstrakata *Mentha longifolia* dobijena DPPH testom- Herceg Novi

Vodeni ekstrakt divlje nane porijeklom iz Herceg Novog koji je dobijen postupkom ultrazvučne ekstrakcije pokazuje znatno manji antioksidativni kapacitet (71,02 µg/mL) u odnosu na etanolni ekstrakt dobijen istom metodom (19,46 µg/mL). Slično je i za vodeni (117,14 µg/mL) i etanolni (39,43 µg/mL) ekstrakt koji su dobijeni postupkom digestije, ali i za ekstrakte dobijene maceracijom (162,54 µg/mL i 43,72 µg/mL, za vodeni i etanolni ekstrakt, respektivno). Upoređujući antioksidativni kapacitet ekstrakata divlje nane sjevernog i južnog područja, dobijenih Sokslet ekstrakcijom primjećuje se veći kapacitet kod nane koja potiče sa više nadmorske visine odnosno sa sjevernog područja (39,33 µg/mL) u odnosu na nanu sa južnog područja (58,84 µg/mL).

Dominantna antioksidativna aktivnost zabilježena je u etanolnom ekstraktu divlje nane (IC₅₀= 16,50 µg/mL) sa lokaliteta sa većom nadmorskom visinom.

Nickavar i saradnici (2008) su u etanolnim ekstraktima, dobijenim postupkom maceracije, odredili nivo aktivnosti uklanjanja DPPH za vrstu *Mentha piperita* (IC₅₀=13,32 µg/mL) i *Mentha longifolia* (IC₅₀=24,07 µg/mL). Uzorci ispitivani u ovom radu istom metodom, za vrstu *Mentha piperita* su iznosili 74,47 µg/mL i 83,71 µg/mL, dok su za vrstu *Mentha longifolia* iznosili 42,77 µg/mL i 44,62 µg/mL.

Jakovljević i saradnici (2017) su stepen redukcije slobodnih radikala određivali primjenom DPPH metode i predstavili je kao IC₅₀ vrijednost. Vrstu *Mentha piperita* karakteriše antioksidativna aktivnost 60.01±0.53 µg/mL, dok je vrijednosti za vrstu *Mentha longifolia* iznosila 122.85±0.81 µg/mL.

Stanisavljević i saradnici (2012) su DPPH testom ispitivali antioksidativnu aktivnost etanolnih ekstrakata herbe divlje mente sušene prirodnim putem i dobili vrijednost $EC_{50} = 0,021 \pm 0,002$ mg/mL.

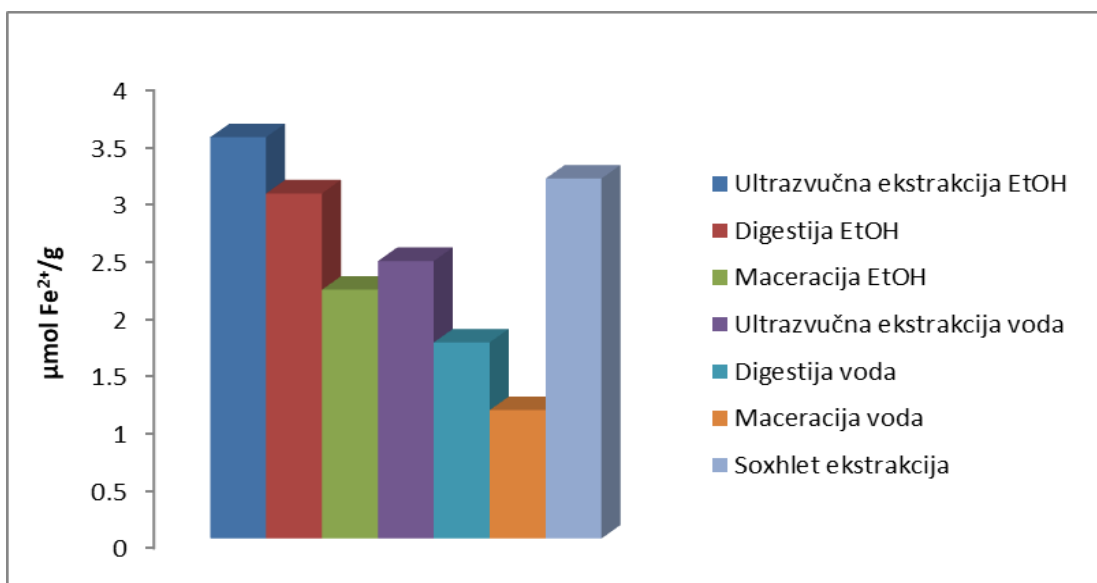
Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti DPPH metodom uočena je veća aktivnost kod vrste *Mentha longifolia* (79%) nego kod vrste *Mentha piperita* (75%) (Ahmad i sar., 2012). Nasuprot tome, Benedec i saradnici (2013) su određivali antioksidativni kapacitet ekstrakta *Mentha longifolia* primjenom DPPH metode i izražen u procentima iznosi 25,31 %, dok su Stagos i saradnici (2012) korišćenjem vode kao rastvarača dobili $28 \pm 1,0$ µg/mL DPPH. Lupsor i saradnici (2019) su analizirali etanolni ekstrakt vrste *Mentha piperita* i dokazali visoku testnu vrijednost DPPH (5472 mg GAE/100g svježe mase) i ukazali da je antioksidativni kapacitet dat ne samo sadržajem fenola već i drugim bitnim komponentama koje postoje u ispitivanom maceratu.

Među nekoliko studija sprovedenih o antioksidativnom potencijalu vrste *Mentha*, Park i saradnici (2019) prijavili su da je od devet vrsta *Mentha*, *Mentha longifolia* najefikasnija, pokazujući antioksidativnu aktivnost od 88,6% u poređenju sa 93,0% aktivnosti askorbinske kiseline u koncentraciji od 100 µL/mL. Singh i saradnici (2015), ispitivali su antioksidativnu aktivnosti vrste *Mentha piperita* i minimalna aktivnost je zabilježena za vodeni ekstrakt. Za etanolni ekstrakt DPPH vrijednost je iznosila 74.8 ± 5.2 %, a za vodeni 70.3 ± 6.1 %.

U istraživanju Bahadori i saradnici (2018) antioksidativni kapacitet za vrstu *Mentha longifolia* iznosio je $162,08 \pm 3,90$ mg TE/g suve biljke i $195,96 \pm 0,94$ mg TE/g suve biljke za etanolni i vodeni ekstrakt, respektivno.

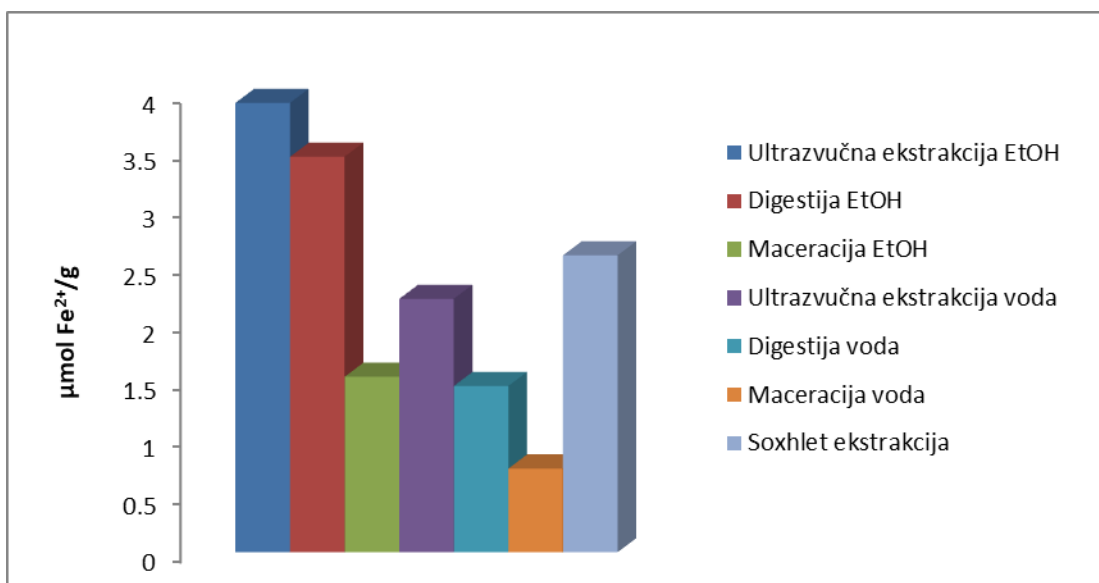
4.4 Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom FRAP testa

U ovom master radu je određivana i antioksidativna aktivnost u ekstraktima pitome i divlje nane pomoću FRAP metode, gdje su vrijednosti izražene kao µmol Fe^{2+} /g suve biljke. Najveću antioksidativnu aktivnost ima onaj uzorak čija je vrijednost µmol Fe^{2+} /g suve biljke najveća. Rezultati FRAP testa za pitomu nanu sa područja Pljevalja i Herceg Novog su prikazani na grafikonima 13 i 14, a rezultati za divlju nanu su prikazani na grafikonim 15 i 16.



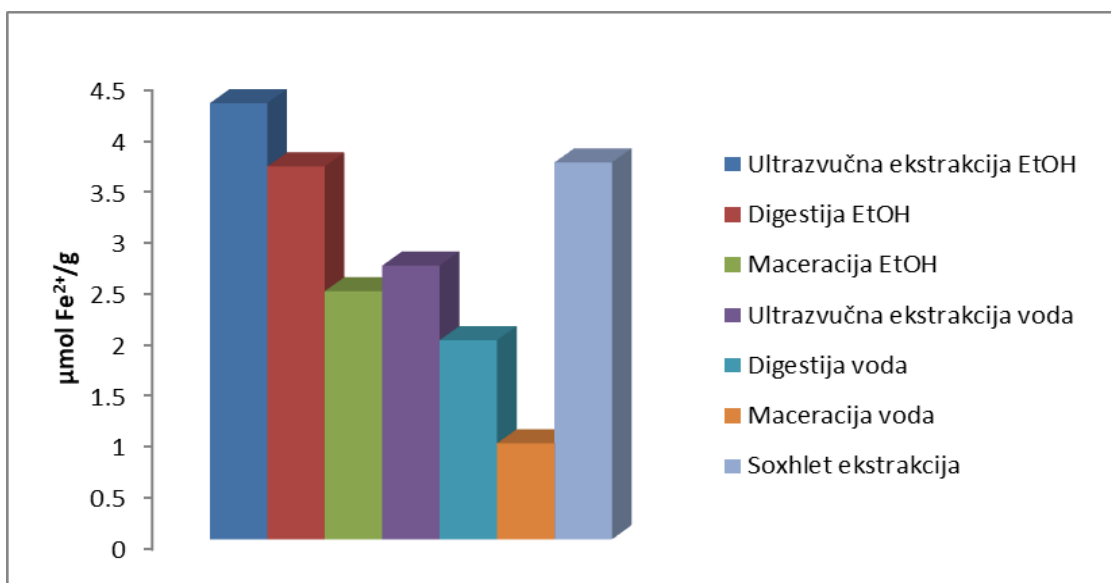
Grafikon 13. Antioksidativna aktivnost ekstrakata vrste *Mentha piperita* dobijenih FRAP testom-
Pljevlja

Najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje etanolni ekstrakt pitome nane dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom (3,50 μmol Fe²⁺/g suve biljke), dok najmanju vrijednost pokazuje vodeni ekstrakt dobijen maceracijom (1,12 μmol Fe²⁺/g suve biljke). Vrijednosti dobijene FRAP testom u etanolnim ekstraktima pitome nane sa sjevernog područja iznosile su za ultrazvučnu ekstrakciju 3,50 μmol Fe²⁺/g suve biljke, maceraciju 2,17 Fe²⁺/g, digestiju 3,01 μmol Fe²⁺/g suve biljke i za ekstrakt po Soksletu 3,14 μmol Fe²⁺/g suve biljke. U vodenim ekstraktima vrijednosti su iznosile za ultrazvučnu ekstrakciju 2,42 μmol Fe²⁺/g suve biljke, maceraciju 1,12 μmol Fe²⁺/g suve biljke, digestiju 1,71 μmol Fe²⁺/g suve biljke.



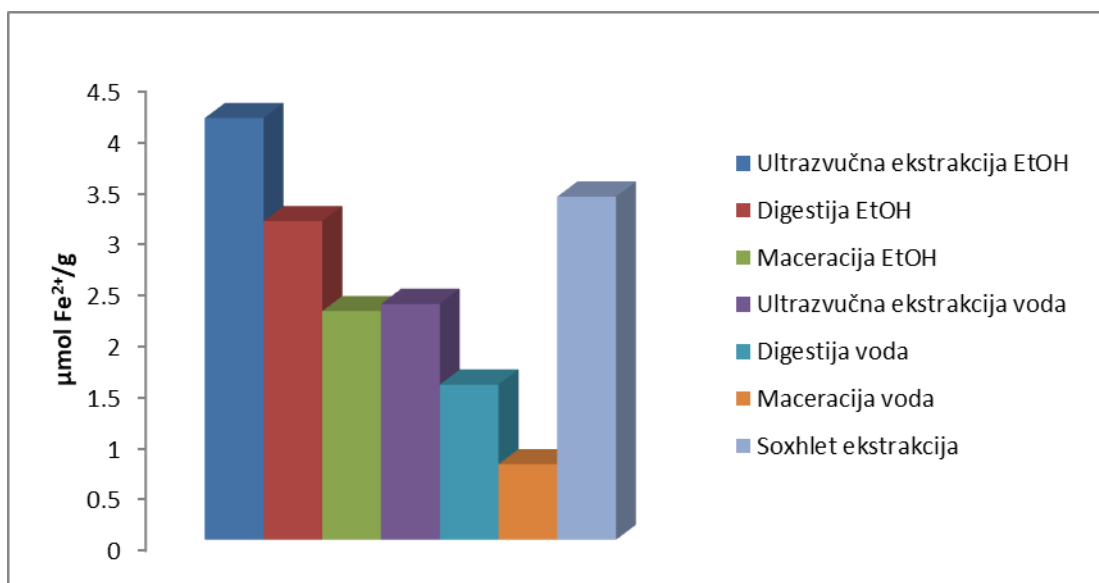
Grafikon 14. Antioksidativna aktivnost ekstrakata vrste *Mentha piperita* dobijenih FRAP testom-
Herceg Novi

Kod pitome nane sa područja Herceg Novog najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje takođe etanolni ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom (3,92 μmol Fe²⁺/g suve biljke), dok najmanju vrijednost pokazuje vodeni ekstrakt dobijen maceracijom (0,73 μmol Fe²⁺/g suve biljke). Etanolni ekstrakt dobijen postupkom digestije pokazuje antioksidativnu aktivnost od 3,42 μmol Fe²⁺/g suve biljke, dok vodeni ekstrakt posjeduje nižu vrijednost 1,45 μmol Fe²⁺/g suve biljke. Za ekstrakt po Soksletu vrijednost antioksidativne aktivnosti iznosi 2,59 μmol Fe²⁺/g suve biljke.



Grafikon 15. Antioksidativna aktivnost ekstrakata vrste *Mentha longifolia* dobijenih FRAP testom-Pljevlja

Upoređujući antioksidativnu aktivnost sa grafikona 15 u ekstraktima divlje nane iz Pljevalja primjenom FRAP testa uočava se da veće vrijednosti imaju etanolni ekstrakti u odnosu na vodene ekstrakte. Tačnije ultrazvučnom ekstrakcijom za etanolni ekstrakt dobijena je vrijednost 4,27 μmol Fe²⁺/g suve biljke, a za vodeni ekstrakt 2,68 μmol Fe²⁺/g suve biljke. Postupkom digestije za etanolni ekstrakt dobijeno je 3,65 μmol Fe²⁺/g suve biljke, dok je za vodeni ekstrakt dobijeno 1,95 μmol Fe²⁺/g suve biljke. Postupkom maceracije dobijena je najmanja antioksidativna vrijednost u odnosu na prethodno pomenute postupke ekstrakcije, odnosno 2,40 μmol Fe²⁺/g suve biljke za etanolni ekstrakt i 0,94 μmol Fe²⁺/g suve biljke za vodeni ekstrakt. Vrijednost dobijena po Soksletu je 3,69 μmol Fe²⁺/g suve biljke. Etanolni ekstrakti divlje nane sa područja Pljevalja pokazuju veći antioksidativni kapacitet izmjeren FRAP testom, u odnosu na etanolne ekstrakte pitome nane.



Grafikon 16. Antioksidativna aktivnost ekstrakata vrste *Mentha longifolia* dobijenih FRAP testom- Herceg Novi

Antioksidativni kapacitet etanolnih ekstrakata divlje nane sa područja Herceg Novog iznosio je 4,13 μmol Fe²⁺/g suve biljke za ultrazvučnu ekstrakciju, 2,24 μmol Fe²⁺/g suve biljke za maceraciju i 3,12 μmol Fe²⁺/g suve biljke za digestiju. Antioksidativni kapacitet vodenih ekstrakata iznosio je 2,31 μmol Fe²⁺/g suve biljke za ultrazvučnu ekstrakciju, 0,74 μmol Fe²⁺/g suve biljke za maceraciju i 1,52 μmol Fe²⁺/g suve biljke za digestiju. Za ekstrakciju po Soksletu antioksidativni kapacitet je iznosio 3.36 μmol Fe²⁺/g suve biljke.

Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti FRAP metodom uočena je veća aktivnost kod vrste *Mentha longifolia* nego kod vrste *Mentha piperita*.

Poređenjem rezultata dobijenih primjenom DPPH i FRAP metoda u ovom istraživanju uočene su sličnosti koje se ogledaju u tome da etanolni ekstrakti imaju veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa vodenim ekstraktima, kao i da ekstrakti dobijeni postupkom ultrazvučne ekstrakcije posjeduju veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa maceratima.

Najveću antioksidativnu aktivnost etanolnih ekstrakata herbe divlje mente osušene različitim tehnikama, određivanu FRAP, pokazuju ekstrakti dobijeni iz herbe sušene prirodnim putem 0.157±0,008 mmol Fe²⁺/g svježe biljke (Stanisavljević i sar., 2012). Vrijednosti dobijene za etanolne ekstrakte ultrazvučne ekstrakcije u istraživanju Stanisavljević i saradnici su znatno manje od vrijednosti koje su dobijene u ovom master radu. U drugom istraživanju Stanisavljević i saradnici (2014) antioksidativna aktivnost ekstrakata herbe divlje mente određivana je FRAP testom i dobijena je vrijednost 1423.6±8.8 μmol Fe²⁺/mL.

Bahadori i saradnici (2018) su antioksidativni kapacitet za etanolni i vodeni ekstrakt vrste *Mentha longifolia* odredili FRAP testom i dobili su vrijednosti $239,87 \pm 3,95$ mg TE/g suve biljke i $346,20 \pm 0,17$ mg TE/g suve biljke, za etanolni i vodeni ekstrakt, respektivno.

U određivanju aktivnosti vezivanja DPPH radikala, uočeno je da na antioksidativni kapacitet utiču i rastvarači, pri čemu etanolni ekstrakt pokazuje najveći antioksidativni kapacitet i DPPH i FRAP testom.

5 KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM EKSTRAKTIMA PITOME I DIVLJE NANE

Korelaciona analiza je rađena u cilju procjene korelacionog faktora između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata pitome i divlje nane sa područja Pljevalja (sjeverni region) i Herceg Novog (južni region). Dobijeni rezultati prikazani su u tabelama 1 i 2. Rađena je i korelaciona analiza uticaja metode ekstrakcije na sadržaj antioksidativnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala. Rezultati su prikazani u tabelama 3, 4, 5 i 6.

Tabela 1. Stepen korelacije antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima pitome i divlje nane sa područja Pljevalja

Pljevlja	DPPH	FRAP
Fenoli	$r = -0.85682$	$r = 0.778971$
Flavonoidi	$r = -0.62543$	$r = 0.743688$

Iz tebele 1 se uočava jak stepen korelacije između sadržaja fenola i vrijednosti dobijenih DPPH testom ($r = -0.85682$). Korelacija između sadržaja fenola i vrijednosti dobijenih FRAP testom je relativno jaka ($r = 0.778971$), kao i korelacija između sadržaja flavonoida i vrijednosti dobijenih FRAP testom ($r = 0.743688$). Umjerena korelacija je nađena između sadržaja flavonoida i vrijednosti dobijenih DPPH testom ($r = -0.62543$).

Tabela 2. Stepen korelacije antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima pitome i divlje nane sa područja Herceg Novog

Herceg Novi	DPPH	FRAP
Fenoli	r= -0.853	r=0.917092
Flavonoidi	r=-0.65999	r=0.789322

Iz tebele 2 se uočava da je korelacija između ukupnih fenola i vrijednosti dobijenih DPPH testom veoma jaka ($r=-0,852$), kao i vrijednosti dobijenih FRAP testom ($r=0,917092$). Umjeren stepen korelacije je nađen između sadržaja flavonoida i vrijednosti dobijenih DPPH testom ($r=-0,65999$), kao i FRAP testom ($r=0,789322$).

Takođe, uočava se da je viši korelacioni faktor između sadržaja antioksidativnih jedinjenja i vrijednosti dobijenih FRAP testom u poređenju sa vrijednostima dobijenim DPPH testom.

Tabela 3. Stepen korelacije antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima dobijenim postupkom ultrazvučne ekstrakcije

Ultrazvučna ekstrakcija	DPPH	FRAP
Fenoli	r= -0.96654	r=0.926636
Flavonoidi	r= -0.66769	r=0.693499

Tabela 4. Stepen korelacije antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima dobijenim postupkom digestije

Digestija	DPPH	FRAP
Fenoli	r= -0.90376	r=0.930955
Flavonoidi	r= -0.46566	r=0.680981

Tabela 5. Stepen korelacije antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima dobijenim postupkom maceracije

Maceracija	DPPH	FRAP
Fenoli	r=-0.88908	r=0.813691
Flavonoidi	r=-0.53957	r=0.721349

Tabela 6. Stepen korelacije antioksidativnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima dobijenim postupkom Sokslet ekstrakcije

Sokslet ekstrakcija	DPPH	FRAP
Fenoli	r=0.723016	r=-0.97041
Flavonoidi	r=0.371127	r=-0.09947

Sumirajući rezultate prikazane u tabelama 3, 4, 5 i 6 uočava se veoma jak koeficijent korelacije sadržaja fenola i vrijednosti dobijenih FRAP testom (ultrazvučna ekstrakcija $r=0.926636$, digestija $r=0.930955$, maceracija $r=0.813691$ i Sokslet ekstrakcija $r=-0.97041$). Umjerena korelacija je nađena između flavonoida i vrijednosti izmjerenih FRAP testom za ultrazvučnu ekstrakciju, digestiju i maceraciju ($r=0.693499$, $r=0.680981$, $r=0.721349$), za razliku od vrijednosti dobijenih Sokslet ekstrakcijom gdje je korelacija veoma slaba ($r=-0.09947$). Negativna korelacija je nađena između fenola i antioksidativne aktivnosti utvrđene DPPH metodom ($r=-0.96654$), kao i između flavonoida i vrijednosti dobijenih DPPH metodom ($r=-0.66769$), kada se radi postupkom ultrazvučne ekstrakcije. Negativna korelacija je i između ukupnih flavonoida i DPPH kada se radi postupkom digestije ($r=-0.46566$), dok je pozitivna korelacija dobijena postupkom Sokslet ekstrakcije ($r=0.371127$). U slučaju maceracije, korelacija između flavonoida i vrijednosti dobijenih DPPH testom je umjerena i negativna ($r=-0.53957$). Kada je u pitanju stepen korelacije između ukupnih antioksidativnih jedinjenja određenih u ekstraktima dobijenih Sokslet ekstrakcijom i antioksidativne aktivnosti uočava se umjeren stepen korelacije između vrijednosti dobijenih DPPH testom i fenola ($r=0.723016$).

6 ZAKLJUČAK

U ovoj master tezi primjenjene su različite tehnike ekstrakcije antioksidativnih jedinjenja iz pitome i divlje nane (*Mentha piperita* i *Mentha longifolia*) sa područja Pljevalja (sjeverni region) i Herceg Novog (južni region) uz upotrebu različitih rastvarača. U dobijenim ekstraktima spektrofotometrijski je određen sadržaj antioksidativnih jedinjenja kao i antioksidativni potencijal. Analizom etanolnih i vodenih ekstraktima pitome i divlje nane zapažene su razlike u pogledu sadržaja antioksidativnih jedinjenja.

Na osnovu sprovedenog istraživanja u ovom master radu zaključuje se da:

- Vrste *Mentha piperita* i *Mentha longifolia* sa područja Crne Gore sadrže značajne količine antioksidativnih jedinjenja.
- Rezultati dobijeni u ovom master radu pokazuju da između ispitivanih vrsta roda *Mentha* (*Mentha piperita* i *Mentha longifolia*) postoji razlika u ukupnoj količini ispitivanih fenolnih jedinjenja, zatim i flavonoida, kao i antioksidativnoj aktivnosti.
- Na razlike u koncentraciji antioksidativnih jedinjenja u okviru iste biljne vrste uticaj mogu imati različiti parametri kao što su nadmorska visina, klimatske prilike, uslovi gajenja, postupak ekstrakcije, rastvarač i slično.
- Pitoma nana sa južnog regiona Crne Gore sadrži veću koncentraciju fenolnih jedinjenja (u intervalu od 70,01 mg GAE/g suve biljke do 210,5 mg GAE/g suve biljke) u odnosu na pitomu nanu sa sjevernog regiona (u intervalu od 56,44 mg GAE/g suve biljke do 193,74 mg GAE/g suve biljke). Uzrok ove razlike može biti temperatura i intenzitet svjetlosti, jer nana proizvedena na sunčanim mjestima sadrži veći procenat antioksidativnih komponenti.
- Na biosintezu flavonoida u biljkama pozitivan uticaj imaju dugi dani sa hladnim noćnim temperaturama, što može biti uzrok veće koncentracije flavonoida u pitomoj i divljoj nani sa sjevernog područja, u odnosu na pitomu i divlju nanu toplijeg područja. Sadržaj flavonoida u ekstraktima pitome nane sa područja Pljevalja se kretao u intervalu od 63,75 mg Qc/g suve biljke do 184,8 mg Qc/g suve biljke, dok se u ekstraktima divlje nane kretao od 77,75 mg Qc/g suve biljke do 155,2 mg Qc/g suve biljke. Sadržaj flavonoida u ekstraktima pitome nane sa područja Herceg Novog se kretao u intervalu od 51,76 mg Qc/g suve biljke do 149,62 mg Qc/g suve biljke, dok se u ekstraktima divlje nane kretao od 60,42 mg Qc/g suve biljke do 121,64 mg Qc/g suve biljke. Generalno visoke koncentracije flavonoida dobijene u ovom radu mogu predstavljati odgovor biljke na uslove abiotičkog i biotičkog stresa.

- Na osnovu ispitivanja uticaja različitih metoda ekstrakcije na koncentracije bioaktivnih materija sadržanih u biljnim ekstraktima, ultrazvučna ekstrakcija se pokazala kao najefikasnija metoda u poređenju sa drugim tipovima ekstrakcija, a kao najmanje efikasna se pokazala metoda maceracije. Ukupni sadržaj fenola u etanolnim ekstraktima dobijenim postupkom ultrazvučne ekstrakcije je iznosio od 193,74 mg GAE/g suve biljke do 241,35 mg GAE/g suve biljke, dok je za vodene ekstrakte vrijednost iznosila od 110,04 mg GAE/g suve biljke do 140,04 mg GAE/g suve biljke. Ukupni sadržaj flavonoida u etanolnim ekstraktima dobijenim postupkom ultrazvučne ekstrakcije se kretao u intervalu od 121,64 mg Qc/g suve biljke do 184,8 mg Qc/g suve biljke, dok je za vodene ekstrakte vrijednost iznosila od 95,86 mg Qc/g suve biljke do 116,28 mg Qc/g suve biljke. U etanolnim ekstraktima dobijenim postupkom maceracije sadržaj fenola je iznosio od 97,04 mg GAE/g suve biljke do 163,72 mg GAE/g suve biljke, a u vodenim ekstraktima od 56,44 mg GAE/g suve biljke do 96,35 mg GAE/g suve biljke. Količina flavonoida dobijena postupkom maceracije u etanolnim ekstraktima je iznosila od 68,48 mg Qc/g suve biljke do 89,92 mg Qc/g suve biljke, dok je primjenom vode kao ekstragensa koncentracija bila manja tj. od 51,76 mg Qc/g suve biljke do 77,75 mg Qc/g suve biljke.

- Shodno prethodno navedenom, na osnovu ispitivanja uticaja različitih rastvarača zaključuje se da su u etanolnim ekstraktima biljnog materijala, ekstrahovane veće koncentracije/količine ispitivanih antioksidativnih jedinjenja nego u vodenim ekstraktima.

- Ispitivani biljni ekstrakti imaju visok antioksidativni potencijal dobijen DPPH i FRAP testom što ukazuje da su odabrane vrste roda *Mentha* dobri hvatači slobodnih radikala, tj. antioksidansi koji mogu da reaguju sa slobodnim radikalima i ograniče napad ROS na biološke sisteme. U ekstraktima pitome nane antioksidativna aktivnost određivana DPPH testom je iznosila od 25,02 µg/mL do 148,07 µg/mL, a mjerena FRAP testom od 0,73 µmol Fe²⁺/g suve biljke do 3,92 µmol Fe²⁺/g suve biljke. Antioksidativna aktivnost ekstrakata divlje nane određivana DPPH testom se kretala u intervalu od 16,50 µg/mL do 162,54 µg/mL, a mjerena FRAP testom od 0,62 µmol Fe²⁺/g suve biljke do 4,27 µmol Fe²⁺/g suve biljke.

Poređenjem rezultata dobijenih primjenom DPPH i FRAP metoda u ovom istraživanju uočeno je da najveći antioksidativni potencijal imaju etanolni ekstrakti divlje nane, dobijeni postupkom ultrazvučne ekstrakcije sa područja Pljevalja.

- U ispitivanim ekstraktima pitome i divlje nane sa sjevernog i južnog područja polifenolna jedinjenja dala su pozitivni stepen korelacije sa vrijednostima dobijenim FRAP metodom (od

$r=0.743688$ do $r=0.917092$). Uočena je negativna korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti utvrđene DPPH metodom (od $r= -0.62543$ do $r= -0.85682$).

-Kada je riječ o metodama ekstrakcije nađena je veoma jaka korelacija između sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata mjerenih FRAP testom za korišćene metode ekstrakcije, odnosno za ultrazvučnu ekstrakciju $r=0.926636$, digestiju $r=0.930955$, maceraciju $r=0.813691$ i Sokslet ekstrakciju $r=-0.97041$). Veoma slaba korelacija je nađena između sadržaja flavonoida ekstrakata dobijenih Sokslet ekstrakcijom i FRAP testa $r=-0.09947$.

Na osnovu dobijenih rezultata generalno se može zaključiti da su ekstrakti herbe pitome i divlje nane sa sjevernog i južnog područja Crne Gore dobar izvor antioksidativnih jedinjenja.

7 LITERATURA

1. Abbaszadeh B., Valadabadi S.A., Farahani H.A., Darvishi H.H. (2009). Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species, *African Journal of Plant Science*, 3(10), 217–221.
2. Aflatuni A. (2005). The yield and essential oil content of mint (*Mentha* ssp.) in Northern Ostrobothnia, Dissertation (Master), Faculty of Science, University of Oulu, Department of Biology, Finland.
3. Ahmad N., Fazal H., Ahmad I., Abbasi, B. H. (2012). Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* Species, *Toxicology and Industrial Health*, 28(1), 83–89.
4. Al-Okbi, S. Y., Fadel, H. H. M., Mohamed, D. A. (2015). Phytochemical constituents, antioxidant and anticancer activity of *Mentha citrata* and *Mentha longifolia*, *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 739–751.
5. Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D.G., Lightfoot D.A. (2017). Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts, *Plants*, 6(4), 1-23.
6. Arumugam P., Ramamurthy P., Santhiya S. T., Ramesh A. (2006). Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn, an analysis by ABTS(+) decolorization assay, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 119-124.
7. Azahar N.I., Mokhtar N.M., Arifin M.A. (2020). Piper betle: a review on its bioactive compounds, pharmacological properties, and extraction process, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991(1), 1-17.
8. Bahadori M. B., Zengin G., Bahadori S., Dinparast L., Movahhedini N. (2018). Phenolic composition and functional properties of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha* (Stapf) Briq.) *International Journal of Food Properties*, 21(1), 183-193.
9. Bancuta O. R., Chilian A., Bancuta I., Ion R. M., Setnescu R., Setnescu T., Gheboianu A. (2016). Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations, *Romanian Journal Physics*, 61 (7-8), 1255-1264.
10. Behrendorff J. B., Vickers C. E., Chrysanthopoulos P., Nielsen K. L. (2013). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis, *Microbial Cell Factories*, 12, 76.
11. Bektić S., Huseinović S., Osmanović I., Mušanović E. (2019). Tradicionalna primjena samoniklog ljekovitog bilja na području Tuzle, Zbornik radova, XXIV Savetovanje o biotehnologiji, Agronomski fakultet u Čačku, Srbija, 415-419.
12. Benedec D., Vlase L., Oniga I., Mot A.C., Dumitrescu-Silaghi R., Hanganu D., Brindusa T., Crișan G. (2013). LC-MS analysis and antioxidant activity of phenolic compounds from two indigenous species of *Mentha*, *Farmacia*, 61(2), 262–267.
13. Benzie F.F., Strain J.J. (1999). 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, *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.

14. Benzie I.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
15. Berselli P.V., Zava S., Montorfano G., Corsetto P.A., Krzyzanowska J., Oleszek W., Berra B., Rizzo A. M. A. (2010). A mint purified extract protects human keratinocytes from short-term, chemically induced oxidative stress, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58(21), 11428-34.
16. Bidel L.P.R., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay-Allemand C. (2010). Biological activity of phenolics in plant cells, U: *Recent Advances in Polyphenol Research*, (Celestino Santos-Buelga C., Escribano-Bailon M. T., Lattanzio V. ured.), 163-205.
17. Bielski B. H., Arudi R. L., Sutherland M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids, *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4759-4761.
18. Blois M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
19. Brahmi F., Madani K., Chibane M., Duez P. (2017). Chemical composition and biological activities of *Mentha* species, *Aromatic and medicinal plants - Back to Nature*, Intech Open, Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/67291>
20. Chandra S., Khan S., Avula B., Lata H., Yang M. H., Elsohly M. A., and Khan I. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study, *Evidence-Based Complement Alternative Medicine* 2014:253875.
21. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics and ecophysiology, *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1–20.
22. Council of Europe. (2016). *Evropska farmakopeja*, Eur. 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France.
23. Dai J., Mumper J.R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
24. Dragumilo V. A. (2021). Suzbijanje korova u pitomoj nani (*Mentha x piperita* L.) primenom prirodnih i sintetičkih malčeva, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
25. Drinić Z. (2020). Ekstrakcija industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), Doktorska disertacija Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
26. Džamić A. M., Soković M. D., Ristić M. S., Novaković M., Grujić-Jovanović S., Tešević V., Marin P. D. (2010). Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson essential oil, *Botanica Serbica*, 34(1), 57-61.
27. Đorđević M. M. (2019). Molekularni mehanizmi antioksidativnog dejstva ekstrakta kičice (*Centaureum erythraea* RAFN) u eksperimentalnom modelu dijabetesa pacova, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
28. ESCOP (1992) Proposal for a European monograph on the medicinal use of *Menthae piperitae aetheroleum* peppermint oil. In: Proposal for European Monograph on the Medicinal Use. Vol 3
29. Fernandes R. P. P., Trindade M. A., Tonin F. G., Lima C. G., Pugine S. M. P., Munekata S. E. P., Lorenzo M. J. , Melo P. M. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher

- antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers, *Journal of Food Science Technology*, 53(1), 451–460.
30. Finkel T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress, *Current opinion in cell biology*, 15(2), 247-254.
 31. Fonmboh D.J., Abah E.R., Fokunang T.E., Herve B., Teke G.N., Rose N. M., Borgia N.N., Fokunang L.B., Andrew B.N., Kaba N., Bathelemy N., Ntungwen F.C. (2020). An overview of methods of extraction, isolation and characterization of natural medicinal plant products in improved traditional medicine research, *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 31-57.
 32. Fridovich E. S., Porter A. N. (1981). Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide, *Journal of Biological Chemistry*, 256(1), 260-265.
 33. Ganzera M., Guggenberger M., Stuppner H., Zidorn C. (2008). Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA, *Planta Medica* 74, 453-457.
 34. Germer T., Zwinkels J., Tsai B. (2014). Theoretical concepts in spectrophotometric measurements, spectrophotometry: Accurate measurements of the optical properties of materials, Elsevier B.V., *Amsterdam*, 11-66.
 35. Guntarti A., Annisa J., Mughniy M., Rizqi F. (2017). Effect of regional variation on the total flavonoid level of ethanol extract of Mangosteen (*Garcinia mangostana*) peels, *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 8(2), 136–143.
 36. Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts, *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8-26.
 37. Gurib-Fakim A. (2006). Review: Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2-93.
 38. Gutierrez E., Velasco A.G., Lucas J.A., Gutierrez-Mañero F.J., Ramos-Solano B. (2017). The flavonol-anthocyanin pathway in blackberry and arabidopsis: State of the Art. U: Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health, (Justino G. C., ured.), InTech, Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/67902>.
 39. Halliwell B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts, *The FASEB Journal*, 1(5), 358-364.
 40. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (Third edition). Oxford: Clarendon Press, 1-25.
 41. Handa S., Khanuja S.P., Longo G. and Rakesh D. D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy.
 42. Hanlidou E., Karousou R., Kleftoyanni V., Kokkini S. (2004). The herbal market of Thessaloniki (Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition, *Journal of Ethnopharmacology*, 281-299.
 43. Harley R.M. (1972). *Mentha*. U: Flora Europaea (Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., ured.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 183–186.
 44. Hassan R., Abotaleb S., Hamed H., Eldeen, M. (2020). Antioxidant and biological activities of *Mentha longifolia* L. extracts, *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 11(3), 59-62.

45. Hayat K. (2020). Impact of drying methods on the functional properties of peppermint (*Mentha piperita* L.) leaves, *Science Letters*, 8 (1), 36-42.
46. Hedges J.L., Lister E. C. (2007). Nutritional attributes of herbs, *Crop & Food Research Confidential Report* No. 1891.
47. Henglein A., Kormann C. (1985). Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water, *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 48, 251-258.
48. Hossain M. A., Al-Hdhrami S. S., Weli A. M., Al-Riyami Q., Al-Sabahi J. N. (2014). Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L. grown in Sultanate of Oman, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, 368–372.
49. <https://geoportal.co.me/Geoportal01> (pristupljeno 07.12.2023.)
50. <https://glossary.periodni.com> (pristupljeno 01.10.2023.)
51. Hussain A. I., Anwar F., Nigam P. S., Ashraf M., Gilani A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827–1836.
52. Idris A., Linatoc A. C., Bakar M. F. A., Ibrahim Z.T., Audu Y. (2018). Effect of light quality and quantity on the accumulation of flavonoid in plant species, *Journal of Science and Technology*, 10(3), 32-45.
53. Inoue T., Sugimoto Y., Masuda H. and Kamei C. (2002). Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L., *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(2), 256-259.
54. Jaakola L., Hohtola A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants, *Plant, Cell and Environment* 33, 1239–1247.
55. Jakovljević D., Bojović B., Topuzović M., Stanković M. (2017). Antioksidativna aktivnost vrsta *Mentha longifolia*, *M. piperita* i *M. pulegium* (Lamiaceae), *Zbornik radova, XXII Savjetovanje o biotehnologiji*, Agronomski fakultet u Čačku, Srbija, 573-577.
56. Jakovljević D.Z., Vasić S.M., Stanković M.S., Čomić L. R., Topuzović M. D. (2015). Secondary metabolite content and in vitro biological effects of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. subsp. *chamaepitys*. *Archives of Biological Sciences*, 67(4): 1195- 1202.
57. Jarić S., Mitrović M., Karadžić B., Kostić O., Đurđević L., Pavlović M., Pavlović P. (2014). Plant resources used in Serbian medieval medicine, ethnobotany and ethnomedicine, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(7), 1359–1379.
58. Jarić S., Popović Z., Mačukanović-Jocić M., Đurđević L., Mijatović M., Karadžić B., Mitrović M., Pavlović P. (2006). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia), *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 160–175.
59. Jovović Z., Muminović Š., Baričević D., Stešević D. (2020). Tehnologija proizvodnje ljekovitog, aromatičnog i začinskog bilja, Univerzitet Crne Gore, Podgorica, Crna Gora.
60. Jovović, Z. (2014). Poljoprivreda i klimatske promene - Biljni genetički resursi u Crnoj Gori i mogućnosti njihovog održivog korišćenja, Centar za razvoj agrara, Bijelo Polje, Crna Gora, 393-399.
61. Karousou R., Balta M., Hanlidou E. Kokkini S. (2006). “Mints”, smells and traditional uses in Tesseloniki (Greece) and other Mediterranean countries, *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 248–257.

62. Kedare B. S., Singh R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
63. Kim J., Choi K., Chung D.S. (2012). Sample preparation for capillary electrophoretic applications, *Analytical Techniques for scientists*, 3, 701-721.
64. Kovačević N., Kundaković T. (2007). Antimikrobna aktivnost sastojaka biljaka, *Arhiv za farmaciju*, 57, 277-287.
65. Kumar K., Srivastav S., Sharanagat V.S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 1-11.
66. Ku-Vera J. C., Jiménez-Ocampo R., Valencia-Salazar S. S., Montoya-Flores M. D., Molina Botero I. C., Arango J., Gómez-Bravo C.A., Aguilar-Pérez C.F. and Solorio-Sánchez F. J. (2020). Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in Ruminants, *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 584.
67. Lamuela-Raventós R.M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity, *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, New York: Wiley; 107–115.
68. Leucuta S., Vlase L., Gocan S., Radu L., Fodorea C. (2005). Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28, 3109-3117.
69. Liu W., Yin D., Li N., Hou X., Wang D., Li D., Liu J. (2016). Influence of environmental factors on the active substance production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and its quality assessment, *Scientific Reports*, 6(1), 2859.
70. Lupsor S., Rotariu R., Oancea, E., Oancea I.A. (2019). Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity of mint macerate, *Journal of Science and Arts* 19, 973–982.
71. Macip S., Kosoy A., Lee S.W., O'Connell M.J., Aaronson S.A. (2006). Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk-1- dependent G2 checkpoint, *Oncogene* 25, 6037-6047.
72. Mamadaliyeva N., Hussain H., Xiao J. (2020). Recent advances in genus *Mentha*: phytochemistry, antimicrobial effects, and food applications, *Food Frontiers*, 1(4), 435-458.
73. Masella R., Benedetto R., Varì R., Filesi C., Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), 577-586.
74. Mastelić J., Jerković I. (2002). Free and glycosidically bound volatiles of *Mentha longifolia* growing in Croatia, *Chemistry of Natural Compounds*, 38, 561-564.
75. Matejić J.S. (2013). Biološka aktivnost etarskih ulja i ekstrakata odabranih vrsta iz familije Apiaceae, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
76. Milić B., Đilas S., Čanadanović-Brunet J., Sakač M. (2000). Biljni polifenoli, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
77. Mimica-Dukić N., Božin B. (2007). Essential oils from Lamiaceae species as promising antioxidant and antimicrobial agents, *Natural Product Communications*, 2(4), 445- 452.
78. Mimica-Dukić N., Božin B. (2008) *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites, *Current Pharmaceutical Design*, 14, 3141-3150.

79. Mišan A. (2020). Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
80. Mussatto S. I. (2015). Generating biomedical polyphenolic compounds from spent coffee or silverskin, *Coffee in Health and Disease Prevention*, (Preedy V.R., ured.), Elsevier, 93–106.
81. Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species, *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 7(3), 203–209.
82. Nikšić H., Bešović E.K., Makarević E., Durić K. (2012). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mentha longifolia* (L.) Huds. essential oil, *Journal of Health Science*, 2(3), 192–200.
83. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. (2016). Flavonoids: an overview, *Journal of nutritional science*, 5(47), 1-15.
84. Park Y.J., Baek S.-A., Choi Y., Kim J.K., Park S.U. (2019). Metabolic profiling of nine *Mentha* species and prediction of their antioxidant properties using chemometrics, *Molecules*, 24, 258.
85. Patil S.R., Godghate A.G. (2016). *Mentha piperita* Linn: phytochemical, antibacterial and dipterian adulticidal approach, *International Journal of Pharmaceutics Sciences*, 8 (3), 352-355.
86. Patonay K., Korózs M., Murányi Z., Kónya E. P. (2017). Polyphenols in northern Hungarian *Mentha longifolia* (L.) L. treated with ultrasonic extraction for potential oenological uses, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41, 208–217.
87. Pavlović R. D. (2012). Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna Salisb.* i *Erica* L. (Ericaceae), Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
88. Pereira O., Cardoso S.M. (2013). Overview on *Mentha* and *Thymus* polyphenols, *Current Analytical Chemistry*, 9, 382–396.
89. Pieroni A., Giusti M.E., Quave C.L. (2011). Cross-cultural ethnobiology in the Western Balkans: medical ethnobotany and ethnozoology among Albanians and Serbs in the Pešter Plateau, Sandžak, south-western Serbia, *Human Ecology*, 39(3), 333–349.
90. Radojčić B. (2008). Geografija Crne Gore prirodna osnova, Knjiga I, ured. Mladen Lompar, DANU, Podgorica, Crna Gora.
91. Redžić S.S. (2007). The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina, *Collegium Antropologicum*, 31(3), 869–890.
92. Ringuélet J.A., Cerimele E.L., Henning C.P., Rí M.S., Urrutia M.I. (2003). Propagation methods and leaf yield in peppermint (*Mentha x piperita* L.), *Journal of Herbs Spices Medical Plants*, 10, 55–60.
93. Rivero-Cruz J. F., Granados-Pineda J., Pedraza-Chaverri J., Pérez-Rojas J. M., Kumar- Passari A., Diaz-Ruiz G., Rivero-Cruz B. E. (2020). Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of Mexican brown propolis, *Antioxidants*, 9(1), 70.
94. Salehi B., Stojanović-Radić Z., Matejić J., Sharopov F., Anatolak H., Kregiel D., Sen S., Sharifi-Rad M., Acharya K., Sharifi-Rad R., Martorell M., Sureda A., Martins N., Sharifi-Rad J. (2018). Plants of the genus *Mentha*: from farm to food factory, *Plants*, 7, 70.
95. Savić Lj. (2014). Metode ekstrakcije biljnih materijala: uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida, *Lekovite Sirovine* 34(34), 93-103.

96. Singh R., Shushni M. A., Belkheir A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L, *The Arabian Journal of Chemistry*, 8, 322–328.
97. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
98. Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species, *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4115–4124.
99. Stanisavljević D., Đorđević S., Milenković M., Lazić M., Veličković D., Randelović N., Zlatković B. (2014). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson, dried by three different techniques, *Records of natural products*, 8(1), 61–65.
100. Stanisavljević D., Stojićević S., Đorđević S., Zlatković B., Veličković D., Karabegović I., Lazić M. (2012). Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *Mentha longifolia* L. Hudson dried by the use of different techniques, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 18, 411–420.
101. Stanković J. (2019). Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih vrsta lubenica i dinja, Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.
102. Šarčević-Todosijević LJ., Petrović B., Vukomanović P., Živanović Lj., Garčić J., Popović V. (2019). Antimikrobna aktivnost sekundarnih biljnih metabolita, Zbornik radova, XXIV Savetovanje o biotehnologiji, Agronomski fakultet u Čačku, Srbija, 357-364.
103. Šarić-Kundalić B., Fialová S., Dobeš C., Ölzant S., Tekelová D., Grančai D., Reznicek G., Saukel J. (2009). Multivariate numerical taxonomy of *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars, *Scientia Pharmaceutica*, 77, 851–876.
104. Šarić-Kundalić B., Dobeš C., Klatte-Asselmeyer V., Saukel J. (2010). Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 33–55.
105. Šarić-Kundalić B., Dobeš C., Klatte-Asselmeyer V., Saukel J. (2011). Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina, *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 1051–1076.
106. Tafrihi M., Imran M., Tufail T., Gondal T. A., Caruso G., Sharma S., Sharma R., Atanassova M., Atanassov L., Valere Tsouh Fokou P., Pezzani R. (2021). The wonderful activities of the genus *Mentha*: not only antioxidant properties, *Molecules* 26, 1118.
107. Treutter D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 4, 147–157.
108. Trifunović Špirović B., Tojić T. (2022). Metode ekstrakcije i identifikacije etarskih ulja i njihov bioherbicidni potencijal, *Acta herbologica*, 31(1), 5-26.
109. Tsioutsidou E. E., Giordani P., Hanildou E., Biagi M., De Feo V., Cornara L. (2019). Ethnobotanical study of medicinal plants used in central Macedonia, Greece, *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019:4513792.

110. Tucker A. O., Naczi R. F. C. (2007), *Mentha*: an overview of its classification and relationships. U: *Mint: The Genus Mentha, Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles* (Lawrence, B. ured), 44, 1–40.
111. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
112. Vaya J., Aviram M. (2001). Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and aedical applications, *Current Medical Chemistry – Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 1(1), 99 – 117.
113. Vidović S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
114. Wade L.G. (2018). Phenol, Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/phenol>
115. Xiao F., Xu T., Lu B., Liu R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components, *Food Frontiers*, 1(1), 60-69.
116. Xu B.J., Chang S.K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents, *Journal of Food Science*, 72, 159–166.
117. Zirojević T., Jović S., Čeleketić D., Petrović A. (2002). Slobodni radikali i njihov biološki značaj, VI Savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta, Zbornik radova, Vrnjačka Banja, Srbija, 45-54.
118. Živanović-Turudija S. (2015). Organizacija proizvodnje i prerade lekovitog i aromatičnog bilja u Republici Srbiji, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.