УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ У ЛЕСКОВЦУ

Александра Н. Миленковић

ЕКСТРАКЦИЈА, ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БИОАКТИВНИХ СУПСТАНЦИ ИЗ ПЛОДА ЦРНОГ БИБЕРА (*PIPER NIGRUM* L.)

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Лесковац, 2026.

UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC

Aleksandra N. Milenković

EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLACK PEPPER (*PIPER NIGRUM* L.) FRUIT

DOCTORAL DISSERTATION

Leskovac, 2026.

МЕНТОР: Проф. др Љиљана Станојевић, редовни професор
Универзитет у Нишу
Технолошки факултет у Лесковцу

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ: Проф. др Весна Николић, редовни професор
Универзитет у Нишу
Технолошки факултет у Лесковцу

Проф. др Зорица Стојановић-Радић, редовни професор
Универзитет у Нишу
Природно-математички факултет у Нишу

Проф. др Јелена Звездановић, редовни професор
Универзитет у Нишу
Технолошки факултет у Лесковцу

др Јелена Станојевић, ванредни професор
Универзитет у Нишу
Технолошки факултет у Лесковцу

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Проф. др Љиљана Станојевић, редовни професор Универзитет у Нишу, Технолошки факултет у Лесковцу
Наслов:	Екстракција, изолација и карактеризација биоактивних супстанци из плода црног бибера (*Piper nigrum* L.)
Резиме:	Плод црног бибера представља извор алкалоида, пиперина, терпена и других биолошки активних компоненти. У дисертацији је урађена систематична, компаративна анализа екстракције, изолације и карактеризације биоактивних супстанци из плода црног бибера; праћена кинетика екстракције и хидродестилације; одређене биолошке активности изолата; припремљени су инклузиони комплекси пиперина са циклодекстринима, испитана стбилност и растворљивост пиперина у инклузионим комплексима. Примењене технике екстракције (мацерација, рефлукс, Soxhlet и ултразвучна екстракција), утицале су на принос и кинетику екстракције УЕМ 70% v/v етанолом. Највећи принос УЕМ постигнут је Soxhlet екстракцијом. За моделовање кинетике екстракције УЕМ примењени су модел Пономарјева и модел нестационарне дифузије. Квалитативни састав екстраката, као и садржај пиперина у њима одређен је UHPLC-DAD-MS/MS анализом. Одређене су антиоксидативна, антимикробна, антиинфламаторна и антихипергликемијска активност екстраката као и садржај макро- и микроелемената у екстрактима. Изолација етарског уља и хидролата извршена је применом две технике хидродестилације. Применом модификоване Clevenger хидродестилације постигнут је већи принос етарског уља и обогаћивање хидролата биолошки активним компонентама. Квалитативни и квантитативни састав појединих компоненти етарских уља одређен је GC/MS и GC/FID анализама. Доминантне компоненте биле су (*E*)-кариофилен, лимонен и сабинен. Квалитативни и семи-квантитативни састав хидролата одређен је

	HS-SPME анализом. Одређена је антиоксидативна, антимикробна и антихипергликамијска активност етарских уља и хидролата. Из плода црног бибера изоловани су и окарактерисани олеорезин и масно уље и одређене биолошке активности. Изолован је пиперин и припремљени су инклузиони комплекси са *β*-CD и 2-HP-*β*-CD, чије структуре су потврђене FT-IR, DSC, XRD и ^{1}H NMR анализама. Пиперин формира комплекс ограничене растворљивости са *β*-CD док са HP-*β*-CD формира стабилан, водорастворљив комплекс. Комплексирање је довело до повећања фотостабилности и до благог побољшања антиоксидативне активности у случају HP-*β*-CD. Примена савремених инструменталних метода омогућила је корелацију између хемијског састава, структуре и биолошких активности различитих изолата. Дисертација пружа систематичан научни допринос у области технологије природних производа и развоја фитофармацеутских облика са потенцијалном применом у фармацеутској, козметичкој и прехрамбеној индустрији.
Научна област:	Технолошко инжењерство
Ужа научна област:	Хемија и хемијске технологије
Кључне речи:	Црни бибер (*Piper nigrum* L.), екстракција, хидродестилација, природни производи, биолошке активности, циклодекстрини

УДК:	633.841 : 66.061 : 543.5 (043.3)

CERIF класификација:	T350 - Хемијска технологија и инжењеринг

Тип лиценце Креативне заједнице::	**CC BY-NC-ND**

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	prof. dr Ljiljana Stanojević, full professor Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš
Title:	Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from black pepper (*Piper nigrum* L.) fruit
Abstract:	Black pepper fruit represents a valuable source of piperamides, terpenes, and other biologically active constituents. This dissertation provides a systematic and comparative study of the extraction, isolation, and characterization of bioactive compounds from black pepper fruit, including the investigation of extraction and hydrodistillation kinetics, evaluation of the biological activities of the obtained isolates, and assessment of the solubility, stability, and functional properties of piperine inclusion complexes with cyclodextrins. The applied extraction techniques, maceration, reflux, Soxhlet, and ultrasound-assisted extraction, significantly affected the yield and kinetics of total extractive matter (TEM) obtained using 70% v/v ethanol. The highest TEM yield was achieved by Soxhlet extraction. The kinetics of TEM extraction were modeled using the Ponomarev and the unsteady-state diffusion models. The qualitative composition of the extracts, as well as their piperine content, was determined by UHPLC-DAD-MS/MS analysis. The antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and antihyperglycemic activities of the extracts were evaluated, as well as macro- and microelement content. Essential oil and hydrolate were isolated using two hydrodistillation techniques. Modified Clevenger hydrodistillation resulted in a higher essential oil yield and enhanced enrichment of hydrolates with biologically active compounds. The qualitative and quantitative composition of the essential oils was determined by GC/MS and GC/FID analyses, whereas hydrolates were characterized by HS-SPME analysis. The dominant essential oil constituents were (*E*)-caryophyllene, limonene, and sabinene. Their antioxidant, antimicrobial, and antihyperglycemic activities were also assessed. Oleoresin and fatty oil were additionally isolated, characterized, and biologically evaluated. Piperine was isolated and inclusion complexes with *β*-CD and 2-HP-*β*-CD were prepared and confirmed by FT-IR, DSC, XRD, and ^{1}H NMR analyses. Complexation improved photostability and slightly enhanced antioxidant activity in the case of HP-*β*-CD. Overall, this dissertation provides a systematic scientific contribution to natural product technology and the development of phytopharmaceutical systems with potential applications in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries.

Scientific Field:	Technological engineering
Scientific Discipline:	Chemistry and chemical technology
Key Words:	Black pepper (*Piper nigrum* L.), extraction, hydrodistillation, natural products, biological activities, cyclodextrins
UDC:	633.841 : 66.061 : 543.5 (043.3)
CERIF Classification:	T350 - Chemical technology and engineering
Creative Commons License Type:	**CC BY-NC-ND**

Захвалница

Ова дисертација није настала само из научног рада, експеримената и резултата, већ и из свих оних тихих и пресудних тренутака који човека мењају више него што и сам слути. У њене темеље нису уткани само књиге, лабораторија и истраживање, већ и људи, искушења, губици и подршке без којих овај пут не би био исти. Зато је овај рад више од научног доприноса — он је траг једног времена, једног сазревања и једног унутрашњег пута.

Експериментални део ове дисертације реализован је највећим делом у лабораторијама Технолошког факултета у Лесковцу Универзитета у Нишу — Лабораторији за технологију биоактивних сировина и производа, Лабораторији за спектроскопију, Лабораторији за масену спектрометрију и Лабораторији за неорганску анализу — установе у којој сам завршила све претходне нивое студија и у којој су постављени темељи мог научног и професионалног развоја. Искрену захвалност изражавам свим професорима и сарадницима у наведеним лабораторијама, на стручној помоћи, несебичној подршци и доприносу који је био од великог значаја за извођење и поузданост експерименталних испитивања. Захвалност дугујем и Природно-математичком факултету у Нишу, Департману за биологију и екологију, где су спроведена испитивања антимикробне активности у сарадњи са др Милицом Пејчић Пејић, под надзором проф. др Зорице Стојановић-Радић. Захвалност упућујем и Медицинском факултету у Нишу, где су реализована испитивања антиинфламаторне активности у сарадњи са проф. др Драганом Павловић и проф. др Јеленом Матејић. Такође, захваљујем Природно-математичком факултету у Новом Саду, Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине, где је извршена ^{1}H NMR анализа, као и Департману за физику истог факултета, у оквиру којег је спроведена XRD анализа уз подршку проф. др Срђана Ракића.

Искрену захвалност упућујем председнику комисије, проф. др Весни Николић, на указаном поверењу, времену и пажњи посвећеној вредновању овог рада. Захваљујем се и члановима комисије, проф. др Јелени Звездановић и проф. др Зорици Стојановић-Радић, на стручним сугестијама, корисним запажањима и доприносу да ова дисертација добије свој коначан облик.

Посебно место у овој захвалности припада проф. др Јелени Станојевић, пријатељу и мом драгом човеку, чија су ми доброта и искрена подршка значиле много више од формалне академске помоћи. Посебно ћу памтити колико ми се нашла на самом почетку мог асистентског рада, када је свака реч подршке имала посебну тежину.

Са највећом захвалношћу обраћам се и свом ментору, проф. др Љиљани Станојевић. Њена подршка, стрпљење, разумевање и вера у мене нису били само менторска помоћ, већ ослонац који се увек памти. За све савете, охрабрење и људску топлину коју ми је несебично пружала, дугујем јој захвалност од срца.

Захваљујем се и свим својим пријатељима, који су својим присуством, разумевањем и речима подршке учинили да и најтежи дани буду лакши (*Јека, Гага, Тања, Ната, Мара, Миленка, Граде, Цока, Аџко*).

Најдубљу захвалност дугујем својој породици, свом првом и последњем уточишту, темељу из ког сам расла и снази која ме је држала онда када сам мислила да више не могу. Посебну захвалност дугујем свом оцу и брату, који су били уз мене у данима када је било најтеже, пружајући ми ослонац, разумевање и снагу да истрајем. Њихова љубав и присуство били су тиши од свих речи, а јачи од свих искушења.

Ову дисертацију посвећујем ***својој мајци***, мојој мајчици, која је сада на небу. Не постоје речи довољно велике за онога ко је био почетак свега, ни реченице довољно нежне за онога ко је био прва и најчистија љубав живота. Иако више није овде, њена

љубав није отишла, остала је у мени, у свакој мојој снази, у свакој сузи коју сам претворила у корак напред, у свему што јесам и чему још тежим. Она је моја тиха светлост која се не гаси, моја невидљива молитва и део мене који време не може однети.

На крају, остаје истина да ниједан искрен труд није узалудан. Човек се не одређује тиме колико је био поштеђен искушења, већ тиме шта је из њих изградио. А дело у које су уграђени знање, вера, истрајност и душа не завршава се последњом страницом, већ тек тада почиње да живи.

Александра

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И СИМБОЛА

скраћенице на латиници

^{1}H-NMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца (енг. *Proton Nuclear Magnetic Resonance*)
ABTS	(2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин)-6-сулфонска киселина) (енг. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)
ATCC	Америчка колекција типских култура (енг. *American Type Culture Collection*)
b	коефицијент испирања
BHA	бутиловани хидрокси-анизол (енг. *Butylated Hydroxyanisole*)
BHT	бутиловани хидрокси-толуен (енг. *Butylated Hydroxytoluene*)
BSA	албумин говеђег серума (енг. *Bovine Serum Albumine*)
CD	циклодекстрини (енг. *Cyclodextrins*)
$CDCl_3$	деутерисани хлороформ (енг. *Deuterated Chloroform*)
COX-2	циклооксигеназа 2 (енг. *Cyclooxygenase-2*)
CYP450	цитохром P450 (енг. *Cytochrome P450*)
D_2O	деутеријум-оксид (енг. *Deuterium Oxide*)
DAD	детектор са диодним низом (енг. *Diode-Array Detection / Diode-Array Detector*)
DMSO	диметилсулфоксид (енг. *Dimethylsulfoxide*)
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (енг. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*)
DSC	диференцијална скенирајућа калориметрија (енг. *Differential Scanning Calorimetry*)
EC_{50}	ефективна концентрација при којој се остварује 50% ефекта (енг. *Effective Concentration 50%*)
EDTA	етилендиаминтетра-сирћетна киселина (енг. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
-ESI	негативни режим електроспреј јонизације (енг. *Negative Electrospray Ionization Mode*)
+ESI	позитивни режим електроспреј јонизације (енг. *Positive Electrospray Ionization Mode*)

FAO	Организација за храну и пољопривреду (енг. *Food and Agriculture Organization*)
FID	пламено-јонизациони детектор (енг. *Flame Ionization Detection*)
FT-IR	инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (енг. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)
GC	гасна хроматографија (енг. *Gas Chromatography*)
GC/FID	гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором (енг. *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*)
GC/MS	гасна хроматографија са масеном спектрометријом (енг. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)
GKE	еквивалент галне киселине (енг. *Gallic Acid Equivalent*)
HMGB1	протеин високе покретљивости групе 1 (енг. High Mobility Group Box 1)
HPLC	течна хроматографија високих перформанси (енг. *High-Performance Liquid Chromatography*)
HP-*β*-CD	2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрин (енг. *2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin*)
HS-SPME	микроекстракција на чврстој фази изнад површине узорка (енг. *Headspace Solid-Phase Microextraction*)
ICP-OES	индуковано спрегнута плазма са оптичко-емисионом спектрометријом (енг. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)
IL-1*β*	интерлеукин 1β (енг. *interleukin 1 beta*)
IL-6	интерлеукин 6 (енг. *interleukin 6*)
iNOS	индуцибилна синтаза азот-моноксида (енг. *inducible Nitric Oxide Synthase*)
IUPAC	Међународна унија за чисту и примењену хемију (енг. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
k	коефицијент правца линеарне зависности
LOX	липоксигеназа (енг. *Lipoxygenase*)
LPS	липополисахарид (енг. *Lipopolysaccharide*)
MAO	моноамин оксидаза (енг. *Monoamine Oxidase*)

MAPK	митогеном активирана протеин-киназа (енг. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
NF-κB	нуклеарни фактор капа Б (енг. *Nuclear Factor kappa B*)
NLRP3	инфламазом NLRP3 (енг. *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome*)
Nrf2/HO-1	нуклеарни фактор 2 сродан еритроидном фактору 2/хем-оксигеназа 1 (енг. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Heme oxygenase-1*)
PNP-G	*p*-нитрофенил-*α*-D-глукопиранозид (енг. *p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside*)
q	садржај укупних екстрактивних материја у биљној сировини после екстракције за време t
q_0	количина укупних екстрактивних материја у полазном биљном материјалу
RE	еквивалент рутина (енг. *Rutin Equivalents*)
RP	редукциона способност (енг. *Reducing Power*)
TCA	трихлорсирћетна киселина (енг. *Trichloroacetic Acid*)
TEAC	антиоксидативни капацитет еквивалентан тролоксу (енг. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
TNF-*α*	фактор-алфа туморске некрозе (енг. *Tumor Necrosis Factor-Alpha*)
TPTZ	2,4,6-трис(2-пиридил)-s-триазин (енг. *2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine*)
TTC	2,3,5-трифенилтетразолијум- хлорид (енг. *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*)
TTC	трифенилтетразолијум-хлорид (енг. *Triphenyltetrazolium Chloride*)
UDPGT	уридин-5′-дифосфат-глукуронозилтрансфераза (енг. *Uridine 5′-diphospho-glucuronosyltransferase*)
UHPLC	течна хроматографија ултрависоких перформанси (енг. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*)
UV	ултраљубичасто зрачење (енг. *ultraviolet radiation*)
UV-Vis	ултраљубичаста/видљива спектроскопија (енг. *Ultra-violet visible/spectroscopy*)
WHO	Светска здравствена организација (енг. *World Health Organization*)
XRD	дифракција X-зрака (енг. *X-Ray diffraction analysis*)

скраћенице на ћирилици

ЕТП	екстракција течностима под притиском (енг. *Pressurized Liquid Extraction*)
ЕУ	етарско уље
МБК	минимална бактерицидна концентрација (енг. *Minimum Bactericidal Concentration*)
МЕ	микроталасна екстракција (енг. *Microwave-Assisted Extraction*)
МИК	минимална инхибиторна концентрација (енг. *Minimum Inhibitory Concentration*)
МФК	минимална фунгицидна концентрација (енг. *Minimum Fungicidal Concentration*)
МХБ	Милер-Хинтон бујон (енг. *Mueller–Hinton broth*)
ПБЕ	период брзе екстракције
ПБХ	период брзе хидродестилације
СДБ	Сабуро-декстрозни бујон (енг. *Sabouraud Dextrose broth*)
СЕ	степен екстракције
ЕСФ	екстракција суперкритичним флуидима (енг. *Supercritical Fluid Extraction*)
СХ	степен хидродестилације
УЕ	ултразвучна екстракција (енг. *Ultrasound-Assisted Extraction*)
УЕМ	укупне екстрактивне материје

САДРЖАЈ

1 УВОД 1
2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО 5
2.1 Биоактивни производи природног порекла 5
2.2 Црни бибер (*Piper nigrum* L.) 7
2.2.1 Ботаничке карактеритике 7
2.2.2 Хемијски састав 9
2.2.3 Биолошка својства и примена 18
2.3 Екстракција биоактивних производа из биљних сировина 20
2.3.1 Основне законитости 20
2.3.2 Утицај оперативних услова на процес екстракције из биљних сировина 21
2.3.3 Масени пренос у процесу екстракције 23
2.3.4 Конвенционалне и савремене технике изолације биоактивних једињења 25
2.4 Циклодекстрини 39
2.4.1 Циклодекстрини као носачи лекова 40
2.4.2 Особине и примена циклодекстрина 41
2.4.3 Константа стабилности и фазно-растворљивостне изотерме 43
2.4.4 Циклодекстрини у терапијским облицима са контролисаним ослобађањем 44
2.5 Методе карактеризације биоактивних изолата црног бибера 45
2.6 Методе одређивања биолошких активности изолата црног бибера 51
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО 56
3.1 Хемикалије и реагенси 56
3.2 Биљни материјал 57
3.2.1 Технолошке карактеристике биљне сировине 57
3.2.2 Одређивање садржаја укупних екстрактивних материја у полазном биљном материјалу 60
3.2.3 Одређивање садржаја етарског уља по Clevenger-у 60
3.2.4 HS-SPME анализа испарљивих једињења у биљном материјалу 61
3.3 Методе изолације и карактеризације етанолних екстраката 62
3.3.1 Технике екстракције 62
3.3.2 Моделовање кинетике екстракције 65
3.3.3 Хемијски састав изолованих екстраката 65
3.3.4 Биолошке активности екстраката 70
3.3.5 Одређивање садржаја микро- и макроелемената у етанолним екстрактима плода црног бибера ICP-OES методом 79
3.4 Изолација и карактеризација олеорезина из плода црног бибера 82
3.4.1 Изолација олеорезина 82
3.4.2 Хемијски састав изолованог олеорезина 82
3.4.3 Биолошке активности изолованог олеорезина 82
3.5 Изолација и карактеризација масног уља 84
3.5.1 Одређивање киселинског броја масног уља 84
3.5.2 Одређивање садржаја воска у масном уљу 85
3.5.3 Добијање метил-естара масних киселина 85
3.5.4 FT-IR анализа масног уља 86
3.5.5 HPLC анализа масног уља и метил естара 86
3.5.6 UHPLC-DAD- MS/MS анализа метил естара 87
3.5.6 Биолошке активности изолованог масног уља 87
3.6 Методе изолације и карактеризације етарских уља и хидролата 87
3.6.1 Хидродестилација 87
3.6.2 Технике хидродестилације 88
3.6.3 HS-SPME анализа испарљивих једињења у хидролатима 90

3.6.4 UHPLC-DAD-MS/ MS анализа хидролата црног бибера 90
3.6.5 GC/MS и GC/FID анализа етарских уља црног бибера 91
3.6.6 Биолошке активности изолованих етарских уља и хидролата 92
3.7 Изолација и карактеризација пиперина 94
3.7.1 UV-Vis анализа пиперина 96
3.7.2 FT-IR анализа пиперина 96
3.7.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа пиперина 96
3.8 Припрема инклузионих комплекса и физичких смеша са пиперином 96
3.8.1 FT-IR анализа 97
3.8.2 Диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC) 97
3.8.3 Дифракција X-зрака (XRD) 97
3.8.4 Анализа фазне растворљивости пиперина 98
3.8.5 Протонска нуклеарна магнетна резонантна спектроскопија (^{1}H-NMR) 99
3.8.6 Биолошке активности пиперина и инклузионих комплекса са циклодекстринима 99
3.9 UV озрачивање пиперина и инклузионих комплекса пиперина 101
4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА 102
4.1 Технолошке карактеристике биљне сировине 102
4.1.1 Садржај укупних екстрактивних материја 104
4.1.2 Садржај етарског уља 105
4.1.3 HS-SPME анализа испарљивих једињења у биљном материјалу 105
4.2 Методе изолације и карактеризације етанолних екстраката 108
4.2.1 Екстракција мацерацијом 108
4.2.2 Екстракција уз рефлукс 109
4.2.3. Кинетика екстракције УЕМ мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс, Soxhlet и ултразвучном екстракцијом 111
4.2.3 Хемијски састав изолованих екстраката 118
4.2.4 Биолошке активности етанолних екстраката плода црног бибера 131
4.2.5 Минерални састав етанолних екстракта плода црног бибера 155
4.3 Изолација и карактеризација олеорезина из плода бибера 161
4.3.1 Хемијски састав изолованог олеорезина 163
4.3.2 Биолошке активности изолованог олеорезина 167
4.4 Изолација и карактеризација масног уља из плода црног бибера 175
4.4.1 FT-IR анализа масног уља 176
4.4.2 HPLC анализа масног уља 177
4.4.4 Биолошке активности „масног уља“ (изолованог *n*-хексанског изолата) плода црног бибера 183
4.5 Хидродестилација 185
4.5.1 Техника хидродестилације I 185
4.5.1.4 Одвајање фракција етарског уља за одређена времена хидродестилације 193
4.5.2 Техника хидродестилације II 226
4.6 Изолација и карактеризација пиперина из плода црног бибера 259
4.6.1 Изолација пиперина 259
4.6.2 Припрема инклузионих комплекса и физичких смеша са пиперином 265
4.6.3 Биолошке активности пиперина и инклузионих комплекса 283
4.6.4 Зрачење пиперина и инкузионих комплекса – анализа фотостабилности награђених комплекса 293
5 ЗАКЉУЧАК 299
6 ЛИТЕРАТУРА 308
БИОГРАФИЈА 336
БИБЛИОГРАФИЈА 338

1 УВОД

Природни производи биљног порекла представљају значајан извор биолошки активних једињења са применом у фармацеутској индустрији, индустрији дијететских суплемената и функционалне хране. Савремени приступи њиховој изолацији и карактеризацији заснивају се на избору одговарајуће екстракционе/дестилационе технике и оптимизацији процесних параметара, јер они директно одређују хемијски састав, биолошка својства и квалитет добијених изолата (Newman and Cragg, 2016; Azmir et al., 2013) .

Најпознатија и привредно најзначајнија врста фамилије Piperaceae је црни бибер (*Piper nigrum* L.), познат као „краљ зачина“, са дугом историјом употребе и изузетним економским значајем. Подаци из историјских и религијских извора указују да је бибер био познат и коришћен још у старим цивилизацијама: у старом Египту примењиван је у поступцима мумификације, док се његово постојање и вредност помињу у древним списима као што су Библија, Куран и Веде. Трговина црним бибером била је развијена још у трећем миленијуму пре нове ере, посебно између подручја Месопотамије и Индијског потконтинента, а његова употреба забележена је и у раним индијским текстовима о медицини и лечењу. Овај континуитет употребе кроз различите културе и епохе указује на изузетан значај црног бибера, који се задржао до данас, када ова биљка представља једну од најважнијих сировина у глобалној прехрамбеној, фармацеутској и индустрији суплемената (Milenković and Stanojević, 2021).

Са аспекта хемијског састава, црни бибер обухвата широк спектар биоактивних једињења, са доминантним алкалоидом пиперином, али и присуством других сличних алкалоида, етарског и масног уља, као и макро- и микронутријената, што условљава бројне биолошке активности и сврстава га међу највише проучаване зачинске биљке на глобалном нивоу. Обимност и континуитет научних истраживања потврђује изузетно богата литература, при чему претрага појма *black pepper* у релевантним научним базама података као што су ScienceDirect и PubMed даје десетине хиљада публикација, док академски претраживачи попут Google Scholar и KoBSON бележе стотине хиљада до више милиона резултата (приступ: јануар 2026).

Иако је хемијски састав и биолошка активност црног бибера предмет бројних истраживања, у доступној литератури уочавају се јасне празнине које се односе на технолошки контекст добијања изолата и на мање проучене фракције. Већина радова усмерена је на етанолне екстракте, етарска уља и пиперин, док су водене фазе

дестилације, посебно хидролати (водене фазе суспензије), често третиране као споредни или „отпадни“ производи процеса, без систематске хемијске и биолошке карактеризације. За разлику од етарског уља и пиперина, који су у литератури опсежно истражени, липидна фракција плода црног бибера представља значајно мање проучен сегмент. Доступни подаци указују да је број студија које недвосмислено потврђују постојање, изолацију и карактеризацију масног уља из плода црног бибера изузетно ограничен. Ова чињеница додатно оправдава потребу за систематском анализом масног уља, његовог хемијског састава и потенцијалних биолошких активности у оквиру интегрисаног експерименталног приступа. Такође, мало је студија које упоредо анализирају различите технике екстракције и изолације под контролисаним условима, што отежава директно поређење добијених изолата и тумачење разлика у саставу и активности као последице избора технике и параметара процеса. Посебно је недовољно заступљено фракционисање етарског уља црног бибера и анализа појединачних временских фракција, иако такав приступ омогућава прецизније праћење промене састава током хидродестилације, као и могућност одабира етарског уља са жељеним саставом. Математичко моделовање кинетике екстракције и хидродестилације ретко се примењује у истраживањима црног бибера, иако је кључно за опис механизама издвајања и рационалну оптимизацију процесних услова.

Коначно, у литератури није уједначено заступљено ни систематско разматрање минералног састава и присуства потенцијално токсичних елемената у екстрактима/сировини, иако је овај аспект посебно значајан у контексту увоза биљног материјала и потребе за контролом безбедносних параметара. Недостатак студија које повезују избор технике, кинетику процеса и свеобухватну хемијску карактеризацију са проценом више типова биолошких активности представља један од кључних недостатака постојеће научне литературе о црном биберу.

Полазећи од наведеног, општи циљ ове дисертације је био да се из плода црног бибера добију различити типови изолата применом екстракције/хидродестилације, да се њихов хемијски састав, структурне и физичко-хемијске карактеристике поуздано окарактеришу применом одговарајућих метода, као и да се њихове биолошке активности сагледају у односу на врсту изолата и примењену технику добијања. У складу са постављеним општим циљем, у раду су дефинисани следећи посебни циљеви:

- Одређивање технолошких карактеристика биљне сировине (плода црног бибера), које су од значаја за процес екстракције;

- Одређивање оптималних услова и технике екстракције којом се остварују максимални приноси укупних екстрактивних материја (УЕМ) из плода црног бибера (мацерација на собној температури (25 °C), екстракција уз рефлукс на 40 °C, 50 °C и температури кључања, Soxhlet екстракција, ултразвучна екстракција, све коришћењем 70% v/v етанола као екстрагенса);
- Карактеризација изолованих екстраката применом спектрофотометријских метода за одређивање садржаја укупних фенола (Folin–Ciocalteu метода) и флавоноида ($AlCl_3$ метода) и UHPLC-DAD-MS/MS методе за идентификацију фенолних једињења и пиперамидних једињења, као и одређивање концентрације пиперина у екстрактима;
- Изолација и карактеризација олеорезина UHPLC-DAD- MS/MS методом;
- Изолација масног уља и добијање метил естара масних киселина (МЕМК) и карактеризација добијених изолата применом физичко-хемијских метода, FT-IR, HPLC и UHPLC-DAD- MS/MS метода;
- Одређивање садржаја минералних материја у екстрактима ICP-OES методом;
- Одређивање оптималних услова и техника хидродестилације којим се остварују максимални приноси етарског уља из плода црног бибера (техника I – Clevenger хидродестилација етарског уља са кохобацијом воденог дела дестилата и техника II - Clevenger хидродестилација етарског уља са коришћењем водене фазе суспензије из претходних хидродестилација за потапање биљног материјала у наредним хидродестилацијама);
- Одвајање хидролата (водене фазе суспензије из балона за дестилацију) након процеса хидродестилације;
- Фракционисање етарског уља изолованог техником I за одређене временске интервале I (0-15 min), II (15-30 min), III (30-60 min), IV (60-90 min) и V (90-120 min);
- Карактеризација изолованих етарских уља методама гасне хроматографије са масеном спектрометријом (GC/MS) и гасне хроматографије са пламено-јонизујућом детекцијом (GC/FID) и карактеризација хидролата методом микроекстракције на чврстој фази (HS-SPME);
- Изолација и карактеризација пиперина применом UV-Vis, FT-IR и UHPLC-DAD-MS/MS метода;

- Припрема инклузионих комплекса пиперина са циклодекстринима (*β*-CD и HP-*β*-CD) методом гњечења у молском односу 1:1 и структурна карактеризација насталих комплекса применом UV-Vis, FT-IR, DSC, XRD, ^{1}H-NMR метода;
- Анализирање стабилности насталих инклузионих комплекса према дејству UV-B зрачења;
- Анализа и процена биолошких активности (антиоксидативна – DPPH, ABTS, FIC, FRAP, RP метода; антимикробна – микродилуциона метода; антихипергликемијска – инхибиција *α*-глукозидазе; антиинфламаторна – BSA метода) екстраката, олеорезина, масног уља, етарских уља, хидролата, пиперина и инклузионих комплекса са пиперином уз примену дефинисаних ограничења у складу са природом узорака и методологијом.

Остварење наведених циљева захтевало је да се експериментални приступ ослони на јасно дефинисан теоријски оквир који обухвата: (I) хемијску комплексност плода црног бибера и типове изолата који се из њега могу издвојити, (II) принципе и селективност процеса екстракције и хидродестилације, укључујући кинетику и моделовање процеса, као и (III) аналитичко-инструменталне приступе који омогућавају поуздану карактеризацију добијених изолата и њихово довођење у везу са биолошким ефектима.

С тим у вези, теоријски део дисертације организован је тако да најпре прикаже природне производе као извор биоактивних супстанци, затим да систематизује хемијски састав и биолошки потенцијал плода црног бибера са посебним освртом на изолате које су предмет овог рада (екстракти, олеорезин, масно уље/воскови, етарско уље, хидролати и пиперин). Потом се разматрају теоријске основе екстракције, кинетика и моделовање, технике изолације и фракционисања, улога циклодекстрина у превазилажењу тј. побољшању физичко-хемијских карактеристика пиперина, као и принципи примењених аналитичких и биолошких метода. Овако постављен теоријски оквир обезбеђује доследно тумачење добијених резултата и њихово позиционирање у односу на постојећу литературу.

2 ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1 Биоактивни производи природног порекла

Природни производи представљају један од најзначајнијих извора биолошки активних супстанци које налазе широку примену у индустријама попут фармацеутске, прехрамбене, козметичке, индустрије суплемената итд. Њихова вредност заснива се на структурној разноврсности и биолошкој активности, што их чини незаменљивим у развоју нових лекова и функционалних производа. Природни производи се могу дефинисати као изолати добијени физичким или комбинованим физичко–хемијским, биохемијским и микробиолошким методама из обновљивих сировина биљног, животињског или микробиолошког порекла, који се јављају у облику природних концентрата (етарска уља, олеорезини, екстракти, дестилати, сублимати) или као чисте супстанце и смеше биомолекула, способне да након уношења у организам испоље различите биолошке ефекте усмерене на одржавање виталних функција, јачање одбрамбених механизама и унапређење здравља и квалитета здравља човека (Stanojević and Stanković, 2014).

Међу природним производима највећи научни и примењени значај имају производи биљног порекла, јер биљке представљају изузетно богат извор секундарних метаболита, органских једињења која не учествују директно у основном метаболизму, али имају кључну улогу у адаптацији и заштити биљке. Ова једињења поседују фармаколошку активност и чине основу деловања бројних лековитих и ароматичних врста (Naji et al., 2024).

Иако су биљке примарни извор биоактивних супстанци, значајну групу природних производа чине и они животињског порекла. У ову категорију убрајају се воскови, масти, ензими, пептиди, хормони, жучне киселине, хитин и колаген, као и специфични липиди и протеини из млека, јаја, рибе и морских организама. Овде се посебно истичу биоактивни пептиди и омега–3 масне киселине, познате по свом повољном дејству на кардиоваскуларни систем и метаболизам липида (Chaudhary and Garg, 2023). Поред биљака и животиња, важан извор биоактивних метаболита представљају и микроорганизми, нарочито ендофити, симбиотски организми који живе у унутрашњим ткивима биљака и синтетишу хемијски сличне, често још активније метаболите од самих биљака-домаћина. Истраживања показују да ендофитске гљиве и

бактерије могу производити вредна једињења попут паклитаксела, камптотецина и подофилотоксина, што их чини потенцијално одрживим извором фармаколошки значајних супстанци (Nasiruddin et al., 2020).

Биолошки значај ових супстанци произилази из њихове способности да делују као антиоксиданси, антимикробни и антиинфламаторни агенси, као и регулатори ензимских и ћелијских процеса. Њихово деловање често је резултат синергизма више компонената, што је карактеристично за природне супстанце. Данас је познат значајан број савремених лекова чије порекло потиче директно или индиректно од природних производа, што потврђује њихов кључни значај у развоју модерне фармакотерапије (Newman and Cragg, 2020; Wawrosch and Zotchev, 2021). Осим у медицини, природни производи имају значајну улогу и у прехрамбеној индустрији (као природни антиоксиданси и ароме), козметици (антиинфламаторни и *anti-aging* агенси), као и у пољопривреди (биоинсектициди, регулатори раста и природни конзерванси). Њихова биолошка разноврсност и еколошка прихватљивост чине их погодним заменама за синтетичке адитиве и конзервансе (Elshafie et al., 2023).

Савремени приступ истраживању биоактивних природних производа заснива се на интеграцији аналитичких, технолошких и биотехнолошких метода. Напредне екстракционе технике попут ултразвучне и микроталасне екстракције, суперкритичне CO_2 екстракције и екстракције под притиском растварача, омогућавају већу селективност и ефикасност уз очување осетљивих компонената (Khade et al., 2023). Истовремено, развој високорезолуционих инструменталних метода као што су UHPLC–MS, GC–MS, NMR и FT-IR омогућио је детаљну карактеризацију сложених биљних матрица и квантификацију појединачних једињења. У новије време све већи значај добијају биотехнолошки приступи производње секундарних метаболита у *in vitro* условима, попут култура ћелија, калус ткива и трансгених биљака, који омогућавају контролисану и одрживу производњу биоактивних супстанци без прекомерног коришћења природних ресурса (Revutska et al., 2021). Овакви приступи представљају основу интегрисане фитохемијске анализе, која повезује избор технике изолације, хемијски профил и биолошку активност природних изолата.

2.2 Црни бибер (*Piper nigrum* L.)

Фамилија Piperaceae представља велику фамилију цветница (Magnoliophyta), која потиче углавном из тропских области и обухвата велики број врста (око 2.000), које су груписане у четрнаест родова. Од укупног броја врста, два рода, *Piper* и *Peperomia* чине око 90% припадника ове фамилије. Представници фамилије Piperaceae могу бити у облику малих стабала или жбуња, а распрострањене су у влажним подручјима широм света, као што су џунгле и кишне шуме. Поједине врсте рода *Piper*, које се користе као зачини и у традиционалној медицини, имају велики економски значај за регионе као што су Индија, Југоисточна Азија и Африка (Milenković and Stanojević, 2021).

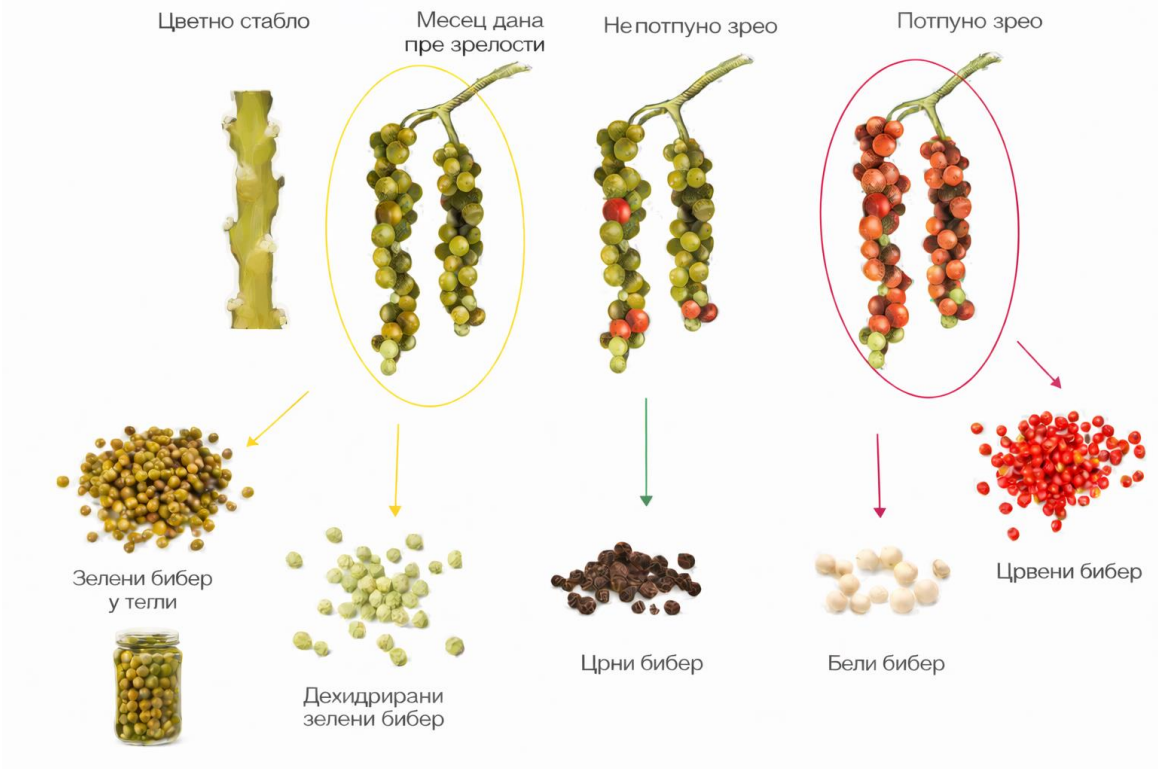
Хемијски састав рода *Piper* предмет је бројних истраживања, а фитохемијске студије спроведене широм света довеле су до изолације великог броја физиолошки активних једињења, као што су алкалоиди, амиди, пропенил-феноли, лигнани, неолигнани, терпени, стероиди, халкони, дихидрохалкони и флавони. Представници рода *Piper* широко су заступљени у традиционалној медицини, а обећавајући резултати досадашњих истраживања указују на потребу за њиховом додатном потврдом кроз будућа научна истраживања и клиничка испитивања (Pelayo et al., 2016).

2.2.1 Ботаничке карактеритике

Црни бибер је тропска лоза (Слика 2.1), која може достићи висину од 4 m до 9 m, уз потпору других стабала. Биљка има плитак коренов систем. Листови су наизменични, једноставни, цели, јајоликог облика, дужине 10–15 cm и ширине 5–9 cm, дебели, мање или више кожасти и глатке површине (Lim et al., 2012). Плод је коштуница пречника до 8 mm (Nelson и Cannon-Eger, 2011). Цветови су хермафродитни, беле боје, а обично је 20–30 цветова груписано у цвасти (Lim et al., 2012). Дрогу представља осушен незрео плод гајених биљака бибера, а бере се када је боја плода зеленкасто-жута до почетно црвенкаста, односно пре потпуног сазревања (Слика 2.2).



Слика 2.1 Црни бибер (*Piper nigrum* L.) (Lim et al., 2012)



Слика 2.2 Различити степени зрелости плода црног бибера

Од изузетне је важности прецизно одредити степен зрелости плода биљке пре бербе, како би се добио финални производ високог квалитета (Слика 2.2). Конзервисани зелени бибер представља крајњи производ који се добија стављањем плодова бибера у раствор лимунске киселине око месец дана пре пуне зрелости. Дехидрирани зелени плодови бибера добијају се од незрелих плодова, који се бланширају у кључалој води све док се не инактивирају ензими одговорни за потамњивање бибера и док се полифенолна једињења не исперу из плодова. Након тога, плодови се хладе и третирају калијум-метабисулфитом ради очувања зелене боје, затим се поново испирају и суше на температури која не прелази 50 °C (Dhas and Korikanthimath, 2003). Црни бибер се производи од зрна бибера од зелекасто-жуте до црвене боје. Након жетве, бобице се потапају у врелу воду у трајању од око 10 минута, чиме се обезбеђује површинска дезинфекција и започиње процес ферментације који доводи до настанка црне боје плода. После термичког третмана, плодови се суше на сунцу. За сушење на сунцу потребно је око 14 дана, како би се постигао садржај влаге од приближно 12%. Од око 100 kg зеленог бибера може се добити приближно 35 kg црног бибера (Nelson and Cannon-Eger, 2011). Црвени бибер добија се од потпуно зрелих плодова који се конзервирају у саламури или сирћету. Црвени бибер се такође може дехидрирати, при чему се његова боја може очувати применом истог поступка који је претходно описан за прераду зеленог бибера. Потпуно зрела зрна бибера користе се за производњу белог бибера, при чему се уклања спољашњи омотач плода (егзокарп и мезокарп) (Dhas and Korikanthimath, 2003).

Црни бибер успева у топлим областима са годишњим падавинама од 1750 mm до 2500 mm (≈ 1750–2500 L/m^2 годишње) и температурама око 25–30 °C, уз релативну влажност ваздуха изнад 85%. Расте и при директном излагању сунчевој светлости, али и у условима делимичне сенке, на добро компостираним, влажним, добро дренираним и плодним земљиштима богатим органским материјама. Биљка је осетљива на сушу и мраз (Lim et al., 2012).

2.2.2 Хемијски састав

Хемијски састав биљака фамилије Piperaceae одликује се изузетном разноврсношћу и обухвата бројне примарне и секундарне метаболите, чија је дистрибуција условљена биљним органом, степеном зрелости, условима гајења и начином прераде. Плод црног бибера садржи комплексну мешавину испарљивих и

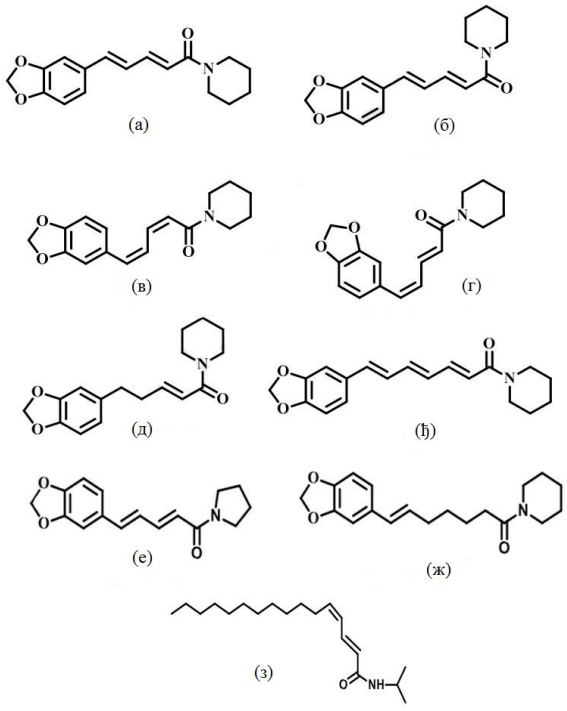
неиспарљивих једињења, међу којима доминирају алкалоиди и амиди (пиперин и сродна једињења), етарско уље, олеорезин, масно уље, угљени хидрати (пре свега скроб), протеини, влакна, као и минералне материје и витамини (Ravindran et al., 2000; Milenković and Stanojević, 2021; Ashokkumar et al., 2021). Квалитет бибера углавном је одређен садржајем пиперина, етарског уља или олеорезина. Арома бибера потиче од етарског уља присутног у плоду, док је за пикантност од пресудног значаја присуство алкалоида, пре свега пиперина. На тржишту се такође могу наћи екстракти бибера у облику олеорезина, који садрже и фенолна једињења. Скроб може допринети кулинарском и нутритивном квалитету црног бибера (Ravindrn, 2000; Zhu et al., 2017). Главне компоненте плода црног бибера и њихов садржај дате су у Табели 2.1.

Табела 2.1 Хемијски састав плода црног бибера

Компонента	**Проценат, %**	**Референца**
Пиперин	2-9	Gorgani et al., 2017
	3,90	Subramanian et al., 2016
	2,6	Kapoor et al., 2009
Олеорезин	4,4-12	Peter, 2006
	3,8	Kapoor et al., 2009
	2,33-5,67	Dang and Phan, 2014
Етарско уље	0,4-7	Peter, 2006
	2,6	Kapoor et al., 2009
	2,81	Chandran et al., 2017
	0,9-1,8	Chandran et al., 2012
Скроб	50	Zhu et al., 2017
	35-50	Ravindran et al., 2000
	30,4	Dutta and Bhattacharjee, 2015
Масно уље (масне киселине)	1,9-9	Peter, 2006
	5,34	Al-Jasass and Al-Jasser, 2012
	14,41	Morshed et al., 2017
	12,02	Hossain et al., 2014

2.2.2.1 Пиперин

Пиперин [IUPAC - (2*E*,4*E*)-5-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-(пиперидин-1-ил)пента-2,4-диен-1-он)] је алкалоид пиперидинског низа (Слика 2.3), а његов садржај у плоду бибера најчешће се креће од 2% до 9%, а зависи од порекла узорка и примењенех метода изолације (Gorgani et al., 2017; Subramanian et al., 2016; Kapoor et al., 2009). Растворљивост пиперина у води износи око 40 mg/dm^3, док је његова растворљивост у органским растварачима знатно већа (у етанолу 1 g/15 cm^3, у етру 1 g/36 cm^3, у хлороформу 1 g/1,7 cm^3). Пиперин је слабо базна супстанца и у зависности од тога да ли се подвргава киселој или базној хидролизи, може се конвертовати у пиперинску киселину или пиперидин (Tiwari et al., 2020). Црни бибер садржи пиперин у следећим изомерним облицима: *cis–trans* изомер (изопиперин), *cis–cis* изомер (кавицин) и *trans–cis* изомер (изокавицин). Геометријски изомери пиперина не показују љутину у поређењу са пиперином (Ravindran, 2003). Поред пиперина у плоду су присутни алкалоиди као што су пиперанин, пиперетин, пиперилин, пиперолеин B и пиперицин, а њихове структурне формуле су дате на Слици 2.3 (Hirasa and Takemasa, 1998).



Слика 2.3 Структурне формуле пиперина и сродних пипераминских алкалоида присутних у плоду црног бибера: а) пиперин; б) изопиперин; в) кавицин; г) изокавицин; д) пиперанин; ђ) пиперетин; е) пиперилин; ж) пиперолеин B; з) пиперицин (прилагођено према Ravindran et al., 2000)

2.2.2.2 Олеорезин

Олеорезин црног бибера представља концентровани екстракт добијен екстракцијом из плода црног бибера испарљивим органским растварачима, као што су етанол, ацетон, етар, дихлоретан и други, након чега следи уклањање растварача под сниженим притиском да би се уклонили сви трагови растварача. Олеорезини зачина могу имати конзистенцију од вискозних уља до густих, лепљивих пасти. Састоје се од различитих компоненти, као што су етарска уља, масна уља, пигменти и љути састојци, укључујући алкалоиде. Олеорезини се одликују високом стабилношћу и могу се складиштити најмање једну годину без губитка квалитета, при чему није неопходно складиштење у контролисаним условима атмосфере (температура и влажност) (Nair, 2020). Олеорезин чини приближно 6–13% плода црног бибера (Ravindran et al., 2000). Органолептичка својства олеорезина црног бибера одређена су садржајем етарског уља и пиперина, чији удео зависи од врсте бибера, степена зрелости плода, коришћеног растварача и услова екстракције. Најчешће, олеорезин садржи 15–20% етарског уља и 35–55% пиперина (Nair, 2011).

2.2.2.3 Етарско уље

Етарска уља се добијају из биљака које их стварају у ткивима, а смештена су у секреционим структурама које се налазе унутар или на површини биљке (Svoboda et al., 2000; Jončić et al., 1995).

Продукција етарских уља одвија се нарочито у листовима и цветовима биљке, међутим могу се наћи и у корену и ризому, кори, дрвету, плодовима и семену. Састав етарског уља је варијабилан у једној истој биљци, као што може да варира и између различитих примерака исте врсте (Kalemba and Kunicka, 2003). Ово зависи од услова средине у којој биљка расте, пре свега климе, али и од чињенице да већина биљака која се користи за производњу етарског уља, било култивисаних или сакупљених у природи, има бројне варијетете, подваријетете, сорте, клонове и хибриде, тако да хемијски састав уља може бити прилично неуједначен услед генетичког диверзитета биљака (Bajpai et al., 2008).

Прва објављена истраживања етарског уља црног бибера потичу од почетка XIX века (Guenther, 1952). Црни бибер садржи приближно 1–3% етарског уља, иако су у појединим студијама објављене и знатно више вредности, до 7% (Peter, 2000). Етарско

уље црног бибера је безбојна до жућкасто-зелена течност, зачинске ароме и карактеристичног мириса. Добија се дестилацијом осушених непотпуно зрелих плодова. Ово етарско уље има специфичну густину од 0,860 до 0,884 g/cm^3 и индекс рефракције од 1,478 до 1,488 на 20 °C, док се вредности оптичке ротације крећу између –1° и –23° (ISO, 2008; Morshed et al., 2017).

Најзаступљенија једињења у етарском уљу црног бибера су најчешће монотерпенски угљоводоници, затим сесквитерпенски угљоводоници, као и мање количине оксигенованих моно- и сесквитерпена (Dosoky et al., 2019). Хемијски састав етарског уља црног бибера према доступној литератури приказан је у Табели 2.2.

Табела 2.2 Најзаступљеније компоненте етарског уља плода црног бибера

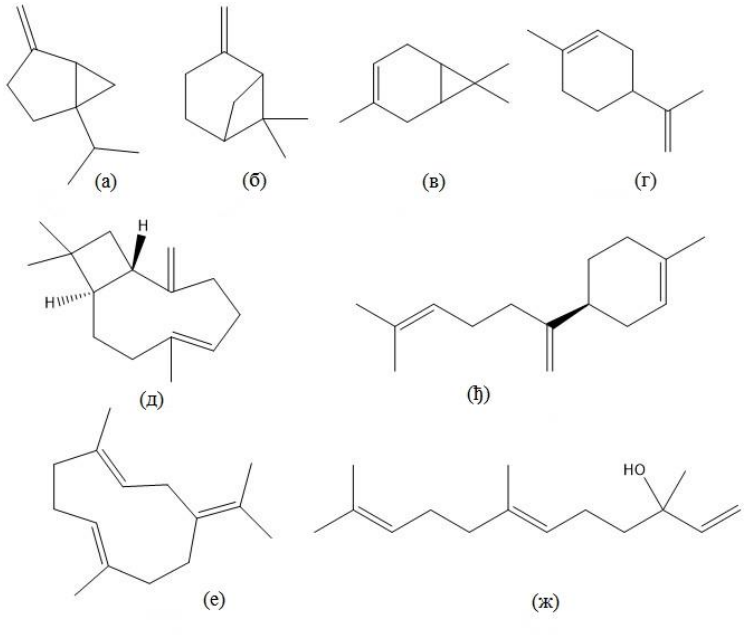
Компонента	Проценат, %	Литература
β-кариофилен	29,9	Kapoor et al., 2009
лимонен	13,2	
β-пинен	7,9	
сабинен	5,9	
α-пинен	4,5	
кариофилен-оксид	3,9	
терпинен-4-ол	0,7	
β-кариофилен	19,12	Morshed et al., 2017
лимонен	9,74	
(+)-камфен	8,44	
β-пинен	8,00	
3-карен	7,08	
α-пинен	6,32	
3-карен	29,21	Tran et al., 2019
D-лимонен	20,94	
β-кариофилен	15,05	
β-пинен	9,77	
α-пинен	4,69	
кариофилен-оксид	0,89	
линалол	0,42	

Наставак Табеле 2.2

δ-3-карен	18,5	
лимонен	14,7	
β-кариофилен	12,8	
сабинен	11,2	
β-пинен	6,7	Tchoumbougnang et al., 2009
α-пинен	5,6	
β-селинен	2,2	
терпинен-4-ол	2,0	
Т-кадинол	0,8	
линалол	0,7	
β-кариофилен	23,98	
лимонен	14,36	
α-терпинен	13,26	
γ-терпинен	13,26	Jeena et al., 2014
кариофилен-оксид	8,68	
нафтален	4,19	
копаен	3,73	
елемен	3,52	
β-кариофилен	26,2	
оцимен	5,8	
α-пинен	5,5	Vinturelle et al., 2017
кариофилен-оксид	4,2	
α-копаен	4,2	
β-пинен	4,1	
лимонен	2,1	

Главне компоненте идентификоване GC/MS анализом различитих узорака етарских уља добијених из плода црног бибера су сесквитерпен, *β*-кариофилен, и монотерпени, лимонен, *β*-пинен, *α*-пинен, сабинен, 3-карен, као и камфен (монотерпени) (Kapoor et al., 2009; Morshed et al., 2017; Tran et al., 2019; Tchoumbougnang et al., 2009; Jeena et al., 2014; Vinturelle et al., 2017; Milenković et al., 2022). Главни оксигеновани терпени присутни у етарском уљу црног бибера су кариофилен-оксид, линалол, терпинен-4-ол, (*E*)-неролидол и еугенол, као представник

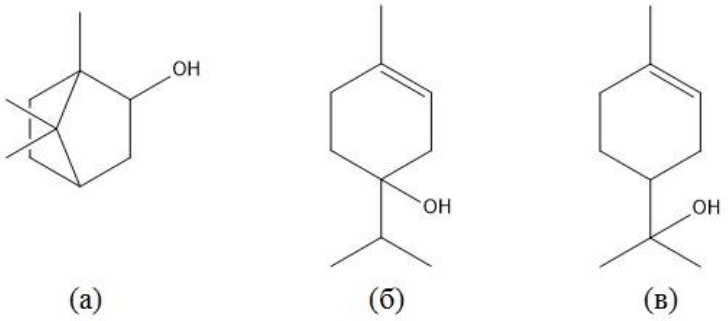
фенилпропаноида (Orav et al., 2004; Milenković et al., 2022). Хемијске структуре најзаступљенијих компонената етарског уља црног бибера приказане су на Слици 2.4. Садржај појединих компонената значајно варира у зависности од порекла и сорте сировине, степена зрелости плода, као и трајања и услова складиштења (Orav et al., 2004).



Слика 2.4 Структурне формуле најзаступљенијих компоненти у етарском уљу плода црног бибера: (а) сабинен; (б) *β*-пинен; (в) *δ*-3-карен; (г) лимонен; (д) (*E*)-кариофилен; (ђ) *β*-бисаболен; (е) гермакрен B; (ж) (*E*)-неролидол (прилагођено према Milenković et al., 2022)

Хидролати представљају водене дестилате који настају као споредни производ током процеса хидродестилације или парне дестилације етарских уља. Они су колоидне суспензије које садрже растворљиве и делимично растворљиве компоненте етарских уља, као и друге хидрофилне супстанце екстраховане из биљног материјала. За разлику од етарских уља, хидролати су богати пре свега поларним и оксигенованим једињењима, као што су алкохоли, феноли, алдехиди и киселине, док је садржај неполарних терпенских угљоводоника значајно мањи. Хемијски састав хидролата у великој мери зависи од састава етарског уља, при чему је сличност између ова два изолата израженија код биљака чија етарска уља садрже већи удео оксигенисаних компоненти. Иако су хидролати дуго сматрани споредним или мање вредним производима дестилације, савремена истраживања указују на њихов потенцијал као извора биоактивних једињења са могућом применом у фармацеутској, козметичкој и

прехрамбеној индустрији. Структуре главних једињења у хидролату црног бибера приказане су на Слици 2.5. (Milenković et al., 2022).



Слика 2.5 Структурне формуле најзаступљенијих компоненти у хидролату плода црног бибера: (а) борнеол; (б) терпинен-4-ол; (в) *α*-терпинеол (прилагођено према Milenković et al., 2022)

2.2.2.4 Масно уље

Поред испарљивих компоненти етарског уља, плод црног бибера садржи и неиспарљиву липидну фракцију, која обухвата масна уља и воскове. Масно уље се састоји углавном од триглицерида (Al-Jasass and Al-Jasser, 2012; Morshed et al., 2017). Црни бибер садржи липиде од 1,9% до 9,0%, а у појединим случајевима и до 15%. Најзаступљеније масне киселине су палмитинска (16–30%), олеинска (18–29%), линолна (25–35%) и линоленска киселина (8–19%) (Ravindran et al., 2000).

2.2.2.5 Остала једињења

Поред алкалоида, етарског уља, масног уља и олеорезина, плод црног бибера садржи и низ других хемијских компоненти које, иако нису примарни носиоци љутине и ароме, значајно доприносе нутритивним, технолошким и биолошким својствима ове биљне сировине. Ова једињења обухватају фенолна једињења, угљене хидрате, протеине, витамине и минералне материје (Milenković and Stanojević, 2021).

Фенолна једињења представљају једну од најважнијих и најразноврснијих група активних једињења у биљкама, која у свом саставу садрже најмање један ароматични прстен и једну или више хидроксилних група. Она се могу поделити у две категорије. Прву категорију чине растворљива једињења, као што су флавоноиди, хинони и фенилпропаноиди, која се могу наћи у вакуолама биљних ћелија. Другу категорију

чине нерастворљива једињења, као што су лигнини, кондензовани танини и хидроксициметне киселине, која су везана за ћелијску мембрану. Све ове групе учествују у бројним физиолошким и биохемијским процесима у биљкама (Dai and Mumper, 2010).

Иако фенолна једињења поседују различите хемијске структуре, она имају заједничке физичке и хемијске карактеристике које су од великог значаја и утичу на избор и ток екстракционих процеса. Стога је познавање различитих метода екстракције, идентификације и квантификације фенолних једињења од суштинског значаја и велике практичне користи (Mimica-Đukić, 1992; Naczk, 2004; Zhang and Demain, 2005; Lattanzio, 2013).

Феноли у црном биберу представљају мешавину гликозида фенолних киселина и флаванолних гликозида. Међу најзаступљенијим фенолним једињењима налазе се фенолне киселине које обухватају деривате хидроксибензоеве и хидроксициметне киселине, као и значајне количине кверцетина и кемпферола. Од флавона који су идентификовани у црном биберу издвајају се изокверцетин, изорамнетин, 3-*O*-*β*-D-рутинозид, кемпферол-3-*O*-арабинозид-7-рамнозид, кемпферол-3-*O*-*β*-глукозид и кверцетин-3-*O*-*β*-D-рутинозид. Поред тога, у плоду црног бибера идентификован је и ситостерол (Ravindran et al., 2000). Иако у неким узорцима није утврђено присуство хидрокси-циметних киселина, флаванона, флавонола и изофлавоноида, идентификована су једињења попут 2-хидрокси-бензоеве киселине, апигенин-6,8-ди-*C*-глукозида, 6-хидрокси-лутеолин-7-*O*-рамнозида, роифолина, скополетина, хидрокси-тирозола, хидрокси-тирозол-4-*O*-глукозида и сезамина (Ali et al., 2021).

Скроб чини приближно 50% суве масе плода црног бибера. Скроб може да интерагује са пиперином или полифенолима, као и са другим компонентама хране, при чему може доћи до промене његових нутритивних својстава (Zhu et al., 2017). Ипак, у литератури је доступно релативно мало података о молекулској структури скроба из плода црног бибера. С друге стране, постоје истраживања која потврђују могућност контролисаног ослобађања пиперина из наночестица скроба, које могу представљати потенцијалне наноносаче за пиперин (Chong et al., 2020). Поред скроба, присутне су и мање количине редукујућих шећера, као што су глукоза и фруктоза, као и дијетална влакна, која доприносе структури плода и његовим технолошким својствима (Ravindran et al., 2000).

Протеини црног бибера нису детаљно анализирани, будући да се бибер углавном користи као зачин за побољшање ароме хране, те као такав не доприноси значајно њеној нутритивној вредности (Milenković and Stanojević., 2021).

Плод црног бибера је извор ***витамина*** растворљивих у води, пре свега витамина C, као и витамина комплекса B (B_1, B_2 и B_3). Иако су ове компоненте присутне у мањим количинама у односу на главне биоактивне супстанце, оне доприносе укупној нутритивној вредности бибера (Ashokkumar et al., 2021).

Минерални састав обухвата значајне количине калијума, калцијума, магнезијума и фосфора, док су гвожђе, цинк и натријум присутни у мањим концентрацијама. Садржај минерала варира у зависности од географског порекла и услова гајења, што је посебно значајно у контексту контроле квалитета и безбедности биљне сировине (Revutska et al., 2021; Fatoki et al., 2000).

2.2.3 Биолошка својства и примена

Црни бибер је једна од биолошки најзначајнијих зачинских биљака. Биолошка активност плода црног бибера у великој мери приписује се присуству пиперина, као и других секундарних метаболита, укључујући фенолна једињења и терпене.

Бројна *in vitro* и *in vivo* истраживања показала су да црни бибер и његови изолати испољавају ***антиоксидативну активност***, што се повезује са способношћу неутралисања слободних радикала, инхибицијом липидне пероксидације и заштитом ћелијских структура од оксидативног стреса (Jeena et al., 2014; Gülçin, 2005). Ова активност има посебан значај у превенцији хроничних болести, али и у стабилизацији прехрамбених производа (Kapoor et al., 2009).

Антимикробна активност црног бибера потврђена је против широког спектра бактерија и гљива, укључујући *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella spp., Bacillus subtilis, Candida spp.* и *Aspergillus spp.* (Zarai et al., 2013; Khan et al., 2013; Gupta et al., 2014; Penecilla and Magno, 2011; Rani et al., 2013; Aneja et al., 2013; Hikal, 2018). Интензитет активности зависи од врсте екстракта и примењеног растварача. Пиперинска киселина показала је јаче антибактеријско дејство у односу на пиперин, док је етарско уље бибера посебно ефикасно захваљујући присуству терпенских једињења која нарушавају пропустљивост ћелијских мембрана микроорганизама (Zarai et al., 2013; Rani et al., 2013; Hikal, 2018).

Бројне студије указују на изражену ***антиканцерогену активност*** црног бибера и пиперина према различитим ћелијским линијама карцинома, укључујући колоректални карцином, карцином дојке, простате и плућа (Stojanović-Radić et al., 2019; Prashant et al., 2017; Wang et al., 2014b; Sriwiriyajan et al., 2014; Sriwiriyajan et al., 2017; Dudhatra et al., 2012; Rather and Bhagat, 2018). Пиперин инхибира пролиферацију ћелија, индукује апоптозу, утиче на ангиогенезу и регулацију ћелијског циклуса. Поред тога, терпени присутни у етарском уљу, као што су *β*-кариофилен, кариофилен-оксид и *α*-пинен, показују додатне антиканцерогене и имуностимулаторне ефекте (Fidyt et al., 2016; Jo et al., 2021a).

Антиинфламаторна активност црног бибера и пиперина потврђена је у бројним експерименталним моделима. Пиперин и екстракти плода инхибирају продукцију проинфламаторних цитокина, простагландина и матрикс-металопротеина, као и активацију NF-κB сигналног пута (енг. *Nuclear Factor kappa B*) (Tasleem et al., 2014; Ying et al., 2013; Bang et al., 2009; Gupta et al., 2015; Pei et al., 2020). Етарско уље црног бибера показало је упоредиву ефикасност са стандардним нестероидним антиинфламаторним лековима у моделима хроничне инфламације (Jeena et al., 2014).

Пиперин испољава ***аналгетичку и антипиретичку активност*** путем инхибиције циклооксигеназе и смањења синтезе простагландина. Ова активност повезана је како са периферним, тако и са централним механизмима деловања, што потврђује његов потенцијал као природног аналгетика (Parmar et al., 1997; Sabina et al., 2013; Panthong et al., 2007).

Метанолни екстракт плода црног бибера и пиперин показују ***хепатопротективно дејство*** у моделима оштећења јетре изазваног токсичним агенсима. Овај ефекат повезан је са смањењем липидне пероксидације, нормализацијом ензимских параметара јетре и смањеном осетљивошћу хепатоцита на инфламаторне факторе (Nirwane and Bapat, 2012; Hwang et al., 2011; Matsuda et al., 2008).

Једна од најзначајнијих особина пиперина јесте његова ***улога појачивача биорасположивости*** (природни биопојачивач). Пиперин може значајно повећати апсорпцију различитих нутријената и лекова, укључујући селен, витамине B-комплекса, *β*-каротен и поједине фармаколошки активне супстанце, путем инхибиције ензима укључених у метаболизам лекова и модулације пропустљивости биомембрана (Bhardwaj et al., 2002; Khajuria et al., 2002).

Пиперин делује тако што инхибира ензиме укључене у метаболизам лекова, попут цитохрома P450 – CYP450 (енг. *Cytochrome P450*), уридин-5′-дифосфат-глукуронозилтрансферазе – UDPGT (енг. *Uridine 5′-diphospho-glucuronosyltransferase*) и моноамин-оксидазе – MAOs (енг. *Monoamine oxidases*), као и повећањем пропустљивости цревне слузокоже, што доводи до значајног повећања биорасположивости бројних лекова и нутријената (Acharya et al., 2012; Tatitaju et al., 2013; Pattanaik et al., 2009; Rezaee et al., 2014; Pattanaik et al., 2006; Auti et al., 2018; Auti et al., 2019). Ово својство нашло је примену у комбинацији са антибиотицима, антиепилептицима, антиретровирусним лековима и антиинфламаторним средствима.

Пиперин показује инхибиторну активност према циклооксигеназама – COXs (енг. *Cyclooxygenases*), липоксигеназама – LOX (енг. *Lipoxygenases*), MAOs и ензимима CYPP450, што додатно објашњава његова противупална, неуропротективна и фармаколошка својства. (Liu et al., 2010; Tomy et al., 2015; Dhiman et al., 2020; Volak et al., 2007). Савремене *in silico* студије указују и на потенцијал пиперина као инхибитора вирусних протеаза, укључујући SARS-CoV-2 3CL протеазу, што отвара могућности за даља истраживања у антивирусној терапији (Gonzalez-Paz et al., 2020).

2.3 Екстракција биоактивних производа из биљних сировина

2.3.1 Основне законитости

Највећи број технолошких поступака добијања биоактивних производа из лековитих, ароматичних, зачинских дивљерастућих и култивисаних биљних сировина, који имају широку примену у фармацеутској (фитофармација), козметичкој (фитокозметика) и прехрамбеној (нутријенти за повећање биолошке вредности и ароматизацију прехрамбених производа) индустрији, као и другим гранама хемијске индустрије (фитохемикалије), укључује, као прву фазу, њихову екстракцију из биљних сировина течним растварачима (Stanković and Stanojević, 2014).

Екстракција биоактивних супстанци из биљних сировина заснива се на процесу преноса масе у систему чврсто тело–течност. Процес преноса масе у основи произилази из процеса дифузије. Покретачка сила процеса дифузије је разлика концентрација растворених материја у фазама које су у контакту. Уколико је ова разлика већа, већа количина материје ће дифундовати за исто време, при једнаким

осталим условима. Повећање разлике концентрација, као и повећање температуре, позитивно утичу на брзину дифузије (Tolić, 1996; Tiwari, 2020; Do et al., 2014). Биљни материјал представља хетерогени систем у коме су биоактивне супстанце локализоване унутар ћелија, везане за ћелијске зидове или депоноване у специјализованим секреторним структурама. Ток и ефикасност процеса екстракције обухвата неколико истовремених феномена: продор растварача у биљни матрикс, растварање екстрактивних материја, дифузију растворених супстанци кроз ћелијске зидове и њихов транспорт у екстракциону средину (Stanković and Stanojević, 2014).

У зависности од трајања и начина извођења, екстракциони процеси се могу поделити на дисконтинуалне (мацерација, двострука мацерација, турбо-екстракција) и континуалне процесе (перколација, реперколација и циркулаторне технике као што је Soxhlet екстракција) (Ncube et al., 2008).

Основни циљ екстракције биоактивних супстанци из биљних сировина је добијање препарата који садржи што већи удео терапијски активних супстанци у биолошки најповољнијем облику, уз минималну екстракцију баластних материја и уз обезбеђивање економске исплативости целокупног процеса (Mitić and Nikolić, 2019).

2.3.2 Утицај оперативних услова на процес екстракције из биљних сировина

Оперативни услови који утичу на брзину и степен екстракције супстанци из биљне сировине, као и на избор опреме за екстракцију, су: величина честица и густина паковања биљне сировине, природа растварача, хидродинамички услови, температура и време (Stanković and Stanojević, 2014).

Величина честица и густина паковања. Да би брзина преноса масе екстрактивних материја била већа, потребно је да величина честица буде што мања. У том случају је и краће растојање преласка екстрактивних материја из чврсте у течну фазу. Како би се повећала контактна површина између честица и растварача, степен уситњености честица треба да буде што већи. Технике уситњавања као што су ломљење, резање, стругање, истирање и ударање одређују степен разарања ћелијске структуре, а квалитет уситњавања дефинисан је величином честица, специфичном површином и бројем разорених ћелија. Међутим, прерада фино уситњеног биљног материјала се избегава, јер се честице теже одвајају од течне фазе у случају суспендованих честица и могу да запуше међупростор између честица у слоју биљног материјала и спрече проток растварача кроз слој. При гушћем паковању биљне

сировине, као и при бубрењу у екстракционим уређајима, смањује се међупростор између честица биљне сировине. Код динамичких поступака екстракције, то захтева већу брзину кретања растварача ради ефикаснијег преноса екстрахованих материја из дифузионог слоја и повећања ефикасности екстракције. Код статичких поступака екстракције, повећање густине паковања успорава процес екстракције и смањује њену ефикасност (Ponomarev, 1976; Stanković and Stanojević, 2014).

Природа растварача. Избор растварача представља један од кључних фактора процеса екстракције, како са аспекта ефикасности изоловања биоактивних супстанци, тако и са аспекта економичности целокупног процеса. Он пре свега зависи од степена хидрофилности једињења која се екстрахују из биљне сировине. У том смислу, екстрактивне материје могу се поделити на хидрофилне, које су растворне у поларним растварачима, затим хидрофилно-хидрофобне, растворне у слабо поларним растварачима, као и хидрофобне супстанце, које се растварају у неполарним растварачима. При избору одговарајућег растварача примењује се основно правило хемије растварања - слично се раствара у сличном. Поларна једињења, која су окарактерисана високим вредностима диелектричне константе, показују добру растворљивост у поларним растварачима, док се неполарна једињења ефикасније растварају у неполарним растварачима. Поларни растварачи, као што су вода и водено-алкохолне смеше, погодни су за екстракцију фенолних једињења, флавоноида и гликозида, док неполарни или слабо поларни растварачи фаворизују издвајање липофилних компонената, као што су терпени, масна уља и воскови. Ради побољшања услова расподеле и повећања коефицијента расподеле екстрактивних материја, у индустријској пракси често се примењују мешавине два или више растварача. Избор сложених растварача заснива се на њиховој међусобној растворљивости и компатибилности, при чему се на тај начин може постићи значајно већа растворљивост циљних супстанци у поређењу са употребом појединачних растварача (Treybal, 1968; Pavlov et al., 1979; Grizo, 1987; Tolić, 1996; Do et al., 2014; Dutta et al., 2016).

Хидродинамички услови. Одлучујући утицај на принос и степен екстракције материја из биљне сировине имају хидродинамички услови. Посебно имају велики утицај на пренос масе у дифузионом подслоју и у растварачу ван честица биљне сировине. Однос биљна сировина – количина растварача (солвомодул) за екстракцију један је од битних хидродинамичких фактора у процесу екстракције. Избор оптималног солвомодула уз остале оптималне услове, утиче на принос и степен екстракције, као и на економичност процеса екстракције. Повећањем солвомодула смањује се утрошак

растварача потребног за екстракцију узорка чиме се повећава концентрација биоактивних једињења у добијеном екстракту. Међутим, неопходно је успоставити оптималну равнотежу између количине биљног материјала и растварача, јер ће у условима недовољне количине растварача пренос масе бити отежан, што може довести до смањеног степена екстракције и нижег приноса екстрактивних материја (Stanković and Stanojević, 2014; Hidalgo and Almajano, 2017).

Утицај температуре и времена екстракције. Температура и време екстракције су међусобно повезани параметри који значајно утичу на ефикасност процеса. Повећањем температуре смањује се вискозност растварача, убрзава дифузија биоактивних једињења и скраћује време потребно за пенетрацију растварача у биљне ћелије, чиме се побољшава пренос масе. Због тога виша температура омогућава краће време екстракције, док се продужавањем времена може постићи задовољавајући степен издвајања и при нижим температурама (Ponomarev, 1976; Stanković and Stanojević, 2014). Међутим, прекомерно повећање температуре или времена екстракције може довести до деградације термолабилних једињења и смањења селективности процеса. Зато је неопходна оптимизација ова два параметра, нарочито код биљних сировина сложеног хемијског састава, као што је црни бибер, како би се обезбедила висока ефикасност и очувала стабилност циљних биоактивних компоненти (Tiwari, 2020).

Савремени приступи екстракцији све више теже оптимизацији процеса кроз поређење различитих техника и моделовање кинетике екстракције, што омогућава боље разумевање механизама издвајања и рационалан избор услова рада. Овакав приступ посебно је значајан у истраживањима која имају за циљ упоредну анализу различитих техника екстракције и повезивање добијеног хемијског састава са биолошком активношћу изолата.

2.3.3 Масени пренос у процесу екстракције

Математички опис и анализа екстракције чврсто–течно значајно се поједностављује применом упрошћених физичких модела, од којих су најпознатији (Stanković and Stanojević, 2014; Mitić and Janković, 2017):

- модел заснован на нестационарној дифузији кроз биљни материјал;

- модел Пономарјева, који представља математички опис промене количине екстрактивних материја у биљној сировини у периоду споре екстракције, а добија се упрошћавањем модела нестационарне дифузије кроз биљни материјал;

Примена математичких модела омогућава квантитативно описивање екстракције и експлоатацију добијених резултата. Они се користе у планирању и преносу поступака са лабораторијског на индустријски ниво. Модел не сме бити само математички инструмент, већ треба да рефлектује физичку слику која произилази из испитиване материје и експерименталних испитивања (Veljković and Milenović, 2002).

Пренос масе кроз чврст материјал при екстракцији чврсто–течно одвија се дифузијом. Иако механизам дифузије није тако једноставан као у случају гасова и течности, брзина преноса екстрактивних материја кроз чврст материјал натопљен растварачем најчешће се може описати Фиковим законима. Услови дифузије при екстракцији чврсто–течно су, по правилу, нестационарни, тако да се брзина промене концентрације екстрактивних материја, под условом да се не одвија хемијска реакција, описује једначином другог Фиковог закона. Када се пренос масе одвија у једном правцу, диференцијални облик ове једначине је (ј-на 2.1):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \tag{2.1}$$

где је:
c – концентрација екстрактивних материја (mg/cm^3),

t – време (s),

x – дужина у правцу преноса масе (m) и

D – коефицијент дифузије екстрактивних материја (m^2/s).

Аналитичко решавање једначине (2.1) захтева сложен математички приступ, па се она може користити за решавање проблема нестационарне дифузије при екстракцији чврсто–течно само у случају једноставнијих геометријских облика чврстих честица (равна плоча, цилиндар и сфера), интеграцијом уз примену одговарајућих почетних и граничних услова (Veljković and Milenović, 2002). Као резултат добија се зависност релативне промене садржаја екстрактивних материја у биљној сировини q/q_0 од времена (ј-на 2.2):

$$\frac{q}{q_0} = \left(1 - b'\right)e^{-k't} \tag{2.2}$$

За израчунавање параметара једначине (2.2) користи се њен линеарни облик (ј-на 2.3):

$$\ln\frac{q}{q_0} = \ln(1-b') - k't \tag{2.3}$$

Једначина Пономарјева (ј-на 2.4) претпоставља да у периоду споре екстракције постоји линеарна зависност између нормализоване масе екстрахованих супстанци и времена t (Ponomarev, 1976):

$$(q_0\text{-}q)/q_0 = b'' + k'' \cdot t \tag{2.4}$$

где је:

q_o – полазни садржај укупних екстрактивних материја у биљној сировини

q – садржај укупних екстрактивних материја у биљној сировини после екстракције за време t,

b'' – коефицијент испирања,

k'' – коефицијент правца линеарне зависности.

Коефицијент испирања представља меру масе екстрактивних материја у односу на њихову почетну масу у периоду споре екстракције. Једначина (2.4), из које су одређени коефицијент испирања и коефицијент правца, представља једначину праве чији је коефицијент правца k'', а одсечак на ординатној оси коефицијент испирања b'' (Stanković and Stanojević, 2014; Ponomarev, 1976).

2.3.4 Конвенционалне и савремене технике изолације биоактивних једињења

Најчешће коришћене конвенционалне технике изолације биоактивних једињења из биљних сировина су мацерација, перколација, екстракција уз рефлукс, пресовање, Soxhlet екстракција и хидродестилација. Ове методе се одликују једноставношћу примене и дугогодишњом употребом у лабораторијској и индустријској пракси. Међутим, њихови главни недостаци су дуго време трајања процеса, висока потрошња органских растварача и енергије, као и могућност деградације термолабилних биоактивних једињења (Azmir et al., 2013).

Последњих година све је израженије интересовање за зелене екстракционе технологије, пре свега због потребе за смањењем употребе органских растварача, који могу имати негативан утицај на животну средину, као и на безбедност и квалитет финалних производа. Као алтернатива конвенционалним поступцима, развијене су бројне иновативне технике екстракције које омогућавају ефикаснију изолацију

биоактивних једињења уз краће време процеса и мању потрошњу растварача (Chemat et al., 2012).

Међу најзначајније савремене технике екстракције спадају:

- микроталасна екстракција - МЕ (енг. *Microwave Assisted Extraction*),
- ултразвучна екстракција - УЕ (енг. *Ultrasound Assisted Extraction*),
- екстракција суперкритичним флуидима - ЕСФ (енг. *Supercritical Fluid Extraction*),
- екстракција течностима под притиском - ЕТП (енг. *Pressurized Liquid Extraction*),
- убрзана екстракција растварачима (енг. *Accelerated Solvent Extraction*),
- екстракција субкритичном водом (енг. *Subcritical Water Extraction*), позната и као екстракција прегрејаном водом под притиском, и
- технике засноване на импулсним електричним пољима.

Ове методе су развијене са циљем да се побољша ослобађање биоактивних једињења из биљне сировине, углавном путем повећања капацитета масеног преноса и разарања ћелијске структуре (Huie et al., 2002; Ong et al., 2006; Joana Gil-Chávez et al., 2013). Карактеристике биљне сировине, као што су врста биљке, део биљке, степен уситњености и начин припреме материјала, могу значајно утицати на састав и особине добијених екстраката (Zakaria et al., 2016). Због тога је за ефикасну екстракцију неопходно користити адекватно припремљен биљни материјал, у комбинацији са растварачем оптималних својстава и пажљиво контролисаним условима процеса.

Етарска уља се могу изоловати различитим техникама, као што су дестилација паром, хидродестилација, хладно пресовање или експресија, анфлераж, екстракција органским растварачима, суперкритична екстракција CO_2 и др. (Skala et al., 1999; Okoh et al., 2010).

Традиционално, најчешће коришћене методе за изолацију етарских уља су хидродестилација и дестилација воденом паром, које су једноставне за примену и економски прихватљиве, али могу довести до термичке деградације осетљивих компонената и губитка лако испарљивих једињења услед дугог времена загревања (Svoboda et al., 2000; Okoh et al., 2010). Савремене технике изолације, као што су хидродестилација потпомогнута микроталасима - МХД (енг. *Microwave Assisted Hydrodistillation*) и ултразвуком - УХД (енг. *Ultrasound Assisted Hydrodistillation*), омогућавају скраћење времена изолације и повећање приноса етарских уља, уз боље

очување њиховог хемијског састава и биолошке активности у поређењу са конвенционалним методама (Lucchesi et al., 2004; Chemat et al., 2017). Екстракција суперкритичним CO_2 показала се као високо ефикасна и селективна метода, јер се одвија при нижим температурама и без употребе органских растварача, што резултује добијањем уља високе чистоће и хемијског профила блиског природном саставу биљке (Reverchon and De Marco, 2006; Herrero et al., 2010). Ипак, због високе цене опреме и сложенијих процесних услова, ова метода је углавном ограничена на индустријску и фармацеутску примену. Стога избор методе екстракције етарских уља представља компромис између ефикасности, очувања термолабилних компонената, економске исплативости и намене финалног производа (Bakkali et al., 2008).

Екстракција ***фенолних једињења*** из биљних сировина може се спроводити различитим конвенционалним и савременим техникама, чија ефикасност зависи од природе матрикса, поларности растварача и изабраних процесних параметара. Класичне методе екстракције растварачима, као што су мацерација и Soxhlet екстракција, широко су коришћене, али се одликују дужим временом екстракције, већом потрошњом растварача и могућом деградацијом термолабилних фенолних једињења (Azmir et al., 2013; Santos-Buelga et al., 2019). Савремене технике, попут ултразвучне екстракције (УЕ), омогућавају побољшан пренос масе услед кавитационих ефеката, што резултује већим приносом фенолних једињења у краћем времену у поређењу са конвенционалним поступцима (Chemat et al., 2017; Rajbhar et al., 2015). Микроталасна екстракција (МЕ), показала се као једна од најефикаснијих метода за изолацију полифенола, јер омогућава брзо загревање унутрашњости биљне матрице, повећану растворљивост и смањену употребу растварача (Camel, 2000; Rajbhar et al., 2015). Екстракција течностима под притиском (ЕТП), укључујући и екстракцију воденом паром под притиском, представља „зелену“ алтернативу која обезбеђује високу репродуктивност и ефикасност екстракције фенолних једињења уз минималан утицај на животну средину (Mustafa and Turner, 2011; Plaza and Turner, 2015). Са друге стране, екстракција суперкритичним флуидима (ЕСФ), нарочито CO_2, одликује се високом селективношћу и одсуством органских растварача, али захтева додавање ко-растварача ради ефикасније екстракције поларних фенолних једињења (Herrero et al., 2006). Стога се избор методе екстракције фенолних једињења заснива на балансу између ефикасности, селективности, економске оправданости и еколошке прихватљивости процеса (Azmir et al., 2013).

Алкалоиди представљају значајну групу биолошки активних азотних једињења која се у биљним сировинама најчешће налазе у облику соли са органским или неорганским киселинама. Њихова изолација заснива се на кисело-базним својствима, што омогућава екстракцију у киселим, неутралним или базним условима, у зависности од структуре алкалоида. У киселим условима алкалоиди се екстрахују као протоноване базе поларним растварачима, док се у базним условима издвајају као слободне базе помоћу органских растварача. Даље пречишћавање најчешће се спроводи техникама екстракције, укључујући и примену јоноизмењивачких и реверзно-фазних сорбената (Hermans-Lokkerbol and Verpoorte, 1986; Verpoorte et al., 1989; Popl et al., 1990).

Изолација пиперина, као главног алкалоида црног бибера може се спровести применом различитих екстракционих техника. Традиционално, за изолацију пиперина најчешће се користе класичне технике екстракције, међу којима је Soxhlet екстракција једна од најзаступљенијих. Ова метода се одликује једноставношћу и механичком ефикасношћу, али захтева дуго време екстракције и већу потрошњу растварача, при чему се постижу умерени приноси пиперина (Subramanian et al., 2016; Hamrapurkar et al., 2011).

Развој савремених техника екстракције омогућио је значајно унапређење процеса изолације пиперина, пре свега у погледу смањења времена екстракције и повећања приноса. Применом ултразвучне екстракције омогућено је убрзавање процеса услед кавитационих ефеката, али приноси пиперина су релативно ниски, што се приписује неравномерној расподели ултразвучне енергије у систему. Даље унапређење екстракције пиперина постигнуто је комбиновањем ултразвука и јонских течности као екстрагенса. Овај приступ омогућава селективнију екстракцију и краће време обраде, уз примену еколошки прихватљивијих растварача, али остварени приноси остају релативно ниски у поређењу са другим методама (Gorgani et al., 2017; Dudhatra et al., 2012; Cao et al., 2009).

Посебно значајан напредак у изолацији пиперина остварен је применом микроталасне екстракције. Током микроталасне екстракције долази до брзог загревања и ефикасног разарања ћелијских структура, што омогућава изоловање пиперина у веома кратком временском интервалу и уз висок принос (Raman and Gaikar, 2002; Li et al., 2013). Сличан принцип примењује се и код микроталасне екстракције уз рефлукс, која комбинује ефекте микроталасног загревања и класичног рефлукса, иако је главни недостатак што при повишеним температурама може доћи до деградације осетљивих једињења (Yang et al., 2012).

Савремени приступ изолацији пиперина укључује и примену суперкритичне екстракције флуидима, најчешће CO_2. Ова метода обезбеђује висок принос пиперина и добру репродуктивност, али захтева примену високих притисака и сложену опрему, што ограничава њену примену у односу на једноставније технике (Mukhopadhyay, 2000; Khaw et al., 2017).

Масна биљна уља најчешће се добијају из плода, семена или коштица пресовањем, екстракцијом растварачем или комбинацијом ових техника, при чему пресовање често претходи екстракцији растварачем (Young et al., 1994). Пресовање, укључујући и хладно цеђење, представља једноставну и широко примењену методу која омогућава добијање уља доброг квалитета, али са одређеним заосталим садржајем уља у семеној погачи. За потпуније издвајање уља у индустријској пракси најчешће се примењује екстракција органским растварачима, пре свега *n*-хексаном, у континуалним противструјним екстракторима (Veljković et al., 2006). Ова метода обезбеђује висок принос, али њени недостаци укључују употребу запаљивих растварача, као и ризик од пожара и експлозије (Young et al., 1994).

Као савремена и еколошки прихватљивија алтернатива, све већу примену има екстракција суперкритичним и наткритичним флуидима, најчешће CO_2. Овом методом добијају се масна уља без остатака органских растварача, при чему уља богата незасићеним масним киселинама нису изложена дејству кисеоника и високих температура, што значајно умањује ризик од оксидације и смањења квалитета (Skala et al., 2002).

2.3.4.1 Екстракција растварачем

Екстракција растварачем представља једну од најчешће примењиваних конвенционалних метода за изолацију биоактивних једињења из биљних сировина, укључујући и плод црног бибера. Као екстракциона средства најчешће се користе вода, метанол, етанол и ацетон, појединачно или у облику водених смеша, уз могућност модификације (нпр. додатак хлороводоничне или сирћетне киселине) ради повећања ефикасности екстракције.

У случају црног бибера, екстракцијом растварачима могу се изоловати различите групе једињења, пре свега алкалоид пиперин, затим фенолна једињења, флавоноиди, као и одређене липофилне компоненте у зависности од поларности примењеног растварача. Мацерација се често користи као једноставна шаржна техника, која се

изводи на собној температури током дужег временског периода, али је временски захтевна и мање ефикасна. Перколација и Soxhlet екстракција заснивају се на истом принципу преноса масе, али омогућавају брже и потпуније издвајање циљних компоненти. Soxhlet екстракција је посебно заступљена у лабораторијским условима, јер омогућава континуални контакт биљног материјала са свежим растварачем и даје веће приносе пиперина у поређењу са класичном мацерацијом. Показано је да модификована Soxhlet екстракција (енг. *„double bypass"*) може довести до вишеструко већег приноса пиперина у односу на мацерацију (Subramanian et al., 2016).

Иако је екстракција растварачима економски приступачна и технолошки једноставна, недостаци укључују дужи временски ток процеса, већу потрошњу растварача, нижу селективност и потенцијалне негативне утицаје на животну средину.

2.3.4.1.1 Екстракција уз рефлукс

Екстракција уз рефлукс (РЕ) која се изводи на повишеној температури, представља једну од најчешће примењиваних техника за изолацију биоактивних једињења из биљног материјала. Као екстракциони медијуми најчешће се користе испарљиви органски растварачи. Након завршетка екстракције, добијени екстракт се одваја од биљног материјала филтрацијом и накнадним пресовањем (Stanković and Stanojević, 2014).

Ова техника је нарочито погодна за екстракцију фенолних једињења. Поступак се изводи тако што се биљни материјал, одређеног степена уситњености, прелива одабраним растварачем у балону са округлим дном који је повезан са повратним кондензатором. Загревањем до тачке кључања долази до испаравања растварача, који се затим кондензује и враћа назад у екстракциону посуду, чиме се обезбеђује континуирани контакт свежег растварача са биљном матрицом.

Процес екстракције уз рефлукс обухвата продирање растварача у биљни материјал, растварање и дифузију биоактивних једињења у екстракциону средину, при чему на ефикасност поступка пресудно утичу величина честица, температура, врста растварача, pH вредност и време екстракције (Stanković and Stanojević, 2014).

Савремене варијанте ове технике често се комбинују са микроталасним загревањем, чиме се значајно повећава ефикасност и скраћује време изолације биоактивних једињења (Alonso-Carrillo et al., 2017).

2.3.4.1.2 Soxhlet екстракција

Soxhlet екстракција (СЕ) представља модификовану форму екстракције уз рефлукс и названа је по истоименом апарату. Биљни материјал се смешта у екстракциону чауру у облику цилиндра, која се налази изнад балона за сакупљање екстракта и испод кондензатора. Основна предност ове методе је њен континуални карактер, јер се свеж растварач непрекидно кондензује и пролази кроз биљни материјал.

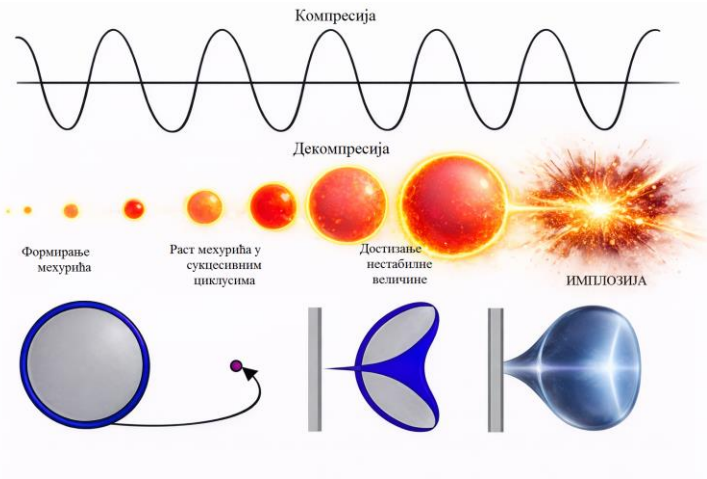
Захваљујући сталном контакту биљног материјала са свежим растварачем, Soxhlet екстракција омогућава високе приносе екстраката. Међутим, један од главних недостатака ове методе је дуготрајно излагање екстракта температури кључања, што може довести до термичке деградације осетљивих биоактивних једињења (Stanković and Stanojević, 2014).

2.3.4.2 Ултразвучна екстракција

Ултразвучни таласи у опсегу фреквенција од 20 kHz до 10 MHz имају широку примену у хемијској и прехрамбеној индустрији. Ултразвучна екстракција (УЕ) представља савремену екстракциону технику која се издваја у односу на конвенционалне методе због краћег времена екстракције, мање потрошње енергије, нижих инвестиционих трошкова и могућности примене „зелених“ растварача. Због ових карактеристика, УЕ се сматра еколошки прихватљивом и чистом технологијом (Tiwari, 2015).

У зависности од интензитета, ултразвук се дели на нискоинтензивни (< 1 W/cm^2), који се углавном користи у аналитичке и недеструктивне сврхе, и високоинтензивни (10–1000 W/cm^2), који се примењује у процесима екстракције и другим операцијама у хемијско-процесној и прехрамбеној индустрији (Tiwari, 2015).

Основни механизам деловања ултразвука у процесу екстракције заснива се на појави акустичне кавитације, која представља главну погонску силу ултразвучне екстракције. При проласку ултразвучних таласа кроз течну фазу долази до наизменичних циклуса компресије и декомпресије, што доводи до формирања, раста и имплозије гасних мехурића што се може шематски приказати на Слици 2.6.



Слика 2.6 Механизам настанка и имплозије кавитационих мехурића ваздуха приликом ултразвучне кавитације (прилагођено према Hu et al., 2025)

Имплозија мехурића узрокује локално екстремне услове, са краткотрајним порастом температуре (до око 5000 K) и притиска (до око 500 bar) (Mason and Peters, 2002). Ови екстремни услови на површини биљног материјала доводе до механичког оштећења ћелијских зидова и мембрана, чиме се олакшава продирање растварача у унутрашњост ћелија, растварање интрацелуларних компонената и убрзана дифузија екстрахованих једињења из чврсте у течну фазу. Поред тога, микротурбуленције и сударање честица при великим брзинама додатно унапређују пренос масе (Bermúdez-Aguirre et al., 2011; Valachovic et al., 2001). У прехрамбеној и фармацеутској индустрији најчешће се користе фреквенције у опсегу од 20 kHz до 100 kHz, при чему на нижим фреквенцијама доминира феномен акустичне кавитације (Chemat et al., 2017). Са повећањем фреквенције опада интензитет кавитације, што доводи до смањеног утицаја физичких феномена на пренос масе (Toma et al., 2001).

Ефикасност ултразвучне екстракције зависи од параметара ултразвука (фреквенција и снага), физичко-хемијских особина растварача (вискозитет и површински напон) и процесних услова, као што су температура и притисак (Tiwari, 2015). При примени ултразвука високог интензитета може доћи до формирања реактивних слободних радикала услед екстремних локалних услова. Иако ови радикали могу допринети додатном оштећењу ћелијских структура, они истовремено могу изазвати деградацију осетљивих биоактивних једињења, због чега је неопходна пажљива оптимизација процесних параметара како би се постигао висок принос екстракције уз минималну деградацију циљаних компоненти (Henglein and Kormann, 1985).

Температура представља један од најзначајнијих параметара који утиче на ефикасност ултразвучне екстракције. Повећањем температуре долази до смањења вискозитета и површинског напона растварача, као и до повећања његове дифузивности, што олакшава продирање растварача у поре биљног материјала настале услед кавитације. Истовремено, на вишим температурама може доћи до смањеног ефекта кавитације услед брже имплозије мехурића и ослобађања мање количине енергије (Chemat et al., 2017). Поред тога, повишена температура доприноси омекшавању и делимичном разарању ћелијског зида, што додатно олакшава дифузију интраћелијског садржаја у течну фазу. Иако принос екстракције најчешће расте са температуром, неопходна је оптимизација услова како би се избегла деградација термолабилних једињења (Vinatoru, 2001).

Време екстракције има карактеристичан утицај на принос, који нагло расте у почетној фази процеса, а затим се постепено приближава стационарном стању. Комбиновано дејство повишене температуре и продуженог времена екстракције у одређеним условима може довести до деградације циљаних једињења, што негативно утиче на економску оправданост процеса (Vinatoru, 2001).

Избор растварача има кључну улогу у одређивању селективности и ефикасности ултразвучне екстракције. Физичка својства растварача, као што су вискозитет, површински напон, напон паре и диелектрична константа, значајно утичу на интензитет кавитације и пренос масе. Растварачи са нижим напоном паре омогућавају интензивнију имплозију мехурића и ефикасније оштећење биљног материјала (Flannigan and Suslick, 2010). У складу са принципима „зелене хемије“, за УЕ се најчешће користе вода, смеше етанол–вода и биљна уља (Chemat et al., 2012).

Што се тиче опреме, ултразвучна купатила омогућавају истовремену обраду више узорака, али их карактерише нижа репродуктивност и мања ефективна испоручена снага (Chemat et al., 2017). Са друге стране, системи са ултразвучном сондом обезбеђују ефикаснији пренос енергије и чешће се примењују у лабораторијским и индустријским условима. Ултразвучна екстракција се често комбинује са другим техникама екстракције, као што су Soxhlet, микроталасна и суперкритична екстракција, при чему посебан значај има комбинација УЕ-МЕ због израженог синергистичког ефекта (Gude, 2015).

Ултразвучна екстракција се углавном примењује за изолацију поларних и умерено поларних једињења, пре свега полифенола, при чему су забележена значајна повећања приноса у односу на конвенционалне методе (Roselló-Soto et al., 2015). За

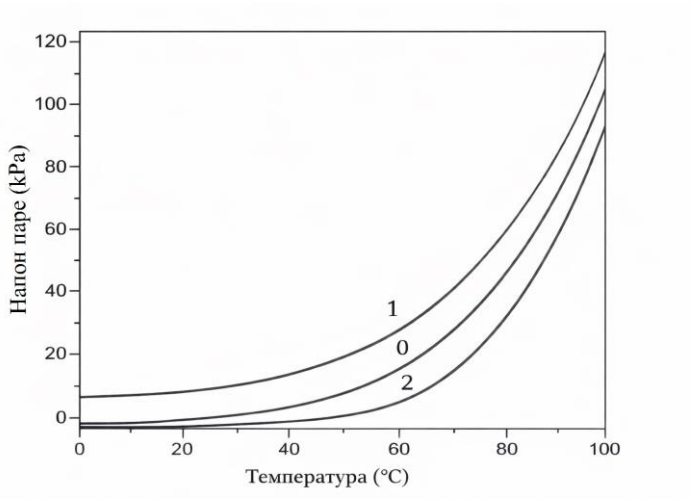
екстракцију неполарних једињења, као што су етарска уља и каротеноиди, примена ултразвучне екстракције представља изазов са аспекта „зелене хемије“ (Chemat et al., 2012).

Показано је да ултразвучна екстракција омогућава веће приносе у значајно краћем времену у поређењу са стандардним екстракционим поступцима, без уочене деградације фенолних компоненти при оптималним условима (Sivakumar et al., 2011; Khan et al., 2010). Због тога ултразвучна екстракција представља перспективну технику за бољу екстракцију биоактивних једињења из биљних сировина, уз смањену потрошњу енергије и растварача.

2.3.4.3 Хидродестилација

Хидродестилација представља једну од класичних и најчешће примењиваних техника за изолацију етарских уља из биљних сировина. Ова метода се користи за издвајање испарљивих, хидрофобних и термолабилних компоненти које се са водом не мешају или се мешају у веома малој мери, а које би при директном загревању могле подлећи разлагању или оксидацији. Због тога се хидродестилација успешно примењује за изолацију етарских уља из великог броја ароматичних и лековитих биљака, укључујући и црни бибер (Moore, 1975; Baser and Buchbauer, 2009).

Процес хидродестилације заснива се на основним законима физичке хемије који описују понашање немешљивих течности. У системима у којима су присутне две немешљиве течне фазе, као што су вода и етарско уље, свака компонента испољава сопствени напон паре независно од присуства друге компоненте. У том случају, укупан притисак изнад течне смеше једнак је збиру парцијалних притисака појединачних компоненти, што је у складу са Рауловим и Далтоновим законом (Moore, 1975; Atkins et al., 2023). На дијаграму (Слика 2.7) су приказана три карактеристична случаја: крива напона паре воде, као и криве напона паре етарских уља различите испарљивости. За етарска уља која су мање испарљива од воде, крива напона паре налази се испод криве воде, док се код лакше испарљивих етарских уља њихова крива налази изнад криве напона паре воде. Овај однос има директан утицај на динамику испаравања појединачних компоненти током хидродестилације, као и на промену састава етарског уља у функцији времена (Moore, 1975).



Слика 2.7 Криве напона паре воде (0), лакше (1) и теже (2) испарљивог етарског уља (прилагођено према Milojević, 2011)

Експериментално је показано да се током хидродестилације однос масе етарског уља и воде у парној фази смањује, што указује на промену састава етарског уља и потврђује да се оно не може посматрати као псеудокомпонента са константним напоном паре. Иако су компоненте етарског уља немешљиве или слабо мешљиве са водом, њихови појединачни напони паре не дају константан укупни нарон паре етарског уља, већ се он мења услед постепеног издвајања лакше испарљивих једињења. Због тога се појединачне компоненте етарског уља могу приближно описати Рауловим законом, при чему је укупни парцијални притисак једнак збиру парцијалних притисака његових компонената (Milojević, 2011).

На динамику процеса додатно утиче спора дифузија етарског уља из неразорених секреционих структура биљног материјала, што значајно утиче на принос и састав добијеног уља. Повишена температура и присуство воде могу довести до губитка најиспарљивијих компоненти или настанка производа разградње, што може утицати на сензорни квалитет етарског уља (Picket et al., 1975; Moyer and Heath, 1986; Chialva et al., 1982). Ипак, хидродестилација остаје широко примењена техника због једноставности, економичности и задовољавајућег приноса.

Хидродестилација се, у зависности од третмана биљне сировине, може изводити као дестилација водом, дестилација водом и воденом паром или дестилација воденом паром.

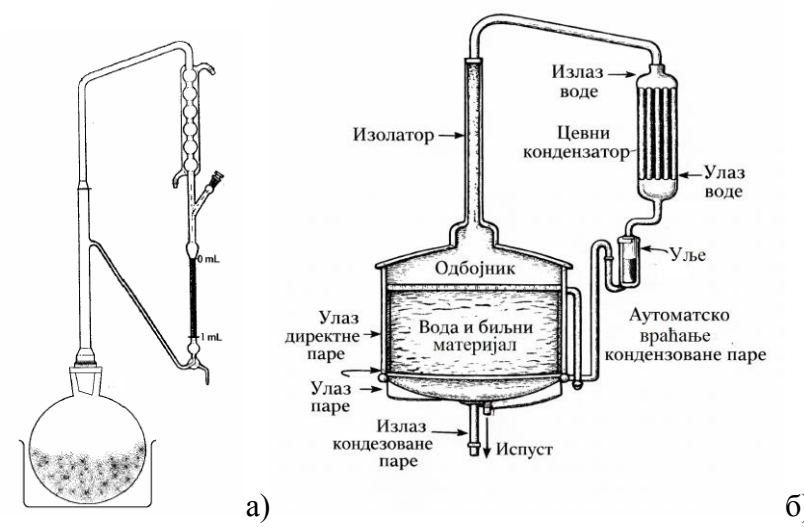
Дестилација водом подразумева потапање биљног материјала у воду, где се смеша загрева до кључања. Иако је описана у литератури, у индустријској пракси се

ретко примењује због ниског приноса и слабијег квалитета етарског уља, који су последица дуготрајног излагања високим температурама и директног контакта са водом. Најчешће се користи код малих произвођача, а у лабораторијским условима изводи се применом Clevenger апарата (Skala et al., 1999).

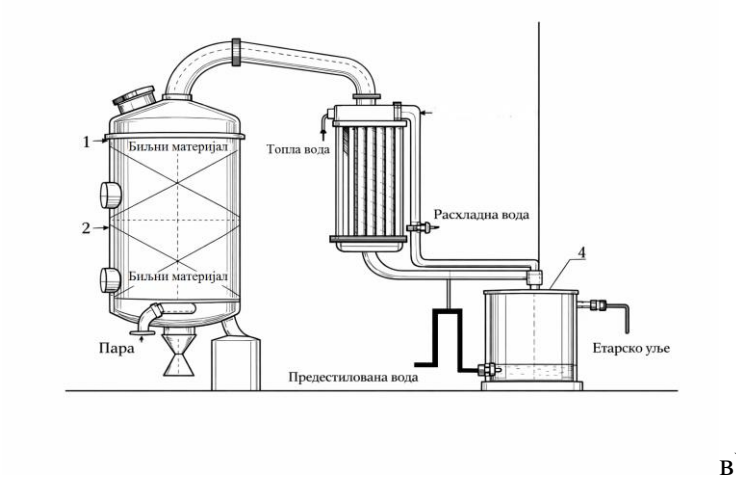
Дестилација водом и воденом паром обезбеђује већи принос и бољи квалитет етарског уља у односу на класичну водену дестилацију. Ефикасност процеса у значајној мери зависи од могућности равномерног проласка водене паре кроз биљну масу, што утиче на интензитет дифузије испарљивих компоненти из унутрашњости биљних ткива и њихово одвођење у парну фазу. Мањи дестилатори показују боље резултате, док код већих система може доћи до локалних прегревања и деградације термолабилних компоненти (Skala et al., 1999).

Дестилација воденом паром представља најзаступљенији поступак за индустријско добијање етарских уља. Код ове методе водена пара се производи у парогенератору и пропушта кроз биљни материјал, што омогућава ефикасно одвајање етарског уља уз бољу контролу процесних услова. У поређењу са конвенционалном хидродестилацијом, овај поступак даје већи принос, што је потврђено и код плода црног бибера, где је остварен већи принос етарског уља (2,8 %) у односу на Clevenger хидродестилацију (2,2 %) (Tran et al., 2019).

Шематски приказ уређаја за изолацију етарског уља различитим типовима хидродестилације су дати на Слици 2.8.



а) б)



в)

Слика 2.8 Шематски приказ уређаја за изолацију етарског уља а) водом (Clevenger апарат), б) водом и воденом паром (дестилатор са истовременим контактом водом и воденом паром) и в) воденом паром (дестилатор са воденом паром и системом сепаратора и кондензатора) (прилагођено према Ph Eur., 7, 2010, Skala et al., 1999 and Milojević, 2011)

Како је претходно наведено, традиционалне методе изолације етарских уља јесу економичне, али уз ризик од термичке деградације, док савремене технике (МХД, УХД, ЕСФ) побољшавају принос и чувају квалитет, али су често скупље и технолошки захтевније (Svoboda et al., 2000; Okoh et al., 2010; Lucchesi et al., 2004; Chemat et al., 2017; Reverchon and De Marco, 2006; Herrero et al., 2010; Bakkali et al., 2008).

2.3.4.3.1 Фракционисање етарског уља

Етарска уља представљају сложене смеше великог броја компонената које се разликују по физичко-хемијским својствима, испарљивости и биолошком дејству. Иако се у природи јављају као јединствена целина, могу се издвојити групе сродних једињења, као што су монотерпени и сесквитерпени, чије раздвајање омогућава добијање фракција или појединачних компонената са знатно већом комерцијалном и фармаколошком вредношћу у односу на целокупно етарско уље (Milenković et al., 2024; Glišić et al., 2007).

Фракционисање етарских уља може се спроводити различитим поступцима, међу којима се издвајају екстракција суперкритичним угљеник(IV)-оксидом, фракциона дестилација под сниженим притиском или са воденом паром, као и фракционисање током самог процеса хидродестилације (Reverchon, 1997; Glišić, 2003; Milenković et al., 2024).

Суперкритична екстракција интензивно се проучава последњих деценија као ефикасна метода фракционисања етарских уља. При уобичајеним условима долази до истовремене екстракције етарског уља и липофилних неиспарљивих компонената, док се њихово раздвајање заснива на различитој растворљивости у наткритичном флуиду при променама притиска и температуре. Применом система са више сепаратора могуће је постићи селективно фракционисање компонената (Reverchon, 1997; Reverchon and de Marco, 2006). Додатком ко-растварача могуће је проширити примену методе и на поларнија једињења (Reverchon and de Marco, 2006).

Током хидродестилације истовремено се одвијају процеси дифузије етарског уља из биљног материјала, испаравање са воденом паром и накнадне кондензације и сепарације фаза. Дифузија кроз чврсти материјал представља ограничавајући корак процеса, док је испирање етарског уља са површине честица релативно брзо (Milojević et al., 2011).

Фракциона дестилација етарских уља може се посматрати као ректификација мултикомпонентне смеше, при чему се лакше испарљиве компоненте концентришу у горњим деловима колоне, док теже остају у доњим фракцијама. Иако је реална смеша неидеална, у пракси се често примењује поједностављен приступ заснован на Рауловом закону, што омогућава опис процеса и предвиђање распореда компонената дуж колоне. Теоријски, са довољним бројем теоријских подова могуће је издвајање појединачних компонената етарског уља високе чистоће (Marković, 2018).

2.4 Циклодекстрини

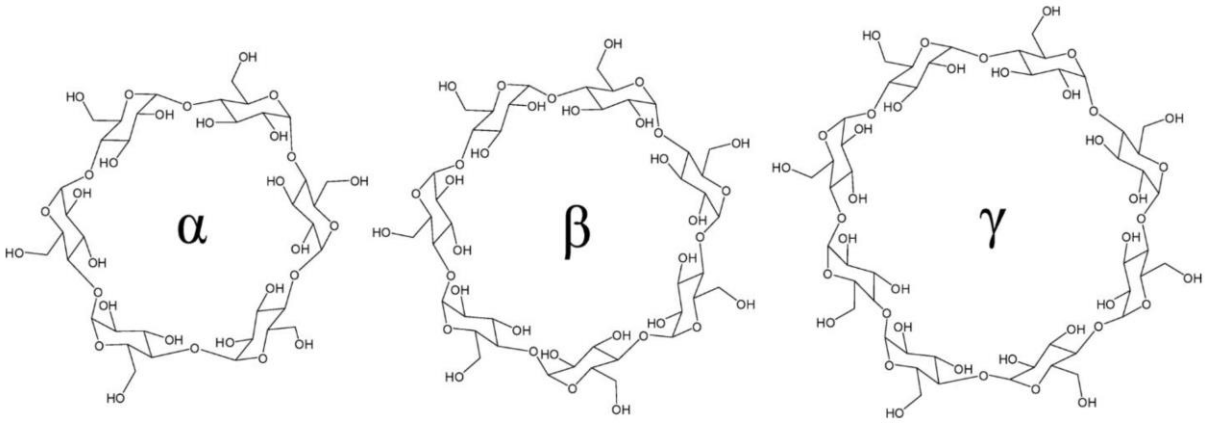
Последњих деценија интензивно се проучава стварање инклузионих комплекса лекова са *β*-циклодекстрином - *β*-CD (енг. *Cyclodextrin*) и његовим дериватима, првенствено као стратегија за превазилажење слабе растворљивости бројних биоактивних супстанци у води. Слаба растворљивост често условљава непотпуно растварање у гастроинтестиналном тракту, спорију апсорпцију и последично смањену оралну биолошку расположивост, што може захтевати примену већих доза у односу на ефективну количину супстанце. Укључивањем молекула „госта“ у циклодекстринску шупљину („домаћин“) могуће је повећати привидну растворљивост и побољшати расположивост активне супстанце, због чега се *β*-циклодекстрин и његови деривати користе као погодни носачи у фармацеутским системима (Tiwari et al., 2010; Ramos-Martínez et al., 2022).

Инклузиони комплекси спадају у групу „некласичних“ комплекса који настају под дејством механичких фактора односно фактора просторне инклузије компонената комплекса: молекул „домаћина“ поседује шупљину у коју се смешта молекул „госта“. Стабилизација комплекса се остварује претежно нековалентним интеракцијама (Ван дер Валсове силе, водоничне везе, хидрофобне и поларне интеракције), док хемијске везе интератомског/молекулског типа нису доминантне. Настајање и стабилност зависе од величине и облика госта и димензија шупљине домаћина, па се у пракси издвајају кавезасти и каналски типови инклузионих једињења (Nikolić, 2003).

У фармацеутској технологији, формирање инклузионих комплекса може допринети: модулацији растворљивости и брзине растварања, побољшању биолошке расположивости, повећању физичко-хемијске стабилности (заштита осетљивих функционалних група), као и корекцији органолептичких особина (мирис/укус) и уједначавању садржаја активне супстанце у дози. Посебно су погодне активне супстанце које су слабо растворљиве и/или нестабилне, тешко формирају водене растворе (нпр. за парентералне облике), или показују непожељне органолептичке карактеристике, при чему стварање комплекса са циклодекстринима представља рационалан приступ за унапређење њихових технолошких и биолошких перформанси (Nikolić, 2003; Tiwari et al., 2010).

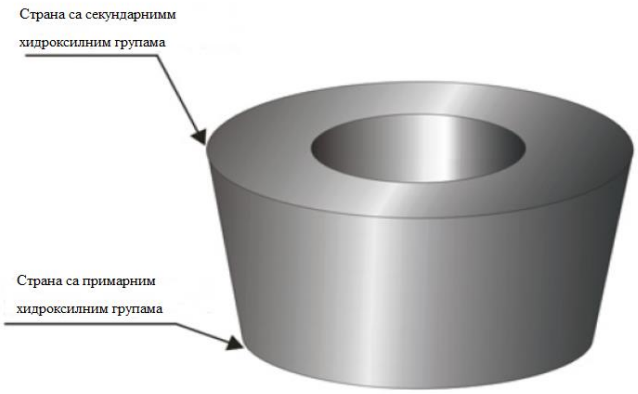
2.4.1 Циклодекстрини као носачи лекова

Циклодекстрини (CD) су циклични, нередукујући малтоолигосахариди изграђени од 6 или више *α*-D-глукопиранозних јединица повезаних *α*-1,4-гликозидним везама. У зависности од степена полимеризације означавају се као *α*-, *β*- и *γ*-циклодекстрин (*α*-CD, *β*-CD, *γ*-CD) са 6, 7 и 8 јединица, редом (Слика 2.9).



Слика 2.9 Структуре и изглед *α*-CD, *β*-CD, *γ*-CD (прилагођено према Van de Manakker et al., 2009)

Циклодекстрини се добијају разградњом скроба деловањем ензима циклодекстринглукозил-трансферазе – CGT (енг. *Cyclodextrin glycosyltransferase*), при чему настаје смеша *α*-, *β*- и *γ*-CD. Структурно, CD подсећају на зарубљену купу. Секундарне хидроксилне групе (OH-2 и OH-3) налазе се на широј страни, а примарне (OH-6) на ужој страни молекула (Слика 2.10). Водоничне везе су изражене између OH-2 и OH-3 група, при чему OH-3 делује као донор протона; јачина ових веза расте у низу: *α*-CD < *β*-CD < *γ*-CD. OH-6 групе могу формирати водоничне везе на ужој страни, али су оне у води дестабилизоване и обично изостају у кристалима CD (Nikolić, 2003).



Слика 2.10 Шематски приказ изгледа молекула циклодекстрина (прилагођено према Nikolić, 2003)

Комерцијално доступни и значајни за фармацију су: *α*-CD, *β*-CD и *γ*-CD. Унутрашњост шупљине CD је релативно хидрофобна (доминантни H-атоми), док су споља присутне хидроксилне групе. У воденом раствору шупљина садржи приближно 3 (*α*-CD), 7 (*β*-CD) или 9 (*γ*-CD) слабо везаних молекула воде, који се могу заменити одговарајућим „гост" молекулима. Због тога CD могу да укључују неполарне алифатичне и ароматичне молекуле одговарајућих димензија, при чему се комплекси најчешће формирају у односима 1:1, 2:1 или 1:2 у зависности од молекула „госта" (Van de Manakker et al., 2009).

2.4.2 Особине и примена циклодекстрина

У чврстом стању CD су ситан кристални прах и садрже извесну количину кристалне воде, а при потпуној дехидратацији прелазе у аморфну форму. Не поседују јасно дефинисану температуру топљења, а разлагање почиње на око 200 °C. Густина је приближно 1,42–1,45 g/cm³ (у зависности од садржаја воде). Основне карактеристике приказане су у Табели 2.3.

Табела 2.3 Основне карактеристике циклодекстрина

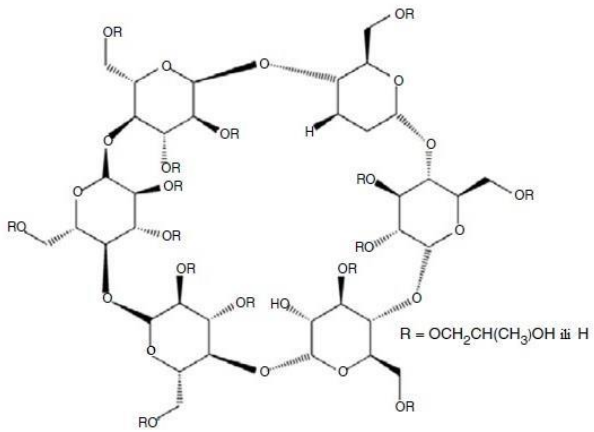
Својства	***α*-CD**	***β*-CD**	***γ*-CD**
Број глукопиранозних јединица	6	7	8
Молекулска маса	972	1135	1297
Растворљивост у води на 25 °C (g/100 cm^3)	14,5	1,85	23,2
Пречник централне шупљине (nm)	0,47-0,57	0,6-0,78	0,75-0,95

Наставак Табеле 2.3

Висина молекула (nm)	0,79	0,79	0,79
Приближна запремина празнина на 1 g CD (cm^3)	0,10	0,14	0,20

CD се растварају у води и диметил-сулфоксиду, док се у већини органских растварача не растварају. Растворљивост *β*-CD је знатно мања од растворљивости *α*- и *γ*-CD; растворљивост расте са порастом температуре и зависи од присуства органских растварача (често се у њиховом присуству смањује) (Maazaoui and Abderrahim, 2015; Dahabra et al., 2021).

Од свих CD најчешће се користи *β*-CD због једноставније производње и повољније цене. Супституцијом водоникових атома у оквиру -OH група (модификацијом хидроксилних група) растворљивост се може значајно повећати. На Слици 2.11 приказана је структура 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина - HP-*β*-CD (енг. *2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin*), синтетичког хидрокси-алкил-деривата који показује већу растворљивост у води у односу на нативни *β*-циклодекстрин, пре свега због присуства хидрофилних алкохолних група (Saokham et al., 2018; D'FAria et al., 2021; Poulson et al., 2021).



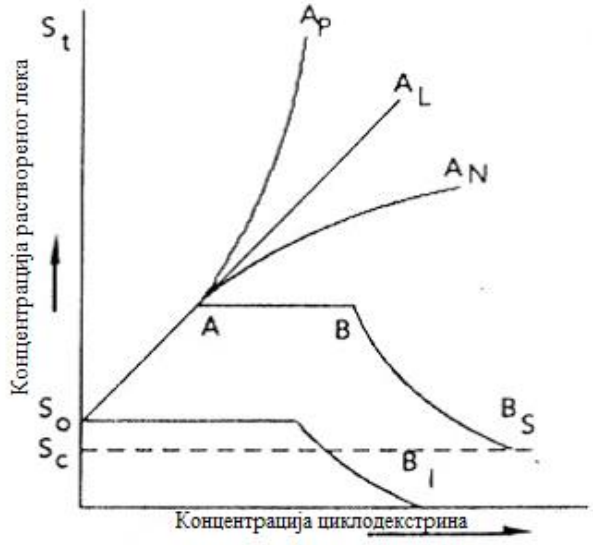
Слика 2.11 Структура HP-*β*-CD (D'Aria et al., 2021)

Са аспекта безбедности и фармакокинетике, циклодекстрини се генерално сматрају безбедним при пероралној примени, јер су услед своје хидрофилне структуре занемарљиво апсорбовани из гастроинтестиналног тракта, при чему се као (не)сварљиви олигосахариди делимично ферментишу/разграђују деловањем цревне микрофлоре; међутим, врло високе дозе могу бити повезане са нежељеним ефектима, укључујући оштећење бубрега, па се безбедност увек процењује у односу на дозу и тип

циклодекстрина (Carneiro et al., 2019). Истовремено, токсичност значајно зависи од пута примене: код парентералне примене поједини циклодекстрини могу показати токсичност при већим дозама, док се одређени хидрофилни деривати (нпр. 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрин) у пракси сматрају безбеднијим за парентералне формулације (Carneiro et al., 2019). Поред тога, циклодекстрини и деривати се у фармацеутској технологији користе перорално, парентерално и топикално (дермално/окуларно), а са еколошког становишта су примењиви јер потичу из обновљивих извора и биоразградиви су (Fenyvesi and Sohajda, 2022).

2.4.3 Константа стабилности и фазно-растворљивостне изотерме

Стехиометрија и стабилност комплекса често се процењују анализом изотерме растворљивости (зависност растворљивости лека од концентрације циклодекстрина). Према Higuchi-у, изотерме се деле на Тип А (A_L, A_P, A_N) и Тип В (B_S, B_L) (Слика 2.12).



Слика 2.12 Дијаграм фазне растворљивости (Challa et al., 2005)

A_L тип указује на комплекс 1:1 и линеарно повећање растворљивости са порастом концентрације циклодекстрина, док A_P тип указује на учешће више молекула циклодекстрина у грађењу комплекса. B_S тип показује плато и потом пад растворљивости уз преципитацију микрокристалног комплекса, док B_L тип указује на формирање нерастворног комплекса (Challa et al., 2005).

2.4.4 Циклодекстрини у терапијским облицима са контролисаним ослобађањем

Постоје савремени облици на бази циклодекстрина са: (1) тренутним/убрзаним ослобађањем, (2) продуженим, (3) модификованим и (4) циљним ослобађањем активне супстанце.

Тренутно или убрзано ослобађање. Користи се када је потребан брз почетак деловања и/или повећање брзине апсорпције и биорасположивости, што је повезано са повећаном растворљивошћу из комплекса. Најчешће се користе хидрофилни деривати (хидроксипропил-, малтозил-, диметил- и сулфобутилетер-*β*-CD). Циклодекстрини преносе активну супстанцу кроз хидрофилну средину гастроинтестиналног тракта до липофилне мембране, која има већи афинитет према активној супстанци него према циклодекстрину. Препоручује се примена минималне концентрације циклодекстрина која је довољна за постизање жељене растворљивости, јер повећање његове концентрације помера равнотежу у правцу формирања комплекса. Дисоцијација инклузионог комплекса може бити поспешена присуством конкурентних молекула, као што су холестерол и фосфолипиди, који се такмиче за интеракцију са инкапсулираном супстанцом и могу довести до њеног истискивања из комплекса (Uekama, 2004; Jansook et al., 2018).

Продужено ослобађање. Комплекси се могу припремати од хидрофилних лекова и нерастворних деривата циклодекстрина, чиме се постиже смањење растворљивости лека у води и продужено ослобађање; наводи се и кинетика нултог реда. Користе се алкилирани (диетил-, триетил-*β*-CD), ацетилирани и парацетилирани деривати са алкилним ланцима средње дужине (нпр. трибутирил-*β*-CD, тривалерил-*β*-CD) (Hirayama and Uekama, 1999; Uekama, 2004).

Модификовано ослобађање. Комплекси се формирају између хидрофобних лекова (нпр. нифедипин) и растворних деривата циклодекстрина (сулфобутилетер-*β*-CD, хидроксипропил-*β*-CD), често у комбинацији са полимерима (нпр. хидроксипропил целулоза), ради спречавања кристализације и уравнотеженије биорасположивости (Loftsson and Brewster, 1996; Uekama, 2004).

Циљно ослобађање. Циљ је ослобађање у одређено време и на одређеном месту, при чему је кључни фактор pH медијума. Користе се јонски деривати (нпр. карбоксиметилетил-*β*-CD), а посебно су погодни за лекове нестабилне у желудачном соку, оне који се апсорбују у танком цреву, иритирају гастроинтестинални тракт или имају кратак полуживот (Qi and Sikorski, 1999; Uekama, 2004).

2.5 Методе карактеризације биоактивних изолата црног бибера

Биљни материјал, па тако и плод бибера, представља изузетно сложен систем у коме се биоактивне супстанце јављају као мешавина различитих хемијских једињења широког распона поларитета. Управо та хемијска разноврсност природних производа, која им даје велики потенцијал за примену, истовремено чини идентификацију и карактеризацију методолошки захтевном, јер поуздан закључак о саставу и структури није могућ без контролисаног раздвајања компонената и примене више комплементарних аналитичких техника (Cos et al., 2006; Rouessac and Rouessac, 2013).

Зато се у фитохемијској идентификацији и карактеризацији изолата најчешће организује логичан низ корака: (1) опис и контрола технолошких карактеристика полазне биљне сировине (влага, гранулација, коефицијент бубрења, густина, запреминска и насипна маса, порозност/шупљикавост, гранулометријски састав, укупне екстрактивне материје), јер оне директно утичу на дифузију растварача и кинетику издвајања; (2) селективно издвајање група једињења у складу са њиховом испарљивошћу и поларитетом; (3) хемијско профилисање и раздвајање ради добијања „хемијског отиска“, између осталог, уз помоћ хроматографских техника раздвајања и (4) структурна потврда и процена својстава изолата применом спектроскопских и сродних метода (Rouessac and Rouessac, 2013; Skoog et al., 2014). Како контакт узорка са стационарном и мобилном фазом, услови елуације, као и избор детекције у једном хроматографском систему могу утицати на резултат, комбинација техника се мора прилагодити хемијској природи анализираних компоненти (Rouessac and Rouessac, 2013).

За поларније фракције (нпр. етанолне екстракте и сродне смеше), уобичајено је да се анализа фенолних једињења спроведе применом ултраљубичасте/видљиве спектрофотометрије (UV-Vis) (квантификација преко вредности апсорбанце на одгређеној таласној дужини и одговарајућих калибрационих зависности апсорбанце од концентрације). За детаљну идентификацију појединачних компоненти се користе течне хроматографске технике високе ефикасности са DAD и MS детектором (UHPLC-DAD-MS/MS – енг. *Ultra High Performance Liquid Chromatography-Diode array Detector-Mass Spectrometry*), јер омогућавају истовремено раздвајање, детекцију и идентификацију компоненти анализом хроматограма, како са DAD, тако и са MS сигнала, уз одговарајуће UV-Vis и MS/MS спектре који дају и њихову „молекулску потврду“ (Rouessac i Rouessac, 2013; Gross, 2017). Паралелно, минерални састав

(микро- и макроелементи) се у фитохемијским студијама поуздано прати спектрометријским техникама као што је индуковано спрегнута плазма са оптичко емисионом спектрометријом (ICP-OES), које дају квантитативне концентрације елемената у траговима и доприносе широј хемијској карактеризацији узорка (Boss and Fredeen, 2004; Skoog et al., 2014).

Код липофилних фракција (масна уља и сродни деривати), примењује се комбинација класичних физичко-хемијских показатеља квалитета (нпр. киселински број као индикатор садржаја слободних масних киселина, као и параметри повезани са присуством воскова) и инструменталних метода које пружају податке о функционалним групама и профилу компоненти. Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (FT-IR) је посебно корисна као брза техника за липидне системе (карактеристичне траке C=O, C–H, C–O), док хроматографске методе (HPLC/UHPLC укључујући анализе метил-естара масних киселина) обезбеђују раздвајање и квалитативно/квантитативно одређивање појединачних компоненти, уз могућност дубље идентификације у спрези са MS детекцијом (Griffiths and de Haseth, 2007; Rouessac and Rouessac, 2013; Christie, 2010).

За испарљиве фракције (етарска уља, као и испарљиве компоненте у биљном материјалу и хидролатима), аналитички приступ се најчешће ослања на комбинацију припреме/узорковања испарљивих једињења и њихове анализе гасном хроматографијом. Гасна хроматографија са масеном спектрометријом (GC/MS) обезбеђује истовремено раздвајање и структурну карактеризацију на основу масених спектара, док гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором (GC/FID) даје и репродуктивну квантификацију испарљивих компоненти. Управо ова комбинација је стандардни оквир савремене анализе етарских уља (Cagliero et al., 2022). Посебно место у припреми узорака има микроекстракција на чврстој фази (HS-SPME) јер омогућава екстракцију аналита без употребе растварача, уз висок степен компатибилности са GC системима (Scheppers-Wercinski, 1999; Wang et al., 2002). Подешавањем јонске јачине, температуре, времена излагања, интензитета мешања и избора превлаке влакна могуће је контролисати селективност и степен екстракције, док дериватизација (у матриксу или на влакну) може додатно повећати осетљивост и побољшати издвајање појединих класа испарљивих једињења (Stashenko and Martinez, 2007; Bezerra et al., 2016). „Headspace“ приступи (статички и динамички), као и сорпционе технике већег капацитета, имају предност јер се анализира гасна фаза са

мање матрикс-интерференција, што је посебно значајно у студијама природних производа и испарљивих једињења (Bicchi et al., 2004; Tholl et al., 2006).

Након раздвајања и добијања довољно чистих изолата (нпр. алкалоида као што је пиперин), структурна карактеризација се ослања на спектроскопске технике које допуњују хроматографске резултате. UV-Vis може да пружи брзу проверу карактеристичних апсорпционих максимума и да се користи у квантификационим протоколима, док FT-IR поуздано указује на присутне функционалне групе и промене у интеракцијама (нпр. водоничне везе и померања трака) (Griffiths and de Haseth, 2007; Billes and Mohammed-Ziegler, 2007). За системе инклузионих комплекса са циклодекстринима, кључно је комбиновати више независних метода које доказују стварање инлузионих комплекса. Фазна растворљивост даје термодинамички/равнотежни увид у интеракцију домаћин–гост, диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC) указује на промене термичког понашања (нпр. губитак тачке топљења кристалног госта или њено померање), рендгенска дифракција (XRD) прати промене кристалних својстава и појаву нових фаза, а протонска нуклеарна магнетна резонанца (^{1}H-NMR) омогућава увид у промене хемијских помераја које су карактеристичне за инклузију у шупљину циклодекстрина (Higuchi and Connors, 1965; Aniszewski, 2015; Brown, 2001; Cullity and Stock, 2001; Claridge, 2016).

Коначно, стабилност биоактивних једињења под утицајем светлости (фотодеградација) представља важан аспект карактеризације, јер директно утиче на применљивост и формулациону стабилност. Фотостабилност се уобичајено прати контролисаним излагањем UV зрачењу, уз накнадно праћење промена спектралних/хроматографских карактеристика (нпр. промене апсорпционих максимума, појава/нестанак пикова, настанак деградационих производа), у складу са општим принципима фото-испитивања фармацеутских супстанци (ICH, 1996; Rouessac and Rouessac, 2013).

Табеле у наставку (Табеле 2.4 и 2.5) су осмишљене као практичан *„индекс метода“* где је за сваку анализу наведено шта се мери/који је принцип, који је излазни параметар, који дијагностички траг се најчешће прати и у којим матрицама је примена типична (Rouessac and Rouessac, 2013; Skoog et al., 2014).

Табела 2.4 Физичко-хемијске методе идентификације и карактеризације

Метода/ испитивање	Принцип и критеријум (шта се мери и прати)	Излазни параметар (јединица)	Матрица/ тип изолата	Кључна референца (аутор, година)
Садржај влаге (гравиметријски)	Узорак се суши под прописаним условима; губитак масе се приписује води и испарљивим компонентама. Прати се промена масе до константне вредности (две узастопне мере разликују се ≤ 0,5 mg након додатног 1 h сушења).	w(влага), % (m/m) (енг. *Loss on drying* - LOD)	Биљни материјал	Ph. Eur. 7, 2010
Коефицијент бубрења / индекс бубрења (гравиметријски)	Мери се почетна маса сувог узорка (m_1) и маса након бубрења (m_2) у дефинисаним временским интервалима. Пре мерења m_2 уклања се вишак површинске течности. Прати се раст масе до платоа (равнотежа) и поновљивост резултата.	$k = m_2/m_1$ (g/g, бездимензионална величина) или $SI = [(m_2 - m_1)/m_1] \times 100$ (%) *SI (енг. *Swelling index*)	Биљни материјал	Ph. Eur. 7, 2010
Релативна густина	Релативна густина одређује се пикнометријски на дефинисаној температури (нпр. 20 °C) као однос масе узорка и масе воде исте запремине. Мери се маса узорка и воде у пикнометру и прати се стабилност температуре и поновљивост резултата.	$d_{20/20}$ (g/cm³)	Биљни материјал; етарско уље	Ph. Eur. 7, 2010
Гранулометријска анализа	Узорак се фракционише кроз сита дефинисаних отвора. Прати се расподела величина (масени удели фракција) и конзистентност просејавања (збир удела ≈ 100%).	Средњи пречник честица биљног материјала - d_{sr} (mm)	Биљни материјал	Ph. Eur 11.1, 2022
Укупне екстрактивне материје (УЕМ)	Екстракција у дефинисаном систему (растварач/солвомодул/време), затим испаравање и сушење остатка. Прати се маса сувог остатка до константне вредности и репродуктивност приноса.	g УЕМ/100 g биљног материјала	Полазни биљни материјал	Ph. Eur. 7, 2010
Садржај етарског уља по Clevenger-у	Хидродестилација у Clevenger апарату и волуметријско очитавање уља. Прати се јасно раздвајање фаза и стабилан менискус (без перзистентне емулзије) на крају дестилације.	V e.y. (cm³/100 g или %)	Биљни материјал	Ph. Eur. 7, 2010
Киселински број	Киселински број (I_A) одређује се титрацијом слободних масних киселина у узорку стандардним раствором алкалије (KOH/NaOH) уз фенолфталеин. Мери се утрошак титранта, а прати се појава ружичасте боје која је постојана одређено време.	I_A=5,610 x n/m (mg KOH/g)	Масно уље, етарско уље	Ph. Eur. 7, 2010

Наставак Табеле 2.4

Садржај воска у масном уљу	Издвајање/преципитација воска и гравиметријско одређивање. Прати се издвајање и сушење изолованог воска до стабилне масе.	w(восак), % (m/m)	Масно уље	Burger, 1981
Фазна растворљивост (пиперин–циклодекстрин)	Растворљивост једињења се одређује у функцији концентрације циклодекстрина при константној температури. Прати се успостављање равнотеже, облик дијаграма фазне растворљивости (A_L/…) и линеарност зависности у опсегу погодном за израчунавање привидне константе стабилности комплекса (K_s), уз коришћење S_0 као интрузичке растворљивости једињења.	Привидна константа стабилности - K_s (dm^3/mol);	Слабо растворљива једињења у води (Пиперин); инклузиони комплекси	Higuchi and Connors, 1965

Табела 2.5 Инструменталне методе идентификације и карактеризације

Метода / испитивање	Принцип и критеријум (шта се мери и прати)	Излазни параметар (јединица)	Матрица / тип изолата	Кључна референца (аутор, година)
Ултраљубичаста/ видљива спектрофотометрија — UV-Vis (енг. *Ultraviolet–Visible Spectrophotometry*)	Апсорпција у UV/Vis домену (Beer–Lambert), директно или након формирања обојеног комплекса. Прати се λ_{max} и A(λ), као и линеарност калибрације и поновљивост сигнала.	A(λ); λ_{max} (nm); концентрација (mg/dm^3, $\mu g/cm^3$)	Екстракти; пиперин; раствори	Aleixandre-Tudo and Du Toit, 2018; Billes and Mohammed-Ziegler, 2007
Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија — FT-IR (енг. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)	Апсорпција у средњем IR домену одражава вибрације хемијских веза и омогућава идентификацију функционалних група и карактеристичног спектралног профила једињења. Прате се положај трака, релативни интензитет и померања/промене облика трака ($\Delta\bar{\nu}$) као показатељ интеракција (нпр. стварање комплекса).	ν (cm^{-1}); релативни интензитет	Масно уље; пиперин; комплекси итд.	Stuart, 2004; Billes and Mohammed-Ziegler, 2007

Наставак Табеле 2.5

Течна хроматографија високе ефикасности (са DAD/UV детекцијом) — HPLC (DAD/UV) (енг. *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array/UV Detection*)	Раздвајање течном хроматографијом; DAD/UV детекција обезбеђује спектар сваког пика. Прате се ретенциона времена t_R, облици пикова, резолуција и поклапање UV-спектра маркера (нпр. пиперин).	t_R (min); A(λ); количина (mg/g)	Етанолни екстракти; пиперин; поларне фракције	Skoog et al., 2018
Ултра-високо-ефикасна течна хроматографија са DAD и тандем масеном спектрометријом — UHPLC-DAD-MS/MS (енг. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry*)	Једињења се раздвајају UHPLC-ом, детектују DAD-ом (UV спектар), а идентификују MS-ом праћењем *m/z* прекурсорског јона и карактеристичних MS/MS фрагмената уз ретенционо време (t_R); по потреби се проверава масена тачност и поклапање спектра.	*m/z*; MS/MS јони; t_R (min); (mg/g)	Етанолни екстракти; олеорезин; пиперин; хидролати	Skoog et al., 2018
Гасна хроматографија са масеном спектрометријом — GC/MS (енг. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)	Раздвајање испарљивих компоненти и идентификација по масеном спектру. Прате се поклапање са библиотеком и индекс задржавања (RI), као и однос карактеристичних јона.	t_R (min); RI (-); *m/z* (-)	Етарска уља; headspace фракције	Adams, 2007
Гасна хроматографија са пламено-јонизационим детектором — GC/FID (енг. *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*)	Раздвајање испарљивих компоненти уз FID детекцију за квантификацију на основу интеграције пикова. Прати се стабилност базне линије, поузданост интеграције и репродуктивност површина пикова.	Површина пика (a.u.); релативни удео (%)	Етарска уља	Adams, 2007
Микроекстракција на чврстој фази изнад површине узорка (припрема за GC) — HS-SPME (енг. *Headspace Solid-Phase Microextraction*)	Екстракција испарљивих једињења из гасне фазе (headspace) адсорпцијом/апсорпцијом на SPME влакно и њихово уношење у GC термичком десорпцијом. Прате се услови (влакно, време, температура) и репродуктивност профила/интензитета.	Профил испарљивих једињења; релативни удео (% по површини пика)	Биљни материјал; хидролати	Bicchi et al., 2004

Наставак Табеле 2.5

Индуковано спрегнута плазма са оптичко емисионом спектрометријом - ICP-OES (енг. *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*)	Мултиелементна анализа заснована на емисији карактеристичних спектралних линија елемената у ICP плазми. Прати се калибрација и валидација мерења контролним стандардима, избор аналитичких линија са минималним спектралним интерференцијама и стабилност сигнала (уз корекцију позадине по потреби).	c (mg/dm^3, μg/dm^3 у анализираном раствору; mg/kg у датом изолату)	Екстракти/раствори након дигестије	Boss and Fredeen, 2004
Диференцијална скенирајућа калориметрија — DSC (енг. *Differential Scanning Calorimetry*)	Термичка анализа: детекција фазних прелаза и интеракција у чврстом стању. Прате се T_m, ΔH и појава/нестанак или померање термалних догађаја (индикација комплексације/промена кристалности).	Tm, Tg, Tc (°C); ΔH (J/g или J/mol).	Инклузиони комплекси; физичке смеше	Haines, 2002
Рендгенска дифракција — XRD (енг. *X-Ray Diffraction*)	Дифракција X-зрака: процена кристалности и фазног састава. Прате се појава/нестанак карактеристичних пикова и промене интензитета.	Положај пикова: 2θ (°); међупланарни размак: d (Å или nm); интензитет: I (a.u./counts или I_{rel}, %).	Инклузиони комплекси; пиперин	Cullity and Stock, 2001
Протонска нуклеарна магнетна резонанца — ^{1}H-NMR (енг. *Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*)	Резонанца ^{1}H језгара у јаком магнетном пољу под дејством радио-фреквентних таласа; Прати се положај, облик и однос сигнала ради структурне потврде и индикације интеракција/укључивања (нпр. инклузиони комплекси).	δ (ppm); J (Hz); интеграл сигнала → конц. mol/dm^3, mg/cm^3)	Пиперин; комплекси у раствору	Friebolin, 2011

2.6 Методе одређивања биолошких активности изолата црног бибера

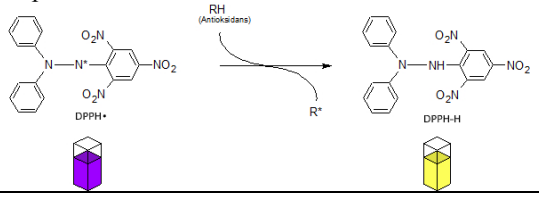
Анализа биолошких активности изолата црног бибера у овој дисертацији организована је кроз четири међусобно комплементарна домена: (1) антиоксидативну активност (неутрализација слободних радикала, редукциона моћ и хелирајућа способност), (2) антимикробну активност (инхибиција раста и/или бактерицидно/фунгицидно дејство према одабраним микроорганизмима), (3) антиинфламаторни потенцијал (процена инхибиције протеинске денатурације, модел

са BSA) и (4) антихипергликемијску активност (инхибиција ензима укључених у дигестију угљених хидрата и/или инхибиција формирања продуката гликације — AGE (енг. *Advanced Glycation End-products*)).

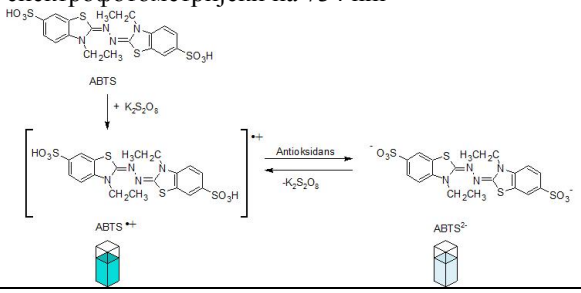
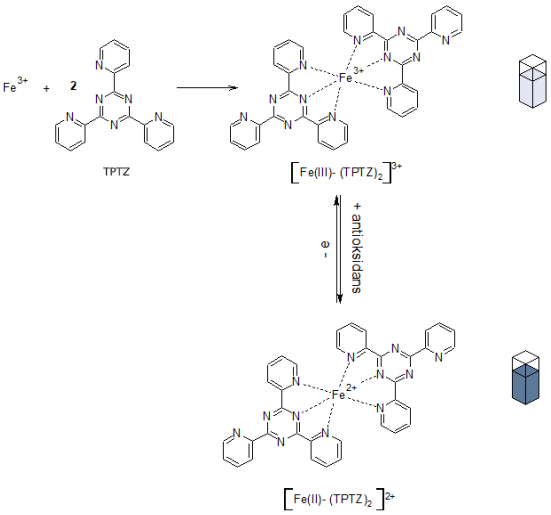
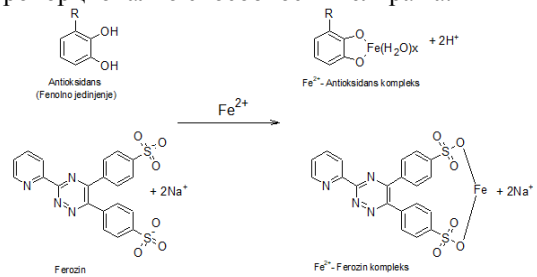
Како ови тестови почивају на различитим принципима и механизмима деловања, резултати се интерпретирају у оквиру њихових методолошких ограничења, али уз јединствен приступ. У свим анализама као примарни излазни параметар прати се проценат ефекта/инхибиције (%), док се где год је применљиво израчунава EC_{50} (mg/cm^3 или $\mu g/cm^3$) као концентрација потребна за постизање 50% ефекта. Код тестова који се заснивају на калибрацији стандардом, активност се додатно изражава као еквиваленти стандарда (нпр. Trolox еквиваленти: μmol TE/g или mg TE/g), уз доследно навођење јединица, што омогућава поуздану упоредивост између изолата и литературних података (Gülçin et al., 2004).

У наставку је дат табеларни преглед (Табела 2.6) примењених метода за одређивање биолошких активности, са кратким описом принципа анализе и јасно дефинисаним излазним параметрима и јединицама, као и типовима узорака и релевантним литературним изворима. Табела омогућава прегледност методолошког оквира и упоредивост резултата између различитих тестова и узорака.

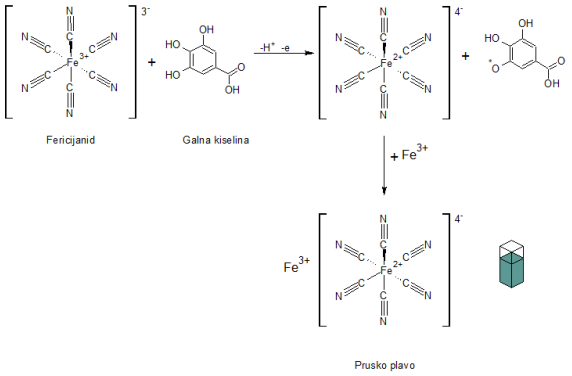
Табела 2.6 Методе одређивања биолошких активности

Активност / метода	**Принцип/шта се прати**	**Излазни параметар (јединица)**	**Референца**
Антиоксидативна активност			
Тест неутрализације 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала - DPPH• тест (енг. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)	Спектрофотометријско праћење смањења апсорбанце љубичастог раствора стабилног DPPH• радикала при његовој редукцији у жуту форму (DPPH-H), услед донирања електрона/водоника од стране антиоксиданаса; мери се на ~517–520 nm 	EC_{50} (μg/cm^3 одн. mg/cm^3); степен неутралисања DPPH радикала (%); TEAC (μmol Trolox/g)	Brand-Williams et al.,1995; Molyneux, 2004

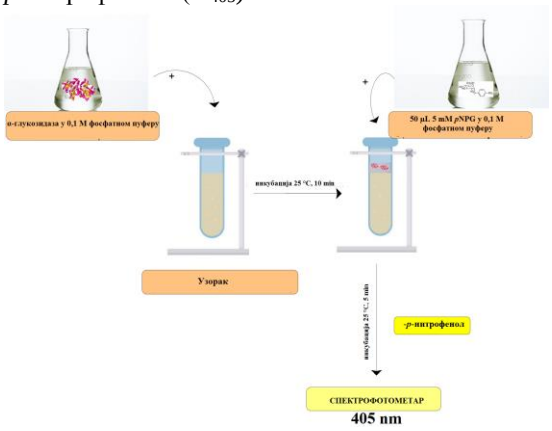
Наставак Табеле 2.6

Тест неутрализације 2,2′-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) радикал-катјона - ABTS•+ тест (енг. *2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)	Принцип је заснован на неутрализацији плаво-зеленог ABTS•+ радикал-катјона (формираног оксидацијом ABTS раствора) у присуству антиоксиданаса, што доводи до обезбојавања раствора; промена се прати спектрофотометријски на 734 nm 	EC_{50} (μg/cm^3 одн. mg/cm^3); степен неутралисања ABTS•+ радикала (%); TEAC (μmol Trolox/g)	Re et al., 1999; Arnao, 2000; Ilić et al., 2015
Тест редукционе способности гвожђа(III) - FRAP тест (енг. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)	Заснива се на редукцији комплекса гвожђа и 2,4,6-трис-(2-пиридил)-S-триазина, [Fe^{3+}-TPTZ], до интензивно плавог [Fe^{2+}-TPTZ] комплекса (апсорпциони максимум 593 nm) у киселој средини. 	FRAP (μmol/mmol Fe^{2+}/g или mgEFe^{2+}/g) алтернативно: (μmol Trolox/g, ако се резултат изражава у Trolox еквивалентима)	Benzie and Starin, 1996; Kranl et al., 2005
Способност хелирања јона гвожђа(II) ферозином - FIC тест (енг. *Ferrous Ion-Chelating*)	Принцип се заснива на инхибицији формирања љубичастог комплекса Fe^{2+}–ферозин у благо киселој средини (pH ≈ 6). Присутни хелатори везују Fe^{2+} и тако смањују апсорбанцу комплекса на 562 nm, што је пропорционално способности хелирања. 	EC_{50} (μg/cm^3 одн. mg/cm^3); или способност хелирања јона гвожђа (%); **опционо**, ако се пореди са стандардом попут етилендиаминтетрасирћетне киселине – EDTA (енг. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) (mg EDTA/g или μmol EDTA/g)	Dinis et al., 1994; Selvakumar et al., 2011; Gulçin et al., 2004.

Наставак Табеле 2.6

Ферцијанидна метода редукционе моћи (метода Пруског плавог – Редукциона способност – RP) (енг. *Reduction power*)	Антиоксиданси редукују калијум-ферицијанид у калијум-фероцијанид; након додавања Fe(III)-хлорида формира се комплекс „пруско плаво“, а интензитет боје се прати спектрофотометријски на 700 nm. Редукциона способност је најчешће изражена преко еквивалента стандарда (нпр. гална киселина - GKE).  	Редукциона моћ (mg GKE/g) или A_{700} (—)	Jayaprakasha et al., 2008.
Антимикробна активност			
Микродилуциона метода	Узорци се припремају у виду серијских разблажења у течном хранљивом медијуму [за бактеријске сојеве Милер Хинтон бујон - МХБ (енг. *Mueller–Hinton broth*) одн. Сабуродекстрозни бујон – СДБ (енг. *Sabouraud Dextrose broth*) за квасце] (најчешће у микротитар плочама са 96-бунарчића), затим се додаје стандардизован инокулум тест-микроорганизма и смеша се инкубира у контролисаним условима. Након инкубације процењује се раст микроорганизма (визуелно и/или мерењем оптичке густине), а по потреби се користи индикатор вијабилности (нпр. тетразолијумска со→ обојени формазан ако има раста; ресазурин (плав)→ промена боје у ружичасту (резоруфин) која флуоресцира ако има раста) чија промена боје/флуоресценције указује на метаболичку активност ћелија. 	Минимална инхибиторна концентрација - МИК (енг. *Minimal Inhibitory Concentraition*) (μg/cm^3 или mg/cm^3); Минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација - МБК/МФК (енг. *Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration*) (μg/cm^3 или mg/cm^3)	Balouiri et al., 2016; Stojanović-Radić et al., 2012.
Антиинфламаторна активност			
Инхибиција денатурације протеина (албумин говеђег серума – BSA, енг. *Bovine Serum Albumine*)	Узорак се меша са раствором BSA, а затим се протеин подвргава денатурацији. Денатурација доводи до пораста мутноће, што се квантификује мерењем апсорбанце (у зависности од протокола, најчешће 340 nm). Ако узорак има „протективни“ ефекат, он стабилизује протеин и смањује денатурацију/агрегацију, па је апсорбанца мања у односу на контролу.	Инхибиција денатурације (%) и/или EC_{50} (μg/cm^3)	Lavanya et al., 2010.

Наставак Табеле 2.6

Антихипергликемијска активност			
Инхибиција *α*-глукозидазе	Узорак се преинкубира са *α*-глукозидазом, а затим се додаје одговарајући супстрат. У присуству инхибитора опада брзина ензимске хидролизе, па се смањује формирање продукта. Код *α*-глукозидазе се најчешће прати ослобађање *p*-нитрофенола из *p*-нитрофенил-*α*-D-глукопиранозида (*p*NPG, енг. *p-nitrophenyl glucopyranoside*) (спектрофотометријски). Прати се ослобађање *p*-нитрофенола (A_{405}).  	EC_{50} (µg/cm^3) и/или проценат инхибиције *α*-глукозидазе (%)	Tadera et al., 2006.

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 Хемикалије и реагенси

Етанол (96% v/v, Reahem DOO), калијум бромид (KBr), спектроскопске чистоће, >99,9%, рутин (Merck, Darmstadt, Немачка); Folin-Ciocalteu реагенс, гална киселина, алуминијум(III)-хлорид хексахидрат ($AlCl_3 \times 6H_2O$), калијум-ацетат (CH_3COOK), натријум-карбонат (Na_2CO_3), 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикал, 2,2'-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) (ABTS)), калијум-персулфат ($K_2S_2O_8$), натријумова со 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4"-дисулфонске киселине (ферозин), етилен-диамино-тетра-сирћетна киселина (EDTA), 2,4,6-трис(2-пиридил)-S-триазин (TPTZ), *α*-глукозидаза (Тип I, лиофилизовани прах, ≥10 јединица), гвожђе(III)-хлорид хексахидрат ($FeCl_3 \times 6H_2O$), калијум-ферицијанид $K_3[Fe(CN)_6]$, бутиловани хидрокси-толуен (BHT), бутиловани хидрокси-анизол (BHA), 2,3,5-трифенилтетразолијум-хлорид (TTC); албумин говеђег серума (BSA), диклофенак натријум (Sigma Aldrich Chemical Company, St. Louis, SAD); хлороводонична киселина (HCl), глацијална сирћетна киселина (CH_3COOH), безводни натријум-сулфат (Na_2SO_4), калијум хидроксид (KOH) (Zorka Pharma-Hemija DOO); метанол UHPLC степена чистоће (*eng. Ultra Gradient HPLC Grade*), амонијум хлорид (NH_4Cl), сумпорна киселина (H_2SO_4), фенофталеин, гвожђе(II)-хлорид тетрахидрат ($FeCl_2 \times 4H_2O$), трихлорсирћетна киселина (TCA) (J.T. Baker, VA Deventer, Netherlands); гвожђе(II)-сулфат хептахидрат ($FeSO_4x7H_2O$), натријум ацетат-3-хидрат ($CH_3COONax3H_2O$) (Centrohem DOO, Стара Пазова); вода (HPLC gradient grade, Fisher Scientific, UK); мравља киселина 99% (Carlo Erba Reagenti S.p.A., Rodano, MI, Italia); *p*-нитрофенил-*α*-D-глукопиранозид (PNP-G) (Thermo Scientific™-Acros Organics, Switzerland); *β*-циклодекстрин (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Belgium); 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрин (Alfa Aesar, Thermo Scientific Chemicals, Немачка); деутеријум оксид (D_2O, 99,9%); деутерисани хлороформ ($CDCl_3$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); Милер-Хинтон агар, Сабуро-декстрозни агар ((HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Thane, Maharashtra, India).

3.2 Биљни материјал

За истраживања је коришћен комерцијални узорак плода црног бибера са српског тржишта (*Piper nigrum* L.; земља порекла: Вијетнам; паковано од стране "SOLUNAC GYROS I ZAČINI TOP", Угриновачки пут, део 25-бр. 32, Земун, Алтина). Биљни материјал је био заштићен од светлости и чуван у оригиналном паковању, на собној температури. Непосредно пре анализе, биљни материјал је самлевен у електричном млину (лабораторијски електрични млин "BRAUN AROMATIC KSM2").

3.2.1 Технолошке карактеристике биљне сировине

3.2.1.1 Одређивање садржаја влаге у биљном материјалу

Садржај влаге у биљном материјалу је одређен гравиметријски, у сушници. Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (1 g) је сушен на 105 °C до константане масе. Из разлике маса несушеног и сушеног биљног материјала одређен је садржај влаге и изражен у g/100 g биљног материјала.

3.2.1.2 Одређивање коефицијента бубрења

Бубрење представља способност биљног материјала да у контакту са растварачем повећава своју масу и запремину, што је описано апсорпционим коефицијентом бубрења *K*.

Коефицијент апсорпционе способности (коефицијент бубрења) биљне сировине је одређен по формули (j-на 3.1):

$$K = \frac{P_2}{P_1} \tag{3.1}$$

где је:

P_2 – маса биљне сировине након бубрења

P_1- маса биљне сировине пре бубрења

Самлевени биљни материјал (1 g) је одмерен у алуминијумским контејнерима и натопљен дестилованом водом. Овако преливен биљни материјал је остављен да набубри у одређеним временским интервалима (0-120 min). Након бубрења биљни материјал је

одвојен од преостале воде и измерена маса набубрелог материјала, након чега је одређен коефицијент бубрења.

3.2.1.3 Одређивање густине биљне сировине

Под релативном густином сировине подразумева се однос густине биљног ткива и густине воде, а одређује се по формули (j-на 3.2):

$$d_y = \frac{m}{V} = \frac{m_1}{\frac{(m_2 - m_3)}{\rho_0}} = \frac{m_1}{(m_2 - m_3)} \times \rho_0 \qquad (3.2)$$

где је:

m_1 – маса биљног материјала, g;

m_2 – маса пикнометра напуњеног дестилованом водом са биљним материјалом поред на тасу ваге, g;

m_3 – маса пикнометра напуњеног измереним биљним материјалом и допуњеног дестилованом водом, g;

ρ_0 – густина воде, g/cm^3.

3.2.1.4 Одређивање запреминске и насипне масе, шупљикавости и порозности биљног материјала

Запреминска маса (d_0) самлевеног биљног материјала одређена је тако што је измерен 1 g биљног материјала и убачен у градуисани цилиндар у коме је претходно сипано 15 cm^3 95%-ог етанола, при чему је измерено повећање запремине етанола (ΔV). Запреминска маса је израчуната по формули (j-на 3.3):

$$d_0 = \frac{m}{\Delta V} \qquad (3.3)$$

Насипна маса (d_n) је одређена слободним насипањем измерене количине биљног материјала (m = 1 g) у градуисани цилиндар (10 cm^3) и мерењем запремине (V) коју заузима биљни материјал. Насипна маса је израчуната по формули (j-на 3.4):

$$d_n = \frac{m}{V} \qquad (3.4)$$

Порозност (P_m) представља празан простор између честица самлевеног биљног материјала, а израчунава се по формули (j-на 3.5):

$$P_m = \frac{(d_y - d_0)}{d_y} \tag{3.5}$$

Шупљикавост (P_b) представља празан простор у биљној сировини, а израчунава се по формули (j-на 3.6):

$$P_b = \frac{(d_0 - d_n)}{d_0} \tag{3.6}$$

3.2.1.5 Одређивање гранулометријског састава

Величина честица биљног материјала је одређена гранулометријском анализом, тј. анализом сејања и израчунавањем средњег пречника честица по формули (j-на 3.7):

$$\frac{100}{d_{sr}} = \sum\left(\frac{m_i}{d_i}\right) \tag{3.7}$$

где је: m_i-масени проценат i-те фракције (%); d_i – средњи пречник i-те фракције (mm).

За гранулометријску анализу је коришћен сет лабораторијских сита са тресилицом (LABDEX LTD., UK) (Слика 3.1). Биљни материјал који се просејава сипан је у тањем слоју на прво сито са највећим отвором (1,32 mm) и затворен поклопцем. Испод овог формиран је сет сита чији се промер смањује (1 mm, 0,8 mm, 0,63 mm, 0,5 mm, 0,4 mm и 0,1 mm) са прихватним судом на дну. Укључена је тресилица, а просејавање је подешено на 15 минута. Након просејавања је измерена маса сваке фракције, одређени масени удели појединих фракција и средњи пречник честица.



Слика 3.1 Лабораторијска сита са тресилицом

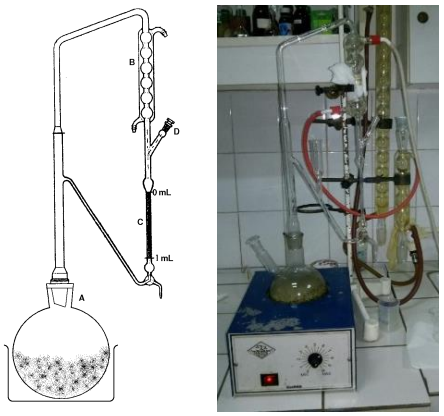
3.2.2 Одређивање садржаја укупних екстрактивних материја у полазном биљном материјалу

Одмерена количина уситњеног и хомогенизованог биљног материјала (25 g) је смештена у екстракциони део апаратуре по Soxhlet-у. У прихватни суд је одмерено 250 cm^3 растварача (70% v/v етанола) и додато неколико стаклених куглица, ради равномернијег кључања. Екстракција је вршена на температури кључања растварача у току 360 минута. Растварач је уклоњен упаравањем на ротационом вакуум упаривачу на 50 °C. Добијени екстракт је сушен у вакуум сушници на 50 °C до константне масе и израчунат садржај укупних екстрактивних материја (УЕМ) у полазном биљном материјалу. Садржај УЕМ је изражен на 100 g биљног материјала (g УЕМ/100 g б.м.).

3.2.3 Одређивање садржаја етарског уља по Clevenger-у

Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (самлевени плод црног бибера, 50 g) је смештен у балон Clevenger-ове апаратуре, преливен са 500 cm^3 воде (однос биљног материјала и воде, хидромодул: 1:10 m/V*) и дестилисано етарско уље по стандардној Clevenger процедури у току 360 минута (Ph. Jug. V, 2000). По завршеној дестилацији, очитана је запремина етарског уља у мерној цеви Clevenger-овог наставка. Изоловано етарско уље је издвојено из мерне цеви након дестилације, сушено изнад безводног натријум-сулфата и чувано у тамној бочици у фрижидеру на +4 °C. Поступак је поновљен у наредне две хидродестилације и израчуната средња вредност ± с.д. садржаја етарског уља. Садржај етарског уља је изражен на 100 грама самлевеног биљног материјала (cm^3/100 g б.м.). Шематски приказ и апаратура за хидродестилацију етарских уља по Clevenger-у приказани су на Слици 3.2.

* m/V – однос масе биљног материјала (g) и запремине растварача (cm^3); параметар који дефинише солвомодул, односно количину растварача употребљену по јединици масе биљног материјала.



Слика 3.2 Шематски приказ и апаратура за хидродестилацију етарских уља по Clevenger-у

3.2.3.1 Одређивање релативне густине етарског уља

Густина етарског уља црног бибера одређена је према већ описаној методи у одељку *„3.2.1.3 Одређивање густине биљне* сировине", коришћењем пикнометра запремине 2 cm^3. Поступак одређивања спроведен је на исти начин као и код мерења релативне густине биљне сировине. Релативна густина етарског уља израчуната је као однос густине узорка и густине воде на истој температури применом формуле (3.2).

3.2.4 HS-SPME анализа испарљивих једињења у биљном материјалу

Анализа испарљивих једињења у биљном материјалу изведена је применом микроекстракције на чврстој фази - узорковање из гасовите фазе (HS-SPME). За екстракцију испарљивих једињења микроекстракцијом из гасовите фазе коришћен је SPME држач и влакно обложено стационарном фазом типа Divinylbenzene/Polydimethylsiloxane//Carbon Wide Range/Polydimethylsiloxane (DVB/PDMS//Carbon WR/PDMS) дебљине 80 μm (50//30 μm) произвођача Supelco (Bellefonte, PA, USA). Влакно је пре прве употребе кондиционирано по упутству произвођача (1 h на температури од 250 °C).

У бочици од амбер стакла запремине 25 cm^3 одмерен је 1 g самлевеног плода црног бибера. Бочица је затворена гуменим затварачем и омотана парафилмом. SPME влакно је унешено у гасну фазу (енг. „headspace") узорка а испарљива једињења су екстрахована током 5 минута на собној температури (25 °C). Адсорбована једињења су

десорбована током 10 минута увођењем игле SPME шприца у split/splitless инјектор гасног хроматографа загрејаног на температури од 220 °C у 600:1 split modu и даље анализирани GC/MS и GC/FID методама.

3.3 Методе изолације и карактеризације етанолних екстраката

3.3.1 Технике екстракције

3.3.1.1 Екстракција мацерацијом

Одређен је утицај концентрације етанола и солвомодула (однос биљни материјал/растварач, m/V) на принос УЕМ у току процеса екстракције мацерацијом на собној температури (25 °C).

3.3.1.1.1 Утицај оперативних услова на принос УЕМ

Утицај концентрације етанола. Одмерена количина уситњеног и хомогенизованог биљног материјала (2 g) преливена је растварачем (10%, 30%, 50%, 70% и 96% v/v етанол) у односу 1:15 m/V (30 cm^3) и вршена екстракција УЕМ мацерацијом у току 180 минута на собној температури (Слика 3.3).



Слика 3.3 Утицај концентрације етанола на принос УЕМ

Течни екстракт је одвојен филтрацијом на Büchner-овом левку. Принос укупних екстрактивних материја (суви екстракт) одређен је гравиметријском методом. Аликвоти запремине 2 cm^3 сушени су у сушници на 105 °C до константне масе. Принос УЕМ израчунат је на основу садржаја сувог остатка и изражен на 100 g биљног материјала (g УЕМ/100 g б.м.).

Утицај солвомодула. Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (2 g) преливен је 70% v/v етанолом при различитим солвомодулима (однос биљни материјал/растварач, m/V) (1:5 m/V, 1:10 m/V, 1:15 m/V, 1:20 m/V и 1:25 m/V) и вршена екстракција УЕМ у току 180 минута на собној температури (Слика 3.4).



Слика 3.4 Утицај солвомодула на принос УЕМ

Течни екстракт је одвојен од биљног материјала и одређен принос УЕМ према поступку описаном у делу „*Утицај концентрације етанола*“.

3.3.1.2 Екстракција уз рефлукс

Утицај температуре и времена екстракције на принос УЕМ. Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (2 g) преливен је 70% v/v етанолом при солвомодулу 1:10 m/V и вршена екстракција УЕМ уз рефлукс, у току 120 и 180 минута на различитим температурама (40 °C, 50 °C и температури кључања). Течни екстракт је одвојен од биљног материјала и одређен принос УЕМ према поступку описаном у делу „*Утицај концентрације етанола*“.

3.3.1.3 Кинетика екстракције УЕМ мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс

Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (2 g) преливен је 70% v/v етанолом при солвомодулу 1:10 m/V и вршена је екстракција УЕМ на одабраним температурама (25 °C, 40 °C, 50 °C и температури кључања) у току 5–180 минута. За свако време екстракције рађена је посебна проба. Течни екстракт је одвојен од биљног материјала и

одређен је принос УЕМ у задатим временским интервалима према поступку описаном у делу „*Утицај концентрације етанола*“.

3.3.1.4 Ултразвучна екстракција

Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (2 g) преливен је 70% v/v етанолом при солвомодулу 1:10 m/V и вршена екстракција УЕМ у току 60 минута на собној температури у термостатираном ултразвучном купатилу (Sonic 4GT, Vims elektrik, Србија). Течни екстракт је одвојен од биљног материјала и одређен принос УЕМ према поступку описаном у делу „*Утицај концентрације етанола*“.

Праћена је кинетика екстракције УЕМ у задатим временским интервалима (5-60 минута). За свако време екстракције рађена је посебна проба.

3.3.1.5 Soxhlet екстракција

Одмерена количина уситњеног и хомогенизованог биљног материјала (25 g) је пажљиво спакована у чауру од филтер папира и убачена у екстракциони део апаратуре по Soxhlet-у. У прихватни суд је одмерено 250 cm^3 растварача (70% v/v етанол) и додато неколико стаклених куглица, ради равномернијег кључања (Слика 3.5).



(а) (б) (в)

Слика 3.5 Soxhlet екстракција: (а)-почетак екстракције; (б)-након 180 min; и (в)-након 240 min екстракције

За одређивање приноса УЕМ (сувог екстракта) вршено је узорковање по 2 cm^3 екстракта у задатим временским интервалима (15–240 минута) и праћена кинетика

екстракције УЕМ. Принос УЕМ одређен је гравиметријском методом у сушници на температури од 105 °C. Принос УЕМ (g/100 g б.м.) израчунава се на основу садржаја сувог остатка.

3.3.2 Моделовање кинетике екстракције

Моделовање кинетике екстракције УЕМ из плода црног бибера извршено је применом модела Пономарјева (Ponomarev, 1976) (модел А) и модела заснованог на нестационарној дифузији кроз биљни материјал (Veljković and Milenović, 2022) (модел Б). Кинетичке једначине (3.8 и 3.9) дате су следећим изразима:

Модел А:
$$\frac{(q_0 - q_i)}{q_0} = b + k \times t \tag{3.8}$$

Модел Б:
$$\frac{q_i}{q_0} = (1-b) \times e - k \times t; \qquad \ln\frac{q_i}{q_0} = \ln(1-b) - k \times t \tag{3.9}$$

где је: q_0 - садржај укупних екстрактивних материја у полазном биљном материјалу; q_i - садржај укупних екстрактивних материја у биљном материјалу после времена t; b - коефицијент периода брзе екстракције, k - коефицијент периода споре екстракције.

3.3.3 Хемијски састав изолованих екстраката

3.3.3.1 Одређивање садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола у екстрактима црног бибера одређен је спектрофотометријски, по процедури Folin-Ciocalte-a, са одређеним модификацијама (Singleton and Rossi, 1965; Singh et al., 2007; Kahkohen et al., 1999; Stanojević et al., 2008).

У 0,5 cm^3 екстракта (0,2 mg/cm^3) или стандарда галне киселине (0,00625− 0,2 mg/cm^3, за одређивање калибрационе криве) додато је 4,5 cm^3 дестиловане воде (Слика 3.6). Слепа проба уместо узорка садржи дестиловану воду. Растворима узорака додат је Folin-Ciocalteu реагенс за феноле (0,5 cm^3), а затим након 5 минута и 5 cm^3 7% Na_2CO_3. Смеша је енергично мућкана и након инкубације од 90 минута на собној температури,

измерена је апсорбанца на 765 nm. На основу калибрационе криве галне киселине (ј-на 3.10) одређен је садржај укупних фенола:

$$A_{765} = -0{,}0112 + 7{,}34857 \times c \qquad (3.10)$$

где је: A_{765} - апсорбанца на 765 nm, c - концентрација галне киселине, mg/cm^3.

Укупни феноли су изражени као еквиваленти галне киселине по граму сувог екстракта, mg GKE/g c.e.



Слика 3.6 Одређивање садржаја укупних фенола у изолатима црног бибера

3.3.3.2 Одређивање садржаја укупних флавоноида

Садржај укупних флавоноида у екстрактима црног бибера је одређен спектрофотометријском методом са алуминијум (III)-хлоридом (Chang et al., 2002; Lin and Tang, 2007; Sharma et al., 2011) уз одређене модификације (Stanojević et al., 2013).

У 2 cm^3 екстракта (0,2 mg/cm^3) или стандарда рутина (0,005–0,1 mg/cm^3, за конструисање калибрацоне криве) додато је 0,1 cm^3 10% $AlCl_3 \times 6H_2O$, 0,1 cm^3 1M CH_3COOK и 2,8 cm^3 дестиловане воде (Слика 3.7). После инкубације од 40 минута на собној температури мерена је апсорбанца реакционе смеше на 415 nm у односу на слепу пробу (слепа проба уместо узорка садржи дестиловану воду). На основу калибрационе криве рутина (ј-на 3.11) одређен је садржај укупних флавоноида.

$$A_{415} = 0{,}0232 + 12{,}3585 \times c \qquad (3.11)$$

где је: A_{415} - апсорбанца на 415 nm, c - концентрација рутина, mg/cm^3.

Резултати су изражени као еквиваленти рутина по граму сувог екстракта, mg RE/g c.e.



Слика 3.7 Одређивање садржаја укупних флавоноида у изолатима црног бибера

3.3.3.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа екстраката плода црног бибера

Течна хроматографија ултрависоких перформанси комбинована са DAD детекцијом и масеном спектрометријом (UHPLC-DAD-MS/MS), примењена је за квалитативну анализу етанолних екстраката плода црног бибера, као и квантитативно одређивање садржаја пиперина у екстрактима.

За квалитативну анализу екстраката (0,5 mg/cm^3), коришћене су две UHPLC хроматографске методе раздвајања и то, за анализу ***фенолних једињења*** и за анализу ***пиперина и осталих алкалоида***. Сва раздвајања су спроведена на колини Hypersil gold C18 (50×2,1 mm, 1,9 μm) постављеној на 25 °C у термостату, применом Dionex Ultimate 3000 UHPLC+ хроматографа опремљеног кватернарном пумпом и дегасером, аутосемплером (који омогућава аутоматизовани унос узорка у колону) и DAD детектором, који је редно повезан са масеним спектрометром опремљеним електро-спреј јонизационим (ESI) извором и 3D јонском замком, LCQ Fleet Ion Trap (Thermo Fisher Scientific, SAD).

За анализу ***фенолних једињења*** мобилна фаза се састојала од смеше (A) воде и 0,1% v/v мравље киселине и (B) метанола и 0,1% v/v мравље киселине, при протоку од 0,250 cm^3/min. За хроматографско раздвајање коришћен је линеарни градијент: 0–2 min од 10 до 30% v/v (B), затим 35–40% v/v (B) током 4–5 минута и 60–90% v/v (B) током 8–11 минута. У интервалу од 11. до 14. минута примењен је изократски режим при 90% v/v фазе (B), затим је у периоду од 14. до 14,01 минута извршен повратак на 10% v/v фазе (B), након чега је анализа настављена у изократском режиму при 10% v/v фазе (B) до укупног времена елуирања од 20 минута. Запремина инјектирања била је 3×10^{-3} cm^3.

Апсорпциони UV-Vis спектри су снимљени помоћу DAD детектора у спектралном опсегу између 200 и 800 nm, постављеним на 4 детекционе таласне дужине, $\lambda_{det.}$, 280 nm, 320 nm, 360 nm и 410 nm, истовремено. Масена спектрометријска анализа је извршена помоћу LCQ 3D-јонске замке са електроспреј јонизацијом, у негативном режиму рада. Параметри –ESI-извора били су следећи: напон извора 4,5 kV, напон капиларе и сочива −41 V и −95 V, температура капиларе 350 °C, док је проток главног и помоћног гаса (струја азота) 32 и 8 арбитрарних јединица (au – енг. *arbitrary units*). За идентификацију пиперина по истој хроматографској методи, примењен је позитивни јонизациони режим (+ESI) са напоном извора од 5 kV, капиларним и напоном сочива 49 V и 115 V, температуром капиларе од 350 °C, са истим протоком главног и помоћног гаса (струја азота) од 32 и 8 au. Масени спектри свих детектованих пикова су добијени користећи потпуни масени MS спектар (у области *m/z* 100–1000), као и методу анализе одговарајућих фрагментационих MS/MS спектара који су добијени дисоцијацијом јона колизијом молекулских јона у струји хелијума (негативни – $[M-H]^-$ и позитивни – $[M+H]^+$), енергије (CID – енг. *Collision Induced Dissociation*) подешене на 30 eV. Поред молекулских $[M-H]^-$ јона, анализом су обухваћени и тзв. јони-адукти, тј. јони који уз молекулски јон садрже за себе „везан“ молекул који може потицати из елуента, као што је то молекул мрављe киселине који се неретко може наћи као саставни део молекулских јона код ESI-MS у негативном режиму јонизације ($[M-H+HCOOH]^-$).

За квалитативну анализу ***пиперина и осталих алкалоида*** у екстрактима, коришћена је друга хроматографска метода, са мобилном фазом која се састојала од смеше (A) воде и 0,1 % v/v мрављe киселине и (B) ацетонитрила и 0,1% v/v мрављe киселине. За хроматографско раздвајање коришћен је линеарни градијент при протоку од 0,250 cm^3/min: 10-30% v/v (B) прва 2 минута, затим 40-50% v/v (B) следећих 5-7 минута и 80-90% v/v (B) од 9 до 11 минута, праћен изократским режимом при 90% v/v (B) од 11. до 15. минута и 90-10 % v/v (B) од 15. до 15,01 минута, завршено изократским режимом са 10% v/v (B) до 20. минута. Запремина инјектирања била је 2×10^{-3} cm^3. Апсорпциони UV-Vis спектри су снимљени помоћу DAD детектора, у истом опсегу таласних дужина и истим вредностима детекције као и код анализе фенолних једињења. Масено-спектрометријска анализа је извршена помоћу LCQ 3D јонске замке са ESI јонизацијом у позитивном режиму рада. Параметри +ESI извора су истоветни са експерименталним условима коришћеним за анализу пиперина (описано у претходном пасусу). Масени, MS/MS спектри су снимани у опсегу *m/z* 130–1000. За фрагментационе експерименте, коришћена је метода дисоцијације јона колизијом у струји хелијума са

CID постављеном на 25 eV. Поред молекулских $[M+H]^+$ јона, анализом су обухваћени и други типови молекулског јона као што су: $[M]^+$, $[2M+H]^+$ и катјонизовани адукт-јони $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, који се често могу наћи као саставни део масених спектара код ESI-MS у позитивном режиму јонизације.

Програм Xcalibur (верзија 2.1) коришћен је за контролу параметара и рада инструмента, као и анализу добијених података. Сва једињења су идентификована, на нивоу претпоставке, а на основу одговарајућих спектралних карактеристика: апсорпционог UV-Vis спектра, детектованог молекулског јона у масеном MS спектру (на основу кога се може одредити молекулска маса једињења) и карактеристичне фрагментације у MS/MS спектру, поређењем са литературним подацима. Нека једињења су потпуно идентификована уз помоћ одговарајућих референтних стандарда.

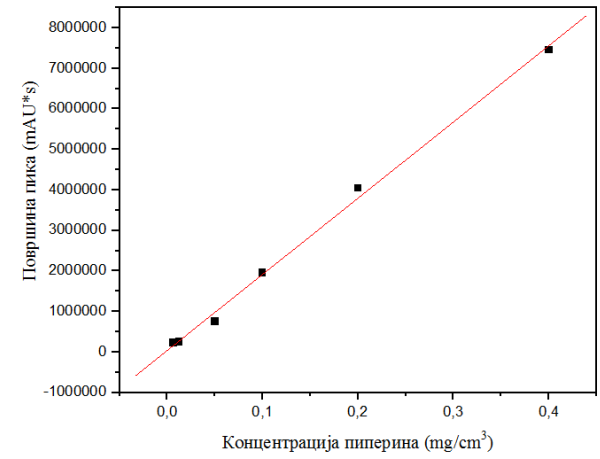
3.3.3.3.1 Квантитативна анализа пиперина у екстрактима

Квантитативна анализа, тј. садржај пиперина у екстрактима одређен је помоћу методе спољашњег стандарда, коришћењем површине испод пика који је идентификован као пик пиперина (на ≈10,70 мин), у хроматографској методи за анализу ***пиперина и осталих алкалоида***. Пик који потиче од пиперина праћен је са UHPLC-DAD сигнала хроматограма на таласној дужини детекције постављеној на 340 nm. Сви екстракти припремљени су у концентрацијама од 0,5 mg/cm^3. За одређивање концентрације пиперина у екстрактима, припремљени су стандардни раствори пиперина у метанолу (Слика 3.8), у опсегу концентрација од 0,00625 до 0,4 mg/cm^3, након чега је конструисана калибрациона крива пиперина, изражена једначином праве (ј-на 3.12):

$$y = 35944{,}49051 + 1{,}88013 \times 10^7 \times x \quad (R^2=0{,}997) \tag{3.12}$$

где је: y - површина пика пиперина DAD хроматограма на 340 nm; x – позната концентрација пиперина, mg/cm^3

За анализу добијених резултата и конструисање калибрационе криве, коришћен је програм ORIGIN 6.0.



Слика 3.8 Калибрациона крива пиперина у метанолу

3.3.4 Биолошке активности екстраката

3.3.4.1 Антиоксидативна активност екстраката

3.3.4.1.1 DPPH тест

Направљена је серија разблажења етанолних екстраката различитих концентрација 0,0039-0,5 mg/cm^3. Етанолни раствор DPPH радикала (1 cm^3, 3×10^{-4} mol/dm^3) је додат у 2,5 cm^3 екстраката различитих концентрација. Након инкубације од 20 минута на собној температури, у мраку, мерена је апсорбанца на 517 nm (A_U). Апсорбанца на 517 nm је одређена и за чист етанолни раствор DPPH радикала разблажен у наведеном односу (1 cm^3 DPPH радикала дате концентрације + 2,5 cm^3 етанола) (A_K), и за узорке пре третирања DPPH радикалом (2,5 cm^3 екстракта + 1 cm^3 етанола) (A_B) (Слика 3.9). Етанол је коришћен као слепа проба.



Слика 3.9 Одређивање антиоксидативне активности екстраката плода црног бибера применом DPPH теста

Степен неутралисања слободних радикала се израчунава по следећој формули (3.13) (Stanojević et al., 2013):

$$\text{Капацитет неутралисања DPPH радикала (\%)} = 100 - \left[\left(A_U - A_B \right) \times \frac{100}{A_K} \right] \qquad (3.13)$$

3.3.4.1.2 ABTS тест

ABTS радикал катјон (ABTS•+) настаје у реакцији ABTS раствора (7×10^{-3} mol/dm^3) са 2,4 mM $K_2S_2O_8$ (1:1 v/v), у току 12-18 h, на +4 °C, у мраку („stock“ раствор). Након формирања радикала, направљен је радни раствор ABTS тако што је „stock“ раствор разблажен етанолом до постизања вредности апсорбанце од 0,7 на 734 nm.

Направљена је серија разблажења етанолних екстраката различитих концентрација (0,0156-9,1 mg/cm^3 за екстракт добијен мацерацијом на 25 °C; 0,0156-10 mg/cm^3 за екстракте добијене екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, екстракцијом уз рефлукс на температури кључања и Soxhlet екстракцијом; 0,0156-12,1 mg/cm^3 за екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на 50 °C; 0,0156-9,8 mg/cm^3 за екстракт добијен ултразвучном екстракцијом). У 0,1 cm^3 узорка различитих концентрација додато је 1,8 cm^3 ABTS радног раствора и 2,1 cm^3 етанола и мерена апсорбанца реакционе смеше на 734 nm (A_U) након 6 минута инкубације у мраку, на собној температури. Апсорбанца на 734 nm је одређена и за чист радни раствор ABTS разблажен у наведеном односу (1,8 cm^3 ABTS радикала дате концентрације коме је додато 2,2 cm^3 етанола) (A_K), и за узорак пре третирања ABTS радикалом (0,1 cm^3

узорка коме је додато 3,9 cm^3 етанола) (A_B) (Слика 3.10). Етанол је коришћен као слепа проба.



Слика 3.10 Одређивање антиоксидативне активности етанолних екстраката плода црног бибера применом ABTS теста

Проценат инхибиције ABTS радикала, тј. ABTS „scavenging“ активност изражава се као проценат неутралисања ABTS радикала и израчунава према формули (ј-на 3.14), идентичној оној која се користи за израчунавање капацитета хватања слободних DPPH радикала (Dudonne et al., 2009; Dimitrijević et al., 2015).

$$\text{Капацитет неутралисања ABTS радикала (\%)} = 100 - \left[\left(A_U - A_B \right) \times \frac{100}{A_K} \right] \qquad (3.14)$$

3.3.4.1.3 FIC тест (Способност хелирања јона гвожђа)

Способност хелирања јона гвожђа екстрактима црног бибера одређена је у складу са методом коју су описали Dinis и сарадници (Dinis et al., 1994) са извесним модификацијама (Selvakumar et al., 2011; Gulçin et al., 2004).

Растворима узорака различитих концентрација (0,0156-2 mg/cm^3) (1 cm^3) додато је 3,75 cm^3 етанола и 0,05 cm^3 2 mM $FeCl_2 \times 4H_2O$. Реакција је иницирана додавањем 0,2 cm^3 5 mM ферозина **(**Слика 3.11). Смеша (A_U) је инкубирана на собној температури у току 10 min и мерена апсорбанца на 562 nm. Смеша етанола, ферозина и $FeCl_2 \times 4H_2O$ без тест узорка се користи као контрола (A_K), а смеша етанола и узорка без ферозина и $FeCl_2 \times 4H_2O$ као бланк (A_B). Етилендиаминтетрасирћетна киселина (EDTA) је коришћена као референтни стандард за тест у концентрацијама 0,0156 - 0,2 mg/cm^3. Етанол је коришћен као слепа проба.



Слика 3.11 Способност хелирања јона гвожђа етанолним екстрактима плода црног бибера

Способност хелирања јона гвожђа, FIC активност (%) је рачуната применом једначине (ј-на 3.15):

$$\text{Способност хелирања јона гвожђа (\%)} = 100 - \left[\left(A_U - A_B \right) \times \frac{100}{A_K} \right] \qquad (3.15)$$

3.3.4.1.4 FRAP тест

Антиоксидативна активност екстраката црног бибера применом FRAP теста одређена је по методи Benzie-a и Strain-a (1996) са одређеним модификацијама.

Стандардна крива. FRAP реагенс припремљен је од ацетатног пуфера (300 mmol/dm^3, pH = 3,6), 2,4,6-трис(2-пиридил)-s-триазина (TPTZ реагенса) (10 mmol/dm^3 у 40 mmol/dm^3 HCl) и гвожђе (III) хлорида хексахидрата ($FeCl_3 \times 6H_2O$) (20 mmol/dm^3) у односу 10:1:1. Одмерено је 3 cm^3 FRAP реагенса у пет епрувета и њима додато по 0,1 cm^3 стандардних раствора гвожђе (II) сулфата хептахидрата ($FeSO_4 \times 7H_2O$) (0,2-1 mmol/dm^3). Апсорбанца је мерена на 593 nm у односу на слепу пробу (3 cm^3 FRAP реагенса + 0,1 cm^3 воде). Калибрациона крива је конструисана на основу познатих концентрација и измерених вредности апсорбанци (Слика 3.12).



Слика 3.12 Калибрација $FeSO_4 \times 7H_2O$ на основу познатих концентрација и измерених вредности апсорбанци

Поступак одређивања антиоксидативне активности. У сваку епрувету је додато по 0,1 cm^3 различитих екстраката црног бибера и 3 cm^3 FRAP реагенса и након 30 min (на 37 °C на воденом купатилу) је мерена апсорбанца на 593 nm, у односу на слепу пробу (3 cm^3 FRAP реагенса + 0,1 cm^3 растварача који је коришћен за припрему узорка) (Слика 3.13). Концентрација (mmol/dm^3) Fe^{2+} еквивалената у сваком узорку очитана је директно са калибрационе криве која је дата једначином (ј-на 3.16):

$$A_{593} = 0{,}03521 + 0{,}59495 \times c, \quad R^2 = 0{,}9934 \tag{3.16}$$

где је A_{593} - апсорбанца измерена на таласној дужини од 593 nm која одговара интензитету плаво обојеног Fe^{2+}–TPTZ комплекса, c - означава концентрацију Fe^{2+} еквивалената у анализираном раствору, изражену у mmol/dm^3, а прерачунава се на масу сувог екстракта (mg EF^{2+}/g с.е., или mmol Fe^{2+}/g с.е.). Ова вредност се назива FRAP вредност.



Слика 3.13 Одређивање антиоксидативне активности екстраката плода црног бибера применом FRAP теста

3.3.4.1.5 Ферицијанидна метода (Редукциона способност јона гвожђа)

Редукциона способност – RP (енг. *Reduction power*) екстраката црног бибера и галне киселине, као стандардне антиоксидативне компоненте, одређена је према методи по Oyaiz-y (1986) са одређеним модификацијама.

Стандардна крива. Направљени су стандардни раствори галне киселине у опсегу концентрација 0,00625-0,1 mg/cm^3 и отпипетирано по 0,4 cm^3 стандардних раствора различитих концентрација у епруветама. Узорцима је додато по 1 cm^3 фосфатног пуфера (0,2 M, pH=6,6) и 1 cm^3 1%-ог калијум ферицијанида ($K_3[Fe(CN)_6]$) након чега су инкубирани у термостатираном воденом купатилу 20 минута на 50 °C. Након

инкубације, епрувете су охлађене и свим узорцима је додато по 1 cm^3 10% трихлоросирћетне киселине – TCA (енг. *Trichloroacetic acid*). Затим је у свим епруветама додато по 1 cm^3 дестиловане воде и 0,2 cm^3 $FeCl_3 \times 6H_2O$, и узорци остављени да се инкубирају 30 минута на собној температури (Слика 3.14). Након инкубације мерена је апсорбанца смеше у односу на слепу пробу (слепа проба уместо раствора галне киселине садржи етанол) на 700 nm. На основу познатих концентрација галне киселине и измерених вредности апсорбанци конструисана је калибрациона крива (ј-на 3.17):

$$A_{700} = 0{,}03883 + 22{,}94176 \times c \qquad R^2 = 0{,}9989 \tag{3.17}$$

где је: A_{700} - апсорбанца на 700 nm; c – концентрација галне киселине, mg/cm^3.



Слика 3.14 Калибрација стандардним растворима галне киселине (Ферицијанидна метода)

Поступак одређивања антиоксидативне активности. У 1 cm^3 фосфатног пуфера и 1 cm^3 $K_3[Fe(CN)_6]$ додато је 0,4 cm^3 екстракта бибера (0,2 mg/cm^3) чија се моћ редукције одређује. Смеша је инкубирана 20 минута на 50 °C. Након тога, додато је 1 cm^3 10% TCA, разблажено са 1 cm^3 дестиловане воде и додато 0,2 cm^3 раствора $FeCl_3 \times 6H_2O$. Након 30 минута инкубације на собној температури мерена је апсорбанца реакционе смеше на 700 nm у односу на слепу пробу (Слика 3.15).



Слика 3.15 Одређивање антиоксидативне активности екстраката плода црног бибера применом ферицијанидне методе

На основу измерених апсорбанци узорака, са калибрационе криве стандардног раствора галне киселине одређена је способност редукције јона Fe^{3+} у Fe^{2+}, а резултат је изражен као еквивалент галне киселине по граму сувог екстракта (mg GKE/g c.e.) и означен као RP вредност.

3.3.4.2 Антимикробна активност

3.3.4.2.1 Културе микроорганизама

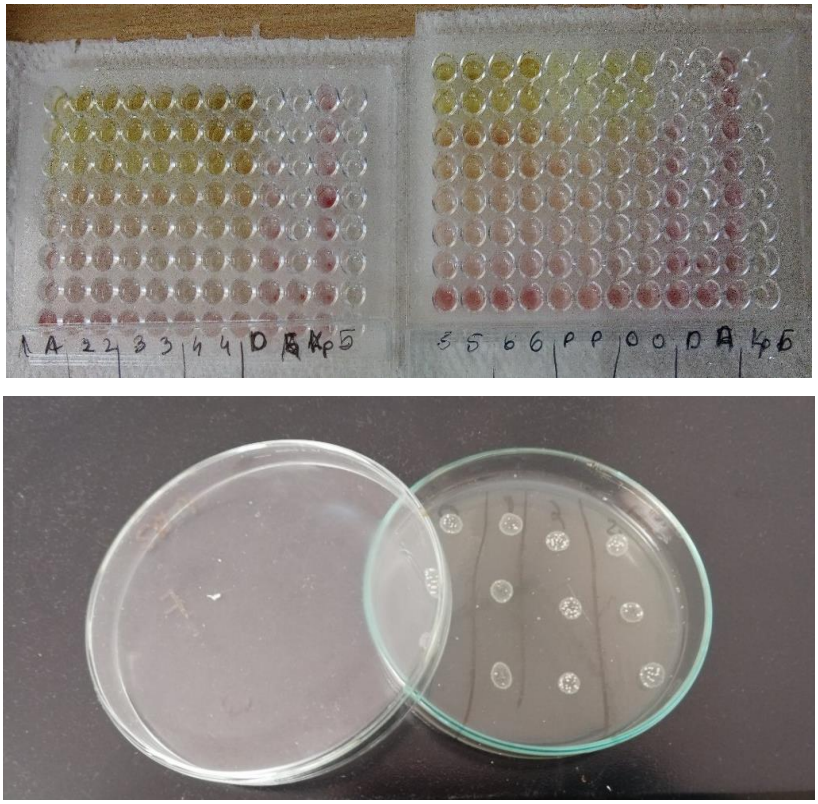
За одређивање антимикробне активности одабрани су представници клинички и санитарно значајних микроорганизама, и ATCC културе (енг. *American Type Culture Collection*) референтних сојева бактерија и гљива, и њихови изолати. Као Грам-позитивни микроорганизми коришћени су *Bacillus cereus* ATCC 11778 и *Bacillus cereus* изолат из хране, познати узрочници тровања храном (Stenfors Arnesen et al., 2008). Као Грам-негативне бактерије коришћене су *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella* изолат, *Escherichia coli* ATCC 8739 и *E. coli* изолат из хране, чести индикатори микробиолошке безбедности намирница и узрочници гастроинтестиналних инфекција (Forsythe, 2020). Као представници квасних гљива, анализирани су *Candida albicans* ATCC 24433 и *Candida albicans* изолат из фецеса, који се користе као модел-организми у одређивању антимикотичког дејства (Calderone and Fonzi, 2001).

3.3.4.2.2 Микродилуциона метода

За одређивање антимикробне активности екстраката црног бибера коришћена је метода микродилуције са извесним модификацијама, као што је описано раније (Слика 3.16) (Stanković et al., 2017). Минимална инхибиторна концентрација (МИК) одређена је методом серијских разблажења у микротитар плочама са 96 бунарића. Бактеријски сојеви коришћени у овој методи гајени су 18 h на 37 °C на Милер Хинтон агару – МХА (енг. *Mueller–Hinton agar*), док су квасци гајени на Сабуродекстрозном агару – СДА (енг. *Sabouraud Dextrose agar*) на 30 °C у лабораторији за микробиологију (Департман за биологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу). Ћелијска суспензија направљена је у стерилном физиолошком раствору. Турбидитет ћелија подешен је на 0,5 McFarland (турбидитет који одговара концентрацији микроорганизама од 10^8 ćelija/cm^3), коришћењем денситометра (DEN-1 McFarland Densitometer, Biosan). Финална густина инокулума подешена је на 10^6 CFU/cm^3 (енг. *colony forming units*– јединица за формирање колонија) у стерилном Милер Хинтон бујону (МХБ) и Сабуродекстрозној течној подлози (СДБ). Штокови раствора екстраката црног бибера направљени су у диметил сулфоксиду - DMSO (енг. *Dimethyl Sulfoxide*) и разређени у стерилном МХБ. Тестирана су серијска разређења узорака (фактор разређења 2x), а финални опсег концентрација у медијуму износио је 0,0976-12,5 mg/cm^3 за екстракте. Након припреме серијског разређења тестираног узорка додат је инокулум у бунариће и плоче су остављене на инкубацију 24 h на 37 °C. Највиша концентрација растварача DMSO је 5% (негативна контрола - претходно потврђена да не утиче на вијабилност ћелија). Као позитивна контрола коришћени су антибиотици хлорамфеникол (за *Salmonella* spp) и ципрофлоксацин (за *Bacilus cereus* и *Escherichia coli*) за бактерије и нистатин за квасце (за *Candida albicans*). Остављен је и неинокулисани бунарић са медијумом без додатка агенаса, како би се испитала његова стерилност.

Инхибиторна активност узорака је одређена методом видљивог раста, односно додавањем 0,02 cm^3 0,5% воденог раствора трифенилтетразолијум хлорида – ТТС (енг. *triphenyltetrazolium chloride*) у сваки бунарић, након чега су плоче остављене на инкубацију 30 минута. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) дефинисана је као најнижа концентрација узорка која инхибира видљиви раст микроорганизма (црвено обојени талог на дну бунарића након додатка ТТС). Минимална микробицидна (ММК), тј. бактерицидна/фунгицидна концентрација (МБК/МФК) дефинисана је као

најнижа концентрација анализираних узорака која убија 99,9% инокулисаних микроорганизама. Да би се одредила МБК/МФК, 0,01 cm^3 бујона из сваког бунарића без видљивог раста засејано је на хранљиви агар или Сабуродекстрозни агар, након чега су плоче инкубиране 24 сата на 37 °C. Сви експерименти су рађени у три понављања.



Слика 3.16 Одређивање антимикробне активности изолата црног бибера микродилуционом методом

3.3.4.3 Одређивање антихипергликемијске активности: Инхибиција α-глукозидазе

Тест инхибиције *α*-глукозидазе рађен је по методи коју су описали Apostolidis и сарадници (2007), са одређеним модификацијама (Apostolidis et al., 2007). Одговарајућим разблажењима бибера у DMSO (0,05 cm^3) додато је 0,2 cm^3 0,1M фосфатног пуфера (pH, 6,9), а затим и 0,05 cm^3 раствора *α*-глукозидазе (1,0 U/cm^3) у 0,1 M фосфатном пуферу (pH, 6,9). Смеше су инкубиране на 37 °C током 10 минута. Након тога, додато је 0,05 cm^3 5 mM раствора *p*-нитрофенил-*α*-D-глукопиранозида (*p*NPG), који представља супстрат. Смеше су затим поново инкубиране на 25 °C током 10 минута, након чега је очитана апсорбанца на 405 nm. Контрола се односи на реакциону

смешу припремљену по описаном поступку без узорка, а активност инхибитора *α*-глукозидазе одређена је мерењем жуто обојеног *p*-нитрофенола ослобођеног од *p*NPG на 405 nm. Проценат инхибиције *α*-глукозидазе анализираним узорцима изражена је следећом једначином (j-на 3.18):

$$\text{Инхибиција (\%)} = \frac{(A_K - A_U)}{A_K} \times 100\% \qquad (3.18)$$

Концентрација инхибитора (узорка) потребна за инхибицију 50% активности ензима под описаним условима је дефинисана као EC_{50} вредност.

3.3.4.4 Одређивање антиинфламаторне активности

3.3.4.4.1 Инхибиција денатурације албумина говеђег серума (BSA метода)

Одређивање инхибиције денатурације протеина спроведено је према методи Lavanya и сарадника (2010), уз одређене модификације. Водени раствор албумина говеђег серума (BSA, 5% w/v) је мешан са тестираним екстрактима (0,1 mg/cm^3), док су дестилована вода и диклофенак-натријум (0,1 mg/cm^3) коришћени као негативна и позитивна контрола, редом. Узорци су инкубирани на 37 °C, а затим и на 57 °C током одређеног временског периода. Након хлађења, у сваки узорак је додат фосфатни пуфер (pH = 6,3), након чега је измерена апсорбанца на 340 nm помоћу Multiskan Ascent No354 микроплејт читача (ThermoLabsystems, Финска). Проценат инхибиције денатурације протеина (%) израчунат је у односу на контролу, која представља 100% денатурацију протеина, а резултати су упоређени са ефектом диклофенак-натријума.

3.3.5 Одређивање садржаја микро- и макроелемената у етанолним екстрактима плода црног бибера ICP-OES методом

3.3.5.1 Реагенси и стандардни раствори

За разблаживање екстраката коришћена је дестилована вода пречишћена од стране Fisher Chemical (HPLC grade). Као носећи гас коришћен је Аргон 5,0 (чистоће 99,999%). Поред узорака за анализу раније су припремљени и калибрациони стандарди. За припрему раствора за калибрацију коришћен је Multistandard IV –

мултиелементарни стандардни раствор (Merck, WGK Germany) који је садржао Ag, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, и Zn, као и додатни стандардни раствори Si, P, Hg, и S (Reagecon, Ireland) у концентрацији од 1000 ppm. Припрема стандардних раствора за анализу одабраних елемената вршена је разблаживањем Multistandarda IV, тако да су концентрације стандарда за израду калибрационих дијаграма биле у опсегу очекиваних концентрација анализираних елемената. У Табели 3.1 приказане су одабране таласне дужине детекције за сваки елемент у екстрактима бибера, корелациони коефицијент (R^2), лимит детекције (LOD), као и опсег линеарности.

Табела 3.1 Оперативни услови при ICP-OES анализи

ICP-OES оперативни параметри	Вредност параметра
Снага плазме (W)	1400
Проток гаса (L/min)	
-*Coolant*	13
-*Auxiliary*	0.80
Тип небулајзера	Cross flow
Проток небулајзера (L/min)	0,95
Брзина пумпе (rpm)	30
Време стабилизације (s)	0
Број мерења по узорку	3
Положај плазме	Аксијалан

3.3.5.2 Узорковање и припрема узорака

Упарени етанолни екстракти плода црног бибера разблажени су дестилованом водом до концентрације од 0,5 mg/cm^3. Узорци су филтрирани кроз целулозне филтере (0,45 μм), а након припреме подвргнути ICP-OES анализи. Сва мерења су извршена на ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry, ARCOS FHE12, SPECTRO, Немачка) методом квантитативне анализе. Радни услови ICP-OES инструмента и параметри за одређивање концентрације одабраних елемената су дати у Табели 3.2.

Табела 3.2 Параметри калибрационе криве за одређиване елементе: λ, nm; R^2; LD (μg/dm^3) и опсег линеарности (mg/dm^3)

Назив елемента	Таласне дужине детекције (nm)	Корелациони коефицијент (R^2)	Лимит детекције (μg/dm^3)	Опсег линеарности (mg/dm^3)
Ag	224,641 328,068	0,99993 0,99995	0,39	$1{,}45\times10^{-2}$–12,00 $3{,}99\times10^{-4}$–12,00
B	182,641 249,773	0,99999 0,99999	6,43	$7{,}37\times10^{-3}$–12,00 $6{,}43\times10^{-3}$–12,00
Ba	233,527	0,99995	0,183	$1{,}83\times10^{-4}$–12,00
Bi	190,241 223,061	0,99991 0,99996	3,53	$3{,}53\times10^{-3}$–12,00 $3{,}68\times10^{-3}$–12,00
Ca	183,801 396,847	0,99995 0,99946	2,14	1,6–480,00 $2{,}14\times10^{-3}$–2,41
Cd	214,438	0,99994	0,127	$1{,}27\times10^{-4}$–12,00
Co	228,616	0,99980	0,327	$3{,}27\times10^{-4}$–12,00
Cr	283,563	0,99998	0,435	$4{,}35\times10^{-4}$–12,00
Cu	224,700 324,754	0,99999 0,99999	0,259	$9{,}07\times10^{-4}$–12,00 $2{,}59\times10^{-4}$–12,00
Fe	259,941	0,99997	0,118	$1{,}18\times10^{-4}$–12,00
In	325,609	1,00000	4	4×10^{-3}–12,00
K	404,721 766,491	0,99998 0,99999	0,378	0,798–300,00 $3{,}78\times10^{-4}$–1,20
Li	323,261 670,780	1,00000 0,99997	$5{,}75\times10^{-2}$	$7{,}98\times10^{-2}$–12,00 $5{,}75\times10^{-5}$–1,20
Mg	279,553 285,213	0,99997 0,99994	0,115	$1{,}15\times10^{-4}$–6,04 4,03–120,00
Mn	257,611	0,99992	$3{,}57\times10^{-2}$	$3{,}57\times10^{-5}$–12,00
Na	330,237 598,592	0,99994 0,99989	4,75	7,98–480,00 $4{,}75\times10^{-3}$–12,00
Ni	231,604	0,99994	0,474	$4{,}74\times10^{-4}$–12,00
P	214,914	0,99992	3,5	$3{,}5\times10^{-3}$–240,00
Pb	220,353	0,99998	1,78	$1{,}78\times10^{-3}$–12,00
Si	288,158	0,99998	1,6	$1{,}6\times10^{-3}$–120
Sr	407,771	0,99998	$6{,}23\times10^{-3}$	$6{,}23\times10^{-6}$–2,41
Tl	190,864	0,99998	1,72	$1{,}72\times10^{-3}$–12,00
Zn	213,856	0,99997	$8{,}2\times10^{-2}$	$8{,}2\times10^{-5}$–12,00
Hg	184,950	0,99939	0,626	$6{,}26\times10^{-4}$–6,00
S	180,731	1,00000	2,903	0,0029–24,00

3.4 Изолација и карактеризација олеорезина из плода црног бибера

3.4.1 Изолација олеорезина

Олеорезин је добијен према методи Borgesa и Pinoa, 1993 (Borges and Pino, 1993) уз одређене модификације (Kapoor et al., 2009). Самлевеном плоду црног бибера (20 g) додат је 96% v/v етанол (200 cm^3) и вршена екстракција по Soxhlet-у у току 180 минута. Добијени екстракт је профилтриран на Büchner-овом левку и остављен да одстоји 24 сата. Затим је извршено упаравање (концентровање) екстракта на вакуум упаривачу на температури од 60 ^oC, до потпуног уклањања растварача. Добијени олеорезин је уљаста течност, љутог је укуса јер садржи пиперин, пријатаног мириса који потиче од етарског уља бибера, мрке је боје.

3.4.2 Хемијски састав изолованог олеорезина

3.4.2.1 UHPLC-DAD-MS/MS анализа олеорезина

За квалитативну и квантитативну анализу олеорезина бибера примењена је метода течне хроматографије ултрависоких перформанси комбинована са DAD детекцијом и масеном спектрометријом за анализу ***пиперина и сличних једињења*** (UHPLC-DAD-MS/MS), чији је поступак детаљно описан у одељку „*3.3.3.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа екстраката плода црног бибера*“. Узорци олеорезина припремљени су у концентрацији од 0,5 mg/cm^3 растварањем у метанолу. Анализа је спроведена у позитивном јонизационом режиму, при чему је испитивано присуство пиперина и осталих пиперамида. Концентрација пиперина одређена је на основу калибрационе криве добијене из серије стандардних раствора пиперина у метанолу (0,00625–0,4 mg/cm^3, ј-на 3.12).

3.4.3 Биолошке активности изолованог олеорезина

3.4.3.1 Антиоксидативна активност

Антиоксидативна активност олеорезина бибера одређена је применом пет тестова: DPPH, ABTS, FIC, FRAP и ферицијанидне методе, према поступцима детаљно

описаним у одељку „*3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.1 Антиоксидативна активност екстраката*“. За сваки тест припремљене су серије разблажења олеорезина у етанолу у различитим концентрационим опсезима:

- ***за DPPH тест*** у концентрацијама 0,0125–0,5 mg/cm^3, време инкубације: без инкубације и 20 минута
- ***за ABTS тест*** у концентрацијама 0,078–5 mg/cm^3, време инкубације: 6 минута
- ***за FIC тест*** у концентрацијама 0,0156–2 mg/cm^3, време инкубације: 10 минута
- ***за FRAP*** тест у концентрацији од 0,5 mg/cm^3, време инкубације: 30 минута; резултати су изражени као mgEFe^{2+}/g олеорезина
- ***за ферицијанидну методу*** у концентрацији од 0,5 mg/cm^3, време инкубације: 30 минута; резултати су изражени као mg GKE/g олеорезина

3.4.3.2 Антимикробна активност

Антимикробна активност олеорезина бибера одређена је применом микродилуционе методе, према поступку детаљно описаном у одељку „*Биолошке активности екстраката - Антимикробна активност екстраката*“. Узорци олеорезина припремљени су у DMSO и разблажени у стерилном МХБ, а анализирани концентрациони опсег у медијуму је био од 0,0976–12,5 mg/cm^3.

3.4.3.3 Одређивање антихипергликемијске активности: инхибиција α-глукозидазе

Антихипергликемијска активност олеорезина бибера одређена је испитивањем инхибиторног дејства на ензим *α*-глукозидазу, према поступку детаљно описаном у одељку „*Биолошке активности екстраката - Антихипергликемијска активност екстраката*“ заснованом на методи коју су описали Apostolidis и сарадници (2007), са одређеним модификацијама. Узорци олеорезина припремљени су у DMSO и разблажени у фосфатном пуферу (pH 6,9) у концентрационом опсегу од 0,5–7,5 mg/cm^3.

3.5 Изолација и карактеризација масног уља

Масно уље црног бибера изоловано је применом екстракције по Soxhlet-у *n*-хексаном. Самлевеном плоду црног бибера (30 g) додат је *n*-хексан (300 cm^3) и вршена екстракција по Soxhlet-у за време од 180 минута. Након екстракције је извршено упаравање (концентровање) екстракта на вакуум упаривачу на температури од 50 ^oC, до потпуног уклањања растварача. Добијено масно уље није показало течну конзистенцију, већ је било у облику жуте пасте, љутог је укуса, пријатног мириса, мрко жуте је боје. Изолованом масном уљу одређен је киселински број и садржај воска.

3.5.1 Одређивање киселинског броја масног уља

Масти и уља никада нису неутралне, јер поред неутралних глицерида, садрже и одређену количину слободних масних киселина (СМК). Количина СМК се у мастима повећава стајањем и не може се одредити директно, већ се титрацијом раствора одређује количина базе потребна за њихову неутрализацију. У сув ерленмајер одмерено је 3-5 g уља додато 40-50 cm^3 смеше етанола и диетил-етра (1:1 v/v) претходно неутралисане 0,l mol/dm^3 раствором NaOH уз фенолфталеин (смеша етанол-диетил-етар се мора претходно неутралисати јер диетил-етар може да реагује кисело, па би се један део базе утрошио на неутрализацију киселина из етра). Садржај се мућка до потпуног растварања масти. Затим је додато 5 капи фенолфталеина и титрисано 0,1 mol/dm^3 NaOH до појаве ружичасте боје, која не ишчезава после 1 min. Садржај слободних масних киселина се изражава као киселински број и киселински степен, или у процентима олеинске киселине где 1 cm^3 1M rastvora алкалних хидроксида одговара 0,2823 g олеинске киселине. Киселински број (*Kb*) представља број mg KOH који је потребан за неутрализацију СМК у g масти или уља. Киселински степен (*Ks*) означава број cm^3 1 mol/dm^3 раствора алкалних хидроксида потребних за неутрализацију СМК у 100 g масти. Kb и Ks се израчунавају према формулама (j-на 3.19 и j-на 3.20) (Stanojević et al., 2017):

$$K_b = \frac{A \times 5{,}61}{Ok} \tag{3.19}$$

$$K_s = \frac{A \times 100}{Ok \times 10} \tag{3.20}$$

где је: *А* – запремина (cm^3) 0,1 mol/dm^3 раствора NaOH утрошеног приликом титрације; *Ок* – одмерена количина узорка у g.

3.5.2 Одређивање садржаја воска у масном уљу

Садржај воска у масном уљу одређен је гравиметријском методом таложења помоћу ацетона, према поступку Burger (1981), са одређеним модификацијама у складу са количином узорка и условима експеримента.

У претходно тарирану стаклену бочицу додато је 1 g узорка уља, затим 7 cm^3 петролетра и 22 cm^3 ацетона, уз интензивно мешање стакленим штапићем до потпуног растварања узорка. Добијени раствор је стављен у замрзивач на –20 °C и остављен 24 h ради потпуног таложења восковитих компоненти. Након хлађења, узорак је филтриран преко Büchner-овог левка. За испирање талога коришћена је смеша ацетона и петролетра (3:1). Након филтрације, филтер са талогом је осушен до константне масе у сушници на собној температури под струјом ваздуха. Разлика између масе након сушења и почетне масе у бочици представља масу талога воска у 1 g узорка уља.
Садржај воска је израчунат према формули (ј-на 3.21):

$$\text{Садржај воска (\%)} = (m_1 - m_0) \times 100 \qquad (3.21)$$

где је:
m_1– маса бочице са талогом након сушења (g),

m_0– маса празне бочице (g).

3.5.3 Добијање метил-естара масних киселина

Метил-естри масних киселина (МЕМК) су добијени коришћењем модификованог конвенционалног поступка метиловања који је претходно описан од стране Hartman и Lago (1973): 500 mg изолованог масног уља премештено је у балон од 50 cm^3, и сапонификовано са 5 cm^3 0,5 N метанолног раствора NaOH, уз повратни хладњак и мешање на магнетној мешалици, на темепратури кључања у трајању од 3-5 минута. Након тога, мешање је прекинуто, а врућем садржају је додато 15 cm^3 естерификационог реагенса (преко хладњака) при чему је остављен да кључа 3 минута. Естерификациони реагенс је припремљен тако што је 2 g амонијум хлорида (NH_4Cl)

додато у 60 cm^3 метанола, након чега је додато 3 cm^3 концентроване сумпорне киселине (H_2SO_4), а затим је смеша загревана уз рефлукс 15 минута.

Садржај је након естерификације пребачен у левак за одвајање, где је додато 25 cm^3 петролетра (50-60 ºC) и 50 cm^3 воде. Садржај је промешан при чему је очекивано да се метил-естри издвајају у петролетарској фази. Петролетарски слој је затим испран још два пута са по 25 cm^3 воде, након чега је растварач уклоњен отпаравањен на вакуум упаривачу (KIKA-WERKE, Staufen, Немачка). Овако припремљени метил-естри су даље анализирани течном хроматографијом (HPLC) у циљу одређивања њиховог састава.

3.5.4 FT-IR анализа масног уља

Инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом (FT-IR) анализа масног уља, снимљена је техником танких транспарентних пастила, мешањем 1 mg узорка са 150 mg калијум-бромида (KBr), вакумирањем и пресовањем под притиском од око 200 MPa. Снимање је вршено на FT-IR спектрофотометру BOMEM MB-100 (Hartmann & Braun, Канада) у области таласних бројева 4000-400 cm^{-1}, при резолуцији 2 cm^{-1}. Обрада спектара је изведена применом софтвера Win-Bomem Easy.

3.5.5 HPLC анализа масног уља и метил естара

Анализа масног уља и метил-естара масног уља течном хроматографијом високих перформанси (HPLC) је рађена на хроматографу серије Agilent 1100 опремљеним дегасером, бинарном пумпом, термостатираном колоном и DAD детектором. Узорци масног уља и добијених метил естара су растворени у смеши 2-пропанол/*n*-хексан (5:4 v/v). Сви растварачи и узорци су филтрирани кроз Milipore филтер од 0,45 μm. Запремина инјектираног узорка била је 0,02 cm^3, и раздвајање је извршено на колони Zorbax Eclipse XDBC18 (4,6×150 mm, 5 μm), уз проток бинарне смеше растварача: метанол (растварач A) и смеша 2-пропанол/*n*-хексан (5:4 v/v) (растварач B) од 1 cm^3min^{-1} са линеарним градијентом од 100% A do 40% A + 60% B za 15 min. Температура колоне је била 40 °C. Компоненте су детектоване на 205 nm и 344 nm.

3.5.6 UHPLC-DAD- MS/MS анализа метил естара

За квалитативну и квантитативну анализу метил естара масног уља бибера примењена је метода течне хроматографије ултрависоких перформанси комбинована са DAD детекцијом и масеном спектрометријом (UHPLC-DAD-MS/MS) за анализу ***пиперина и осталих алкалоида***, чији је поступак детаљно описан у одељку „*3.3.3.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа екстраката плода црног бибера*“. Узорци метил естара припремљени су метанолу у концентрацији од 0,5 mg/cm^3. Анализа је рађена у позитивном јонизационом режиму. Концентрација пиперина у анализираном узорку одређена је на основу калибрационе криве добијене из серије стандардних раствора пиперина у метанолу (0,00625–0,4 mg/cm^3, j-на 3.12).

3.5.6 Биолошке активности изолованог масног уља

Антиоксидативна активност масног уља бибера одређена је применом DPPH теста према поступцима детаљно описаним у одељку „*3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.1 Антиоксидативна активност екстраката*“. Припремљене су серије разблажења масног уља у етанолу у концентрационом опсегу: 0,11719-15 mg/cm^3.

3.6 Методе изолације и карактеризације етарских уља и хидролата

3.6.1 Хидродестилација

3.6.1.1 Утицај хидромодула на кинетику хидродестилације и принос етарског уља из плода црног бибера

Уситњени и хомогенизовани биљни материјал (самлевени плод црног бибера, 50 g) је потопљен у балон за дестилацију Clevenger-ове апаратуре водом у односу 1:5 m/V. Етарско уље је дестилисано по поступку описаном у одељку „*3.2.3 Одређивање садржаја етарског уља по Clevenger-y*“. У току дестилације очитавана је запремина издвојеног уља у мерној цеви Clevenger-овог наставка после 5-240 минута и праћена зависност приноса етарског уља од времена. Принос етарског уља изражен је на 100 g биљног материјала (cm^3/100 g б.м.). Ова процедура је поновљена за хидромодуле 1:10

m/V, 1:15 m/V, 1:20 m/V, 1:25 m/V и 1:30 m/V. Изолована етарска уља су издвојена из мерне цеви након дестилације, сушена изнад безводног натријум-сулфата и чувана у тамним бочицама у фрижидеру на +4 °C. Сви експерименти рађени су у три понављања и добијени резултати представљени као средње вредности ± с.д.

3.6.1.2 Утицај самлевености биљног материјала на кинетику хидродестилације и принос етарског уља из плода црног бибера

Несамлевени плод црног бибера (50 g) потопљен је у балон за дестилацију Clevenger-ове апаратуре водом у односу 1:10 m/V. У току дестилације очитавана је запремина издвојеног уља у мерној цеви Clevenger-овог наставка после 5-240 минута и праћена зависност приноса етарског уља од времена. Етарско уље изоловано из несамлевеног плода црног бибера је издвојено из мерне цеви након дестилације, сушено изнад безводног натријум-сулфата и чувано у тамним бочицама у фрижидеру на +4 °C. Принос етарског уља изражен је на 100 g биљног материјала (cm^3/100 g б.м.). Експерименти су рађени у три понављања и добијени резултати представљени као средње вредности ± с.д.

3.6.2 Технике хидродестилације

За хидродестилацију етарског уља коришћене су две технике хидродестилације (Stanojević, 2004; Stanković et al., 2004; Stanojević et al., 2011) на Clevenger апаратури, при оптималним условима хидродестилације, дефинисаним анализама у одељку „*3.2.3 Одређивање садржаја етарског уља по Clevenger-у*“.

3.6.2.1 Техника I – Класична Clevenger- хидродестилација етарског уља са кохобацијом воденог дела дестилата

Уситњени и хомогенизовани плод црног бибера (30 g) потопљен је у балон за дестилацију Clevenger-ове апаратуре водом, при оптималном хидромодулу 1:10 m/V и етарско уље је дестилисано по стандардној процедури. У току дестилације очитавана је запремина издвојеног етарског уља у мерној цеви Clevenger-овог наставка после одређених временских интервала (0-240 min).

Након хидродестилације издвојена је водена фаза суспензије из балона за дестилацију (*хидролат*). Биљни материјал је одвојен од хидролата најпре филтрирањем кроз газу, а затим уз вакуум на Büchner-овом левку након чега је мерена запремина хидролата и исти коришћен за даље анализе.

3.6.2.1.1 Одвајање фракција етарског уља за одређена времена хидродестилације

Хидродестилација етарског уља је рађена по стандардној процедури (хидродестилација етарског уља са кохобацијом воденог дела дестилата) са 150 g биљног материјала при оптималном хидромодулу (1:10 m/V). Фракционисање етарског уља из плода црног бибера извршено је издвајањем фракција етарског уља у мерној цеви Clevenger-ове апаратуре за одређене временске интервале I (0-15 min), II (15-30 min), III (30-60 min), IV (60-90 min) и V (90-120 min). Изоловане фракције етарског уља издвојене из мерне цеви након дестилације, сушене су и чуване према поступку описаном у одељку „*3.2.3 Одређивање садржаја етарског уља по Clevenger-у*“.

3.6.2.2 Техника II – Хидродестилација етарског уља са коришћењем водене фазе суспензије из претходних хидродестилација за потапање биљног материјала у наредним хидродестилацијама

Ова техника хидродестилације подразумева Clevenger-хидродестилацију са коришћењем водене фазе суспензије (хидролата) из претходне дестилације за квашење биљног материјала у наредној дестилацији, уз допуну водом до одређеног односа биљног материјала и воде (хидромодул 1:10 m/V). У току дестилације очитавана је запремина издвојеног етарског уља у мерној цеви Clevenger-овог наставка после 5-240 минута. Поступак изолације етарског уља је понављан у наредне четири пробе хидродестилације. За сваку пробу дестилације коришћена је нова количина биљног материјала. Добијена етарска уља су сушена безводним натријум-сулфатом и коришћена за анализе.

Водене фазе суспензије (хидролати) из балона за дестилацију одвајане су на начин описан у одељку „*3.6.2.1 Техника I – Класична Clevenger- хидродестилација етарског уља са кохобацијом воденог дела дестилата*“ и исте су коришћене за даље анализе.

3.6.3 HS-SPME анализа испарљивих једињења у хидролатима

Анализа испарљивих једињења у хидролатима етарских уља изведена је применом микроекстракције на чврстој фази - узорковање из гасовите фазе (HS-SPME), према поступку детаљно описаном у одељку *„3.2.4 HS-SPME анализа испарљивих једињења у биљном материјалу“*.

У стаклену бочицу запремине 10 cm^3 одмерено је 2 cm^3 хидролата, затим је додато 0,5 g NaCl и магнет. Бочица је затворена гуменим затварачем и омотана парафилмом. Узорци су предекстраховани загревањем и мешањем 15 минута на 50 °C ради успостављања равнотеже између течне и гасовите фазе. Након тога, SPME влакно је уведено у *headspace* узорка, а испарљива једињења су екстрахована током 15 минута на 50 °C, уз мешање. Адсорбована једињења су десорбована 10 минута у split/splitless инјектору гасног хроматографа загрејаном на 220 °C, у splitless режиму, и затим анализирана GC/MS и GC/FID методама.

3.6.3.1 Семи-квантитативна анализа испарљивих једињења

Семи-квантитативна анализа испарљивих једињења извршена је методом нормализације површине. Релативни удео (%) појединачних компоненти представља нормализовани однос површине пика сваке од компонената и укупне површине пикова свих компонената у GC/FID хроматограму. Вредности су добијене аутоматском интеграцијом хроматограма у MSD ChemStation Data Analysis софтверу (енг. *Area Percent Report*) без икаквих корекција.

3.6.4 UHPLC-DAD-MS/ MS анализа хидролата црног бибера

За квалитативну и квантитативну анализу хидролата црног бибера примењена је метода течне хроматографије ултрависоких перформанси комбинована са DAD детекцијом и масеном спектрометријом (UHPLC-DAD-MS/MS) за анализу ***пиперина и осталих алкалоида***, чији је поступак детаљно описан у одељку „*3.3.3.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа екстраката плода црног бибера*“. Узорци хидролата припремљени су у метанолу у концентрацији од 0,5 mg/cm^3. Анализа је рађена у позитивном јонизационом режиму. Концентрација пиперина у анализираном узорку одређена је на

основу калибрационе криве добијене из серије стандардних раствора пиперина у метанолу (0,00625–0,4 mg/cm^3, ј-на 3.12).

3.6.5 GC/MS и GC/FID анализа етарских уља црног бибера

GC/MS анализа је извршена на гасном хроматографу (Agilent Technologies 7890B Gas Chromatograph, USA) куплованом са инертним, селективним 5977A масеним детектором исте компаније. Компоненте су раздвојене на неполарној, силика капиларној колони HP-5MS (са стационарном фазом на бази 5% дифенил- и 95% диметил-полисилоксана; дужине 30 m, пречника 0,25 mm и дебљине филма 0,25 μm; Agilent Technologies, USA). Као носећи гас коришћен је хелијум чистоће 99,999 %, при константној брзини протока од 1 cm^3/min. Температура пећнице је линеарно повећавана од 60 °C до 246 °C брзином од 3 °C/min. Укупно време трајања анализе је било 62 min. Елуат је MSD трансфер линијом температуре 250 °C пренешен до квадруполног масеног спектрометра са електронском јонизацијом (температуре јонског извора и квадруполног масеног анализатора су биле 230 °C и 150 °C, редом а енергија електрона 70 eV) и анализиран у Scan modu, у опсегу *m/z* од 41-415 Da.

GC/FID анализа је извршена под идентичним експерименталним условима као и GC/MS анализа. Температура пламено-јонизујућег детектора (FID) је била подешена на 300 °C.

3.6.5.1 Обрада података

Обрада података је извршена помоћу MSD ChemStation Data Analysis (ревизија F.01.00.1903) у комбинацији са AMDIS (енг. *Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, верзија 2.70) и NIST MS Search (верзија 2.0g) софтверима (Agilent Technologies, USA). MSD ChemStation Data Analysis служи за аутоматску и мануелну интеграцију пикова на добијеним хроматограмима а самим тим и квантификацију добијених података. AMDIS омогућава аутоматско налажење једињења деконволуцијом, односно екстракцијом чистих масених спектара из преклопљених пикова и њиховим поређењем са референтном библиотеком масених спектара са или без ретенционих индекса. Коначно, коришћен је програм NIST MS Search, који је развио Национални институт за стандарде и технологију (енг. *National Institute of*

Standards and Technology), и који обезбеђује алгоритам за претрагу библиотека комплементаран PBM (енг. *Probability Best Match*) алгоритму ChemStation софтвера.

За недвосмислену идентификацију компонената смеше коришћени су ретенциони индекси одређени експериментално, помоћу серије хомологих *n*-алкана C_8-C_{20} као стандарда. Идентификација компоненти је заснована на поређењу њихових ретенционих индекса (RI^{exp}) са литературно доступним вредностима (RI^{lit}) (Adams, 2007; Babushok et al., 2011), на поређењу њихових масених спектара са спектрима из Willey, NIST и RTLPEST библиотеке (MS) и када год је могуће, ко-инјектирањем одговарајућег стандарда (Co-I).

3.6.6 Биолошке активности изолованих етарских уља и хидролата

3.6.6.1 Антиоксидативна активност

Антиоксидативна активност етарских уља (добијених техникама I и II) црног бибера одређена је применом пет тестова: DPPH, ABTS, FIC, FRAP и ферицијанидне методе, према поступцима детаљно описаним у одељку „*3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.1 Антиоксидативна активност екстраката*“. За сваки тест припремљене су серије разблажења етарских уља у етанолу у различитим концентрационим опсезима (mg/cm^3):

- ***за DPPH тест*** у концентрацијама (*за етарско уље добијено техником I*: 0,2344–30 mg/cm^3, време инкубације: 0–60 минута; *за хидролат добијен техником I*: 0,025–1 mg/cm^3, време инкубације: 0–20 минута; *за фракције етарског уља*: I: 0,24–30,66 mg/cm^3, II: 0,17–21,84 mg/cm^3, III: 0,1993–25,51 mg/cm^3, IV: 0,11–13,51 mg/cm^3, V: 0,063–8,02 mg/cm^3, време инкубације: 20–60 минута; *за стандардне компоненте*: *(E)-кариофилен*: 1,563–100 mg/cm^3, време инкубације: 20 минута; *линалол*: 3,90–500 mg/cm^3, време инкубације: 20–60 минута; *за BHT*: 0,00625–1 mg/cm^3, време инкубације: 20 минута; *за BHA*: 0,000975–0,5 mg/cm^3, време инкубације: 20 минута; *за етарска уља из технике II*: проба I: 0,2344–30 mg/cm^3, време инкубације: 0–60 минута: проба II: 0,195–12,5 mg/cm^3, проба III: 0,156–20 mg/cm^3, проба IV и V: 0,195–25 mg/cm^3, време инкубације: 0–20 минута; *за хидролате из технике II*: проба I–IV: 0,025–1 mg/cm^3, проба V: 0,011–0,716 mg/cm^3, време инкубације: 0–20 минута);

- ***за ABTS тест*** у концентрацијама (*за етарско уље из технике I*: 2,5–25 mg/cm^3, време инкубације: 24 минута; *за хидролат из технике I*: 0,023–1,45 mg/cm^3, време инкубације: 6 минута; *за фракције етарског уља*: I–V: 0,78125–50 mg/cm^3, време инкубације: 24 минута; *за етарска уља из технике II*: проба I: 2,5–25 mg/cm^3, проба II: 3,125–25 mg/cm^3, проба III: 2,5–25 mg/cm^3, пробе IV и V: 1,25–25 mg/cm^3, време инкубације: 24 минута; *за хидролате из технике II*: проба I: 0,023–1,45 mg/cm^3, проба II–V: 0,156–10 mg/cm^3, време инкубације: 6 минута);
- ***за FIC тест*** у концентрацијама (*за етарско уље из технике I*: 0,797–51 mg/cm^3; *за хидролат из технике I*: 0,25–5 mg/cm^3; *за фракције етарског уља*: I: 1,63–104,45 mg/cm^3, II: 0,37–23,85 mg/cm^3, III: 1,22–78,05 mg/cm^3, IV: 0,69–44,3 mg/cm^3, V: 0,156–10 mg/cm^3; *за стандардну компоненту EDTA*: 0,0156–0,2 mg/cm^3; *за етарска уља из технике II*: проба I и II: 0,797–51 mg/cm^3, проба III: 0,937–60 mg/cm^3, проба IV: 0,414–53 mg/cm^3, проба V: 0,859–55 mg/cm^3, *за хидролате из технике II*: проба I: 0,25–5 mg/cm^3, проба II: 0,03–1,92 mg/cm^3, проба III: 0,037–2,4 mg/cm^3, проба IV: 0,029–1,875 mg/cm^3, проба V: 0,036–2,3 mg/cm^3 – време инкубације за све узорке било је 10 минута);
- ***за FRAP тест*** у концентрацијама: (*за етарско уље из технике I*: 2 mg/cm^3; *за хидролат из технике I*: 1 mg/cm^3; *за фракције етарског уља*: I: 1,53 mg/cm^3, II: 2,25 mg/cm^3, III: 2,25 mg/cm^3, IV: 3,075 mg/cm^3, V: 1,1 mg/cm^3; *за етарска уља из технике II*: проба I–V: 2 mg/cm^3; *за хидролате из технике II*: проба I–V: 1 mg/cm^3 – време инкубације 30 минута; резултати су изражени као mgEFe^{2+}/1g уља одн. хидролата);
- ***за ферицијанидну методу*** у концентрацијама: (*за етарско уље из технике I*: 0,4 mg/cm^3; *за хидролат из технике I*: 0,3625 mg/cm^3; *за фракције етарског уља*: I: 0,31 mg/cm^3, II и III: 0,45 mg/cm^3, IV: 0,615 mg/cm^3, V: 0,22 mg/cm^3; *за етарска уља из технике II*: проба I–V: 0,4 mg/cm^3; *за хидролате из технике II*: проба I: 0,3625 mg/cm^3, проба II: 0,48 mg/cm^3, проба III: 0,60 mg/cm^3, проба IV: 0,47 mg/cm^3, проба V: 0,575 mg/cm^3 – време инкубације 30 минута; резултати су изражени као mg GKE/g етарског уља одн. хидролата).

3.6.6.2 Антимикробна активност

Антимикробна активност етарских уља и хидролата (добијених техником I и II) бибера одређена је применом микродилуционе методе, према поступку детаљно

описаном у одељку *„3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.2 Антимикробна активност екстраката“*. Узорци етарских уља припремљени су у DMSO и разблажени у стерилном МХБ, док су хидролати у првобитном стању разблажени у стерилном МХБ, а анализирани концентрациони опсег у медијуму је био од 0,390-25 mg/cm^3 за етарска уља и 0,234-15 mg/cm^3 за хидролате.

3.6.6.3 Одређивање антихипергликемијске активности:инхибиција α-глукозидазе

Антихипергликемијска активност етарских уља и хидролата (добијених техником I и II) бибера одређена је испитивањем инхибиторног дејства на ензим *α*-глукозидазу, према поступку детаљно описаном у одељку *„3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.3 Антихипергликемијска активност екстраката“* заснованом на методи коју су описали Apostolidis и сарадници (2007), са одређеним модификацијама (Apostolidi et al., 2007). Узорци етарских уља и хидролата припремљени су у DMSO и разблажени у фосфатном пуферу (pH 6,9) у следећем концентрационом опсегу: (*за етарско уље из технике I*: 0,029 – 0,466 mg/cm^3; *за хидролат из технике I*: 0,03125 – 1 mg/cm^3; *за етарска уља из технике II:* проба II: 0,031 – 0,5 mg/cm^3; проба III: 0,019 – 0,3125 mg/cm^3; проба IV: 0,0156 – 0,25 mg/cm^3; проба V: 0,026 – 0,42 mg/cm^3; *за хидролате из технике II:* проба II до V: 0,03125 – 1 mg/cm^3; време инкубације 10 + 10 минута).

3.7 Изолација и карактеризација пиперина

Изолација пиперина. Самлевеном плоду црног бибера (30 g) је додато 300 cm^3 96% v/v етанола и вршена екстракција по Soxhlet-у у току 120 минута. Добијени екстракт је профилтриран на Büchner-овом левку и остављен да одстоји 24 сата. Затим је извршено упаравање (концентровање) екстракта на вакуум упаривачу до запремине 10-20 cm^3. Упареном екстракту је додато 10 cm^3 раствора 10% KOH* у етанолу. Ова смеша је остављена да одстоји 60 минута, након чега је вршена филтрација (на филтер папиру се задржавају нечистоће). Преостали филтрат је затим загреван уз истовремено

* 10% етанолни раствор KOH – 10 g KOH растворити у 30 cm^3 дестиловане воде, а када се раствор охлади допунити 96%-ним етанолом до 100 g. Нерастворни део профилтрирати, а раствор чувати у тамној боци.

додавање воде. Вода се додаје све док постоји стварање талога (жути талог)*. Оваква смеша је остављена да стоји 24 сата, како би се пиперин додатно исталожио, а затим је извршена филтрација на Büchner-овом левку (на филтер папиру се налази сиров пиперин). Филтер папир је остављен у ексикатору, а касније осушен пиперин коришћен за прекристализацију (добијање пречишћеног пиперина) (Stanojević et al., 2017). Процес изолације и прекристализације пиперина је приказан на Слици 3.17.



Слика 3.17. Процес изолације пиперина: (а) Soxhlet-екстракција (120 min; почетак и крај екстракције); (б) додавање воде и таложење пиперина; (в) изоловани (сирови) пиперин и његова прекристализација

Прекристализација пиперина. Осушени талог пиперина (добијен у претходно описаном поступку, сирови пиперин) растворен је у 96% v/v етанолу (10 cm^3) и вршена екстракција уз рефлукс на температури од 56 ^oC, 10 минута, након чега је

* Количина (cm^3) воде која се додаје при таложењу пиперина је углавном 3-4 пута већа од укупне запремине упареног екстракта и додатог раствора KOH у етанолу (у овом случају 15 cm^3 упарени екстракт + 10 cm^3 = 25 cm^3 што значи да је додата количина воде била око 75-100 cm^3)

профилтриран кроз врућ левак и остављен да тако кристалише. Пречишћен пиперин је окарактерисан различитим инструменталним методама.

3.7.1 UV-Vis анализа пиперина

UV-Vis спектар снимљен је на спектрофотометру Varian Cary-100 Conc. у области таласних дужина од 200–600 nm. Снимање узорка је извршено у кварцним киветама (1×1×4,5 cm) на собној температури, у концентрацији од 0,01 mg/cm^3 у 80% v/v етанолу.

3.7.2 FT-IR анализа пиперина

FT-IR спектар пиперина је снимљен према поступку описаном у делу *„3.5 Изолација и карактеризација масног уља – 3.5.4 FT-IR анализа масног уља“*.

3.7.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа пиперина

За квалитативну и квантитативну анализу хидролата црног бибера примењена је метода течне хроматографије ултрависоких перформанси комбинована са DAD детекцијом и масеном спектрометријом (UHPLC-DAD-MS/MS) за анализу ***пиперина и осталих алкалоида***, чији је поступак детаљно описан у одељку „*3.3.3.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа екстраката плода црног бибера*“. Узорци хидролата припремљени су у метанолу у концентрацији од 0,5 mg/cm^3. Анализа је рађена у позитивном јонизационом режиму. Концентрација пиперина у анализираном узорку одређена је на основу калибрационе криве добијене из серије стандардних раствора пиперина у метанолу (0,00625–0,4 mg/cm^3, ј-на 3.12).

3.8 Припрема инклузионих комплекса и физичких смеша са пиперином

За израду ***инклузионих комплекса*** пиперина са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином примењена је метода гњечења. Пиперин (285,3 mg) се додаје густој пасти *β*-циклодекстрина (1135 mg), односно 2-хидроксипропил-*β*-

циклодекстрина (1540 mg) и смеше етанол:вода (1:1, v/v) и уравнотежава мешањем током 60 минута на собној температури. Добијени узорак је сушен у ексикатору на собној температури до константне масе. Молски однос пиперина и одговарајућег циклодекстрина приликом припреме инклузионих комплекса је 1:1.

Припрема физичких смеша. Физичке смеше се припремају у тарионику са пистилом једноставним мешањем пиперина са комплексирајућим агенсима, *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином, у молском односу 1:1.

3.8.1 FT-IR анализа

FT-IR спектри пиперина, коришћених циклодекстрина, инклузионих комплекса и физичких смеша пиперина и циклодекстрина, снимљени су према поступку описаном у делу *„3.5 Изолација и карактеризација масног уља – 3.5.4 FT-IR анализа масног уља“*.

3.8.2 Диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC)

Термичке карактеристике пиперина, *β*-циклодекстрина, 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, инклузионих комплекса и одговарајућих физичких смеша анализиране су у атмосфери азота у температурном опсегу 50-250 °C са брзином скенирања 10 °C/min. Узорци (3–4 mg) су херметички затворени у алуминијумским посудама и анализирани заједно са празном алуминијумском посудом као референтним узорком. Анализе су извршене на диференцијалном скенирајућем калориметру DSC Q20 (TA Instruments, New Castle, USA).

3.8.3 Дифракција X-зрака (XRD)

XRD спектри пиперина, *β*-циклодекстрина, 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, инклузионих комплекса и одговарајућих физичких смеша снимљени су при следећим условима: узорци су озрачени монохроматским CuKα зрачењем и анализирани под углом 2θ између 5 и 60° са кораком 0,03° и дужином снимања τ=2 s. У току снимања коришћени су напон и јачина струје 40 kV и 15 mA, редом. Сви анализирани узорци снимљени су на Phillips PW1030 дифрактометру за прах.

3.8.4 Анализа фазне растворљивости пиперина

Анализа фазне растворљивости извршена је применом Higuchi-Connors методе (Higuchi and Connors, 1965). Вишак пиперина (5 mg) се додаје у 2,5 cm³ водених раствора растућих концентрација *β*-циклодекстрина (0–10 mmol/dm³), односно 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина (0–20 mmol/dm^3). Узорци су мешани на собној температури током 24 h, а затим филтрирани кроз мембрански филтер пречника пора 0,45 μm (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка). Профилтрирани узорци су разблажени етанолом, а количина растворено пиперина је одређена применом UV-Vis методе описане у делу *„3.7 Изолација и карактеризација пиперина – 3.7.1 UV-Vis анализа пиперина*“, на основу конструисане калибрационе криве. Основни раствор пиперина концентрације 50 μg/cm^3 припремљен је растварањем 2,5 mg пиперина у 50 cm^3 80% v/v етанола. Из основног раствора је разблаживањем припремљена серија раствора пиперина (1–10 μg/cm^3).

Апсорбанца узорака је мерена на Varian Cary-100 Conc (*Varian PTY LTD, Springvale, Australia*) на таласној дужини од 343 nm, на собној температури, у кварцним киветама (1×1×4,5 cm). Као слепа проба коришћен је 80% v/v етанол. Присуство циклодекстрина не интерферише са спектрофотометријским одређивањем пиперина.

Калибрациона крива пиперина, са коефицијентом линеарне корелације $R^2 = 0{,}999$, представљена је једначином (ј-на 3.25):

$$A_{пиперина} = 0{,}1152 \times c_{пиперина} - 0{,}0074 \tag{3.25}$$

где је: $A_{пиперина}$ – апсорбанца пиперина на 343 nm, $c_{пиперина}$ – концентрација пиперина у μg/cm^3.

Привидне константе стабилности (K_S) инклузионих комплекса израчунате су на основу дијаграма фазне растворљивости, према једначини (ј-на 3.26):

$$K_S = \frac{\text{нагиб}}{S_0\,(1-\text{нагиб})} \tag{3.26}$$

при чему је S_0 – интрузичка растворљивост пиперина, а *нагиб* – нагиб дијаграма фазне раастворљивости.

3.8.5 Протонска нуклеарна магнетна резонантна спектроскопија (^{1}H-NMR)

^{1}H-NMR спектри пиперина, *β*-циклодекстрина, хидроксипропил-*β*-циклодекстрина и инклузионих комплекса пиперин:*β*-CD и пиперин:HP-*β*-CD снимани су у стакленој кивети пречника 5 mm на Bruker Avance III NMR спектрометру (*Billerica, MA, USA*) са радном фреквенцијом 400 MHz на собној температури. Узорци су припремани растварањем 13–14 mg анализираних једињења или инклузионих комплекса у 1 cm^3 одговарајућег растварача. Деутерисани хлороформ ($CDCl_3$) је коришћен за растварање пиперина, а деутерисана вода за растварање осталих узорака (D_2O).

3.8.6 Биолошке активности пиперина и инклузионих комплекса са циклодекстринима

3.8.6.1 Антиоксидативна активност

Антиоксидативна активност пиперина и његових инкузионих комплекса са циклодекстринима одређена је применом пет тестова: DPPH, ABTS, FIC, FRAP и ферицијанидне методе, према поступцима детаљно описаним у одељку „*3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.1 Антиоксидативна активност екстраката*“. За сваки тест припремљене су серије разблажења у етанолу у различитим концентрационим опсезима:

- ***за DPPH тест*** у концентрацијама (*за пиперин:* 0,176–11,25 mg/cm^3; *за инклузионе комплексе: пиперин:β-CD:* 0,117–7,5 mg/cm^3 и *пиперин:HP-β-CD:* 0,059–3,75 mg/cm^3, при чему су наведене вредности еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима; време инкубације: 20 минута);
- ***за ABTS тест*** у концентрацијама (*за пиперин:* 0,391–25 mg/cm^3; *за инкузионе комплексе: пиперин:β-CD и пиперин:HP-β-CD:* 0,156–10 mg/cm^3, где су наведене вредности еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима; време инкубације: 6 минута);
- ***за FIC тест*** у концентрацијама (*за пиперин*: 0,156–10 mg/cm^3; *за инкузионе комплексе: пиперин:β-CD и пиперин:HP-β-CD:* 0,156–10 mg/cm^3, где су наведене вредности еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима; време инкубације: 10 минута);

- ***за FRAP*** тест у концентрацијама (*за пиперин:* 3,75 mg/cm^3; *за инклузионе комплексе*: 3,75 mg/cm^3, где су наведене вредности еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима; време инкубације: 30 минута; резултати су изражени као mgEFe^{2+}/1g пиперина);
- ***за ферицијанидну методу*** у концентрацијама (*за пиперин:* 3 mg/cm^3; *за инклузионе комплексе: пиперин:β-CD:* 1 mg/cm^3 и *пиперин:HP-β-CD:* 0,5 mg/cm^3, при чему су наведене вредности еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима; време инкубације: 30 минута; резултати су изражени као mg GKE/g пиперина).

3.8.6.2 Антимикробна активност

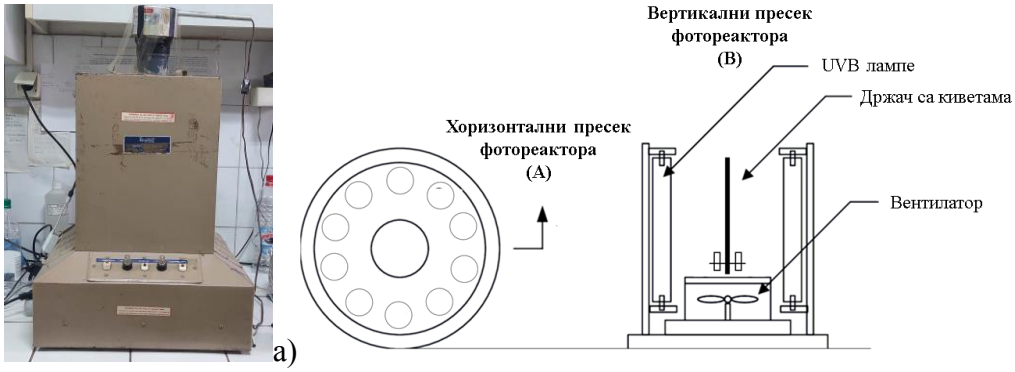
Антимикробна активност пиперина и инклузионих комплекса пиперина са циклодекстринима одређена је применом микродилуционе методе, према поступку детаљно описаном у одељку *„3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.2 Антимикробна активност екстраката“*. Узорци пиперина припремљени су у DMSO, а инклузионих комплекса у мешавини воде и DMSO (1:1 v/v), разблажени у стерилном МХБ, а анализирани концентрациони опсег у подлози је био од 0,117–7,5 mg/cm^3 (када је реч о инклузионим комплексима, ове вредности су еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима).

3.8.6.3 Одређивање антихипергликемијске активности: инхибиција α-глукозидазе

Антихипергликемијска активност пиперина и инклузионих комплекса са циклодекстринима одређена је испитивањем инхибиторног дејства на ензим *α*-глукозидазу, према поступку детаљно описаном у одељку *„3.3.4 Биолошке активности екстраката – 3.3.4.3 Антихипергликемијска активност екстраката“* заснованом на методи коју су описали Apostolidis и сарадници (2007), са одређеним модификацијама (Apostolidis et al., 2007). Узорци пиперина и инклузионих комплекса са циклодекстринима припремљени су у DMSO и разблажени у фосфатном пуферу (pH 6,9) у следећем концентрационом опсегу: (*за пиперин:* 0,03125–1 mg/cm^3; *за инклузионе комплексе: пиперин:β-CD:* 0,0390–0,625 mg/cm^3 и *пиперин:HP-β-CD:* 0,1562,5 mg/cm^3, при чему су наведене вредности еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима; време инкубације: 10+10 минута).

3.9 UV озрачивање пиперина и инклузионих комплекса пиперина

Раствори пиперина и инклузионих комплекса (концентрације пиперина и пиперина у инклузионим комплексима биле су 0,05 mg/cm^3 у 80% v/v етанолу) су третирани кумулативним UV-B зрачењем у периоду од 0-60 min у цилиндричном фотохемијском реактору „Rayonet“ (Southern New England Ultraviolet Co., Konektikat, SAD)* са 8 симетрично постављених UV-B лампи, чији је емисиони максимум на 300 nm. Коришћене су кварцне кивете (1×1×4,5 cm) постављене на кружно ротирајућем носачу. Шематски приказ фотореактора дат је на Слици 3.18.



а) б)

Слика 3.18 Фотореактор „Rayonet” а) оригиналан приказ; б) хоризонтални и вертикални пресек фотореактора

Укупно измерени флукс 8 лампи зрачења које погађа узорке, износио је 12 W/m^2 на удаљености од 10 cm од лампи. Након озрачивања, узорци су филтрирани преко целулозних филтера промера пора 0,45 μm (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка) а њихова карактеризација извршена је применом UV-Vis методе (Детаљније у делу: *„3.7.1 UV-Vis анализа пиперина“*).

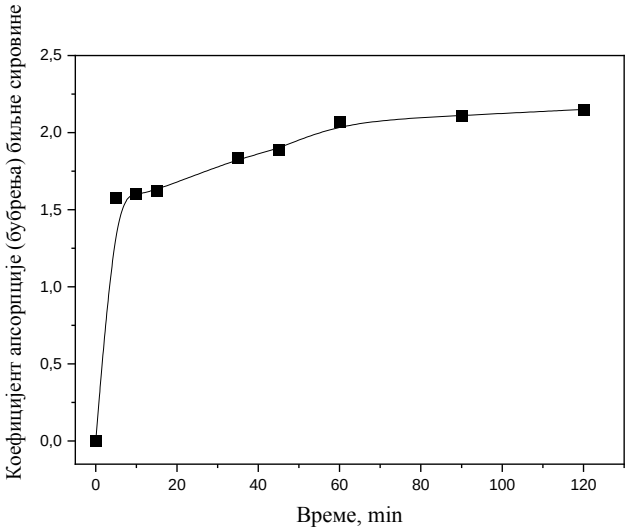
*Цилиндрични фотохемијски реактор „Rayonet“. UV лампе су по конструкцији цеви са живином паром под малим притиском. Вентилатор омогућава одржавање температуре током зрачења испод 40ºC (Albini and Germani, 2010).

4 РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1 Технолошке карактеристике биљне сировине

Садржај влаге у плоду црног бибера износио је 10,67 g/100 g биљног материјала (односно 10,67%, Табела 4.1), што је у складу са подацима доступним у литератури. Balasubramanian и сарадници (2013) наводе сличне вредности, док је према Meghwal и Goswami (2011) садржај влаге у црном биберу од 6% до 11,3%, што потврђује да је добијени резултат у границама типичних вредности за ову сировину (Balasubramanian et al., 2013; Meghwal and Goswami, 2011). Овај ниво влаге може се сматрати безбедним, јер се сматра да садржај влаге већи од 14% значајно повећава ризик од развоја плесни и других микробиолошких контаминаната током паковања и складиштења у амбијенталним условима (Sreedharan et al., 1985).

Максималан коефицијент бубрења плода црног бибера након 120 минута износи 2,15 (Табела 4.1), док је читав процес бубрења самлевеног плода црног бибера приказан на Слици 4.1.



Слика 4.1 Зависност промене коефицијента бубрења самлевеног плода црног бибера од времена

Овај параметар има практичан значај за процесе екстракције, јер одређује степен доступности биолошки активних једињења. Иако у литератури не постоји релевантно истраживање о технолошким карактеристикама самлевеног плода црног бибера, према студијама о несамлевеном плоду може се закључити да садржај влаге у црном биберу

значајно утиче на његове физичке карактеристике попут насипне масе, запреминске масе и густине.

Насипна маса и порозност црног бибера повећава се са повећањем садржаја влаге до одређене границе, док се запреминска маса смањује (Meghwal and Goswami, 2011). У овом истраживању добијене су вредности за релативну густину (1,312 g/cm^3), запреминску масу (1,0317 g/cm^3) и насипну масу (0,507 g/cm^3), што указује на изражену порозност (0,2134) и шупљикавост (0,508) биљног материјала (Табела 4.1). Ови параметри имају велики значај у технолошкој пракси, јер повећана порозност омогућава бољу пенетрацију растварача у биљни материјал, чиме се убрзава процес екстракције. Са друге стране, већа шупљикавост обезбеђује већу унутрашњу контактну површину, што додатно олакшава ослобађање биоактивних једињења. Величина честица биљног материјала знатно утиче како на коефицијент бубрења, тако и на остале технолошке карактеристике. Мање честице обично показују већи коефицијент бубрења због веће контактне површине са растварачем, што је веома значајно за процес екстракције. Према студији Murthy-ија и сарадника, оптимална величина честица за дестилацију етарског уља црног бибера је око 0,7 mm (Murthy et al., 1999). За изолацију олеорезина црног бибера методом микроталасне рефлукс екстракције оптимална средња величина честица била је 0,105 mm (Olalere et al., 2017), док је за екстракцију пиперина из црног бибера методом суперкритичне CO_2 екстракције овај параметар био 0,42 mm (Dutta and Bhattacharjee, 2016). Такође, максималан принос пиперина добијен је секвенцијалном микроталасно-ултразвучном екстракцијом при величини средњег пречника честица од 0,15 mm (Gorgiani et al., 2017). Средњи пречник честица плода црног бибера коришћен за анализе у овој дисертацији сличан је већ поменутим из доступне литературе (0,258 mm, Табела 4.1). Ова величина представља компромис између довољно развијене контактне површине и очуване пропустљивости слоја биљног материјала, чиме се обезбеђују оптимални услови за ефикасну изолацију различитих класа биолошки активних једињења из плода црног бибера.

Табела 4.1 Технолошке и физичко-хемијске карактеристике самлевеног плода црног бибера

Технолошка карактеристика	**Самлевени плод црног бибера**
Садржај влаге у биљном материјалу, g/100 g суве масе узорка	10,67

Наставак Табеле 4.1

Коефицијент апсорпције (бубрења) биљне сировине (максималан)	2,1502
Релативна густина биљне сировине, g/cm^3	1,312
Запреминска маса, g/cm^3	1,0317
Насипна маса, g/cm^3	0,507
Порозност	0,2134
Шупљикавост	0,508
Средњи пречник честица биљне сировине, mm	0,258
Садржај укупних екстрактивних материја у биљном материјалу, g УЕМ/100 g б.м.	19,85
Садржај етарског уља, cm^3/100 g б.м.	3,26
Релативна густина етарског уља, g/cm^3	0,8328

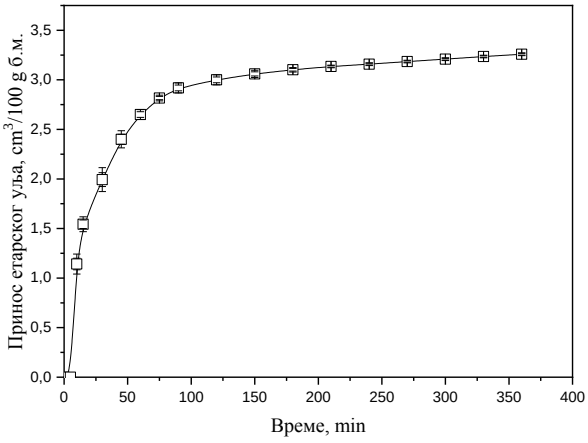
4.1.1 Садржај укупних екстрактивних материја

Садржај укупних екстрактивних материја (q_0, УЕМ) у полазном биљном материјалу, тј. у плоду црног бибера (*Piper nigrum* L.) је одређен применом Soxhlet екстракције током 360 минута на температури кључања. Као растварач је коришћен 70%-ни етанол (v/v). Добијена вредност износи 19,85 g УЕМ/100 g биљног материјала, што указује на висок удео растворљивих органских једињења у испитиваном узорку. До сада у литератури постоји ограничен број података који се односе на УЕМ плода црног бибера. Већина радова се односи на приносе појединачних фракција (олеорезина, пиперина, фенолних компонената) или на поређење техника екстракције без навођења садржаја УЕМ. У том контексту, ранија студија објављена из ове дисертације (Milenković et al., 2025) представља једну од првих свеобухватних студија у којој су УЕМ јасно дефинисане и експериментално одређене за различите технике (Soxhlet, рефлукс, мацерација, ултразвук) (Milenković et al., 2025).

Иако су новије студије усмерене ка применама „зелених“ техника екстракције (енг. *green extraction*), ови резултати показују да традиционалне технике и даље обезбеђују висок и репрезентативан принос укупних екстрактивних материја, што потврђује да су услови примењени у овој дисертацији адекватни и упоредиви. Овим радом је по први пут објављен савремени експериментални сет података за узорак црног бибера који се користи на српском тржишту, чиме се доприноси ажурирању литературних вредности и потврђује релевантност класичних метода у контексту модерних истраживања природних производа (Milenković et al., 2025).

4.1.2 Садржај етарског уља

За одређивање садржаја етарског уља (q_0, ЕУ) у полазном биљном материјалу, тј. у плоду бибера одрађена је препаративна изолација и то хидродестилацијом уситњеног и хомогенизованог биљног материјала при оптималном хидромодулу 1:10 m/V (Слика 4.2).



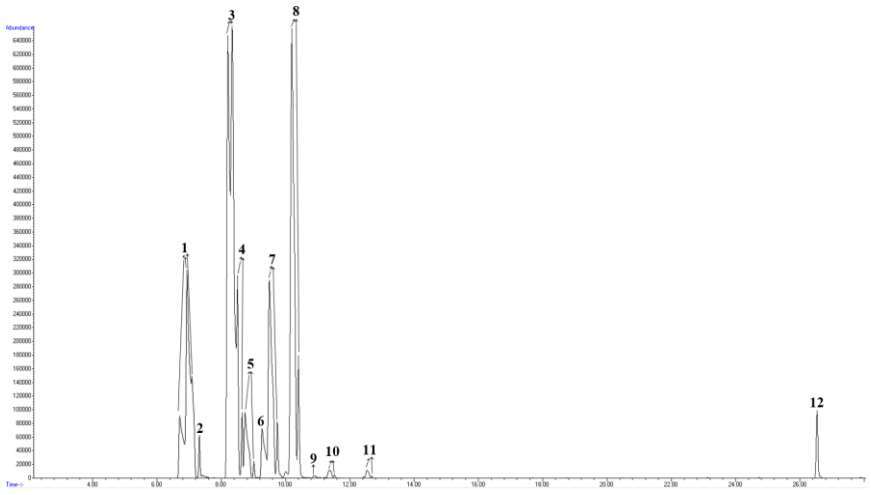
Слика 4.2 Максимални садржај етарског уља у плоду црног бибера за време хидродестилације од 360 минута

Максимални садржај етарског уља (q_0, ЕУ) у плоду црног бибера након 360 минута Clevenger хидродестилације је износио 3,26 ± 0,014 cm^3/100 g биљног материјала (Табела 4.1). Овај принос се поклапа са доступним литературним подацима (Kapoor et al., 2009, Meghwal and Goswami, 2012, Tran et al., 2019, Dao et al., 2020, Ashokkumar et al., 2021). Релативна густина етарског уља износи 0,8328 g/cm^3 (Табела 4.1).

4.1.3 HS-SPME анализа испарљивих једињења у биљном материјалу

Анализа GC/MS хроматограма (Слика 4.3) указује на изражену сложеност испарљивих компоненти плода црног бибера. На TIC (енг. *Total Ion Chromato*Грам) хроматограму је детектовано најмање 12 доминантних пикова, при чему се највећи број једињења елуира у интервалу ретенционих времена од 5 до 12 минута, што је

карактеристично за монотерпенске угљоводонике и оксигеноване монотерпене. У каснијем интервалу (изнад 20 минута) јављају се пикови сесквитерпена, што потврђује присуство једињења већих молекулских маса.

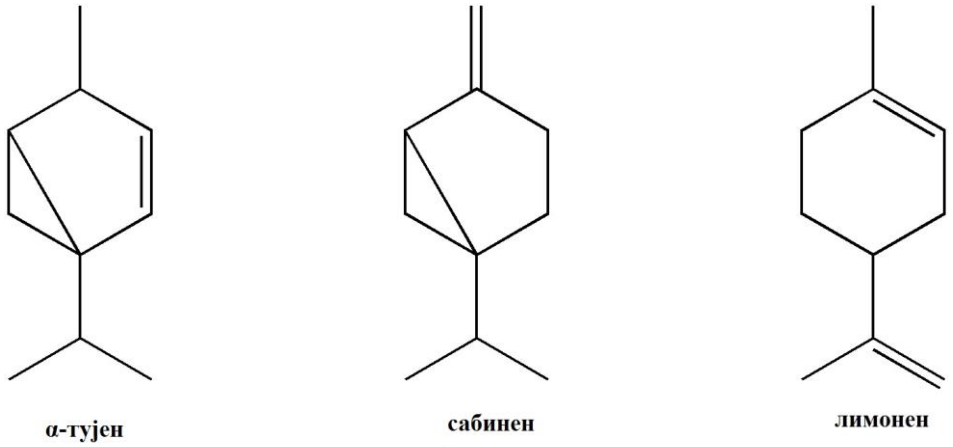


Слика 4.3 TIC хроматограм испарљивих једињења црног бибера

Ово је доказано и приказано у Табели 4.2, где су најзаступљеније компоненте сабинен (35,4%), лимонен (23,1%) и *α*-тујен (15,6%), што их сврстава у главне носиоце ароме. Сабинен је у литератури више пута описан као доминантан у црном биберу и одговоран за његову карактеристичну свеже-зачинску ноту, док лимонен даје цитрусне, а *α*-тујен оштре, биљне ноте. Значајно учешће има и *δ*-3-карен (10,8%), који доприноси слаткасто-дрвенастом карактеру ароме, као и *β*-пинен (5,8%) и мирцен (4,0%), који додају резинозно-балзамичне тонове. У поређењу са литературним подацима, добијени профил испарљивих једињења показује сличну доминацију монотерпенских угљоводоника. Наиме, Jelen и Gracka (2015) су применом SPME технике идентификовали као главне компоненте црног бибера 3-карен, D-лимонен, *α*- и *β*-пинен, сабинен и мирцен, док су од сесквитерпена доминирали (*E*)-кариофилен и кариофилен-оксид. Аутори су показали да профил испарљивих компоненти зависи од времена екстракције: након кратког трајања доминирали су монотерпени (≈89%), док је продужена екстракција повећавала удео сесквитерпена (≈36%) (Jeleń and Gracka, 2015). Резултати добијени у овој дисертацији, у којима су најзаступљенији били монотерпени (Слика 4.4), у складу су са овим истраживањима, што потврђује да су монотерпени носиоци ароме и да варијације могу проистећи из примене различитих техника екстракције и аналитичких услова.

Табела 4.2 Хемијски састав испарљивих једињења присутних у плоду црног бибера

Бр.	$t_{ret.}$, min	Једињење	Молекулска формула	RI^{exp}	RI^{lit}	Метод идентиикације	%
1.	**6,70–7,09**	***α*-тујен**	**$C_{10}H_{16}$**	**921**	**924**	**RI, MS**	**15,6**
2.	7,32	*α*-пинен	$C_{10}H_{16}$	934	932	RI, MS	0,9
3.	**8,20–8,34**	**сабинен**	**$C_{10}H_{16}$**	**968**	**969**	**RI, MS**	**35,4**
4.	8,50–8,64	*β*-пинен	$C_{10}H_{16}$	976	974	RI, MS	5,8
5.	8,73–9,01	мирцен	$C_{10}H_{16}$	991	988	RI, MS	4,0
6.	9,26	*α*-феландрен	$C_{10}H_{16}$	999	1002	RI, MS	2,1
7.	9,49–9,74	*δ*-3-карен	$C_{10}H_{16}$	1005	1008	RI, MS	10,8
8.	**10,19–10,40**	**лимонен**	**$C_{10}H_{16}$**	**1024**	**1024**	**RI, MS**	**23,1**
9.	10,87	(*E*)-*β*-оцимен	$C_{10}H_{16}$	1042	1044	RI, MS	tr
10	11,41–11,51	*γ*-терпинен	$C_{10}H_{16}$	1056	1054	RI, MS	0,4
11	12,53–12,68	*α*-терпинен	$C_{10}H_{16}$	1089	1086	RI, MS	0,4
12	26,53	(*E*)-кариофилен	$C_{15}H_{24}$	1423	1417	RI, MS	1,5
						Укупно идентификовано	100,0
Подела по групама (%)							
Монотерпенски угљоводоници (1–11)						98,5	
Сесквитерпенски угљоводоници (12)						1,5	



Слика 4.4 Најзаступљеније компоненте у плоду црног бибера

На основу добијених резултата може се закључити да биљна сировина, плод црног бибера, има технолошке карактеристике које су у складу са подацима из литературе и да је самлевени плод црног бибера технолошки погодна сировина за изолацију различитих класа биолошки активних једињења.

4.2 Методе изолације и карактеризације етанолних екстраката

4.2.1 Екстракција мацерацијом

4.2.1.1 Утицај оперативних услова на принос УЕМ

Резултати анализе утицаја концентрације етанола (време екстракције: 120 минута; температура: 25 °C; солвомодул 1:15 m/V) и солвомодула (време екстракције: 120 минута; температура: 25 °C; концентрација етанола 70% v/v) на принос УЕМ, током ектракције мацерацијом приказани су у Табелама 4.3 и 4.4, редом.

Табела 4.3 Утицај концентрације етанола на принос УЕМ (време екстракције: 120 min; температура: 25 °C)

Солвомодул, m/V	Етанол, v/v	УЕМ, g/100g б.м.
1:15	10%	5,50 ± 0,294
	30%	4,70 ± 0,431
	50%	5,70 ± 0,510
	70%	**8,42 ± 0,038**
	96%	4,25 ± 0,260

Табела 4.4 Утицај солвомодула на принос УЕМ (време екстракције: 120 min; температура: 25 °C, концентрација етанола: 70% v/v)

Солвомодул, m/V	УЕМ, g/100g б.м.
1:5	6,55 ± 0,053
1:10	**8,40 ± 0,015**
1:15	8,42 ± 0,038
1:20	8,67 ± 0,058
1:25	8,67 ± 0,072

Са повећањем концентрације етанола садржај УЕМ се повећава до одређене концентрације, а највећи принос је забележен при концентрацији етанола од 70% v/v. Количина изолованих УЕМ из плода црног бибера може зависити од структурних фактора биоактивних једињења бибера, као што су број фенолних хидроксилних или метоксилних група, флавон-хидроксил, кето група, слободних карбоксилних група и других структурних својстава. Водено-етанолне смеше се најчешће користе због мале токсичности, а веће ефикасности од одговарајућих монокомпонентних система, што се објашњава чињеницом да присуство воде повећава поларност екстракционог средства

и тако утиче на екстраховање шире класе једињења и повећање приноса екстракције (Do et al., 2014, Hu et al., 2016, Hidalgo and Almajano, 2017).

Када је реч о солвомодулу (однос биљни материјал/растварач), повећањем удела растварача процес преноса масе одвија се брже, чиме је изолација биоактивних једињења ефикаснија. Процес преноса масе се одвија брже због градијента концентрације између биљног материјала и запремине растварача, који је већи када се користи већи однос (Hidalgo and Almajano, 2017). Међутим, као што се може видети из Табеле 4.4, ово истраживање је показало да је повећањем солвомодула изнад 1:10 m/V, принос УЕМ био благо повећан, али није примећена значајна разлика. У односу на солвомодул 1:10 m/V, принос је при солвомодулу 1:15 m/V повећан за 0,24%, док је при солвомодулима 1:20 m/V и 1:25 m/V повећан за 3,21%. На основу резултата приказаних у Табелама 4.3 и 4.4, усвојено је да је 70% v/v етанол оптимални растварач, а солвомодул 1:10 m/V оптималан за екстракцију УЕМ мацерацијом.

Иако су при већим солвомодулима уочена само минимална повећања приноса, због економичности процеса, у наредним експериментима примењен је солвомодул 1:10 m/V.

4.2.2 Екстракција уз рефлукс

4.2.2.1 Утицај температуре и времена екстракције на принос УЕМ из плода црног бибера

Праћен је утицај температуре (25 °C, 40 °C, 50 °C и тачка кључања) и времена екстракције на принос УЕМ из плода црног бибера (Табела 4.5). Температура и време су доминантни оперативни услови екстракције од којих зависи ефикасност и селективност процеса екстракције (Stanojević et al., 2016). Са порастом температуре повећава се принос УЕМ из плода црног бибера. Највећи принос УЕМ (14,60 g/100 g б.м.) остварује се на температури кључања за време од 180 минута, па је ова температура усвојена као оптимална температура екстракције, што се може видети из Табеле 4.5.

Табела 4.5 Утицај температуре и времена екстракције на принос УЕМ (концентрација етанола: 70% v/v, солвомодул: 1:10 m/V)

	Време екстракције	
	120 min	**180 min**
Температура (°C)	Принос УЕМ, g/100g б.м.	
25	8,40 ± 0,015	9,10 ± 0,058
40	9,83 ± 0,008	10,00 ± 0,252
50	12,10 ± 0,100	12,57 ± 0,173
Температура кључања	**14,37 ± 0,306**	**14,60 ± 0,300**

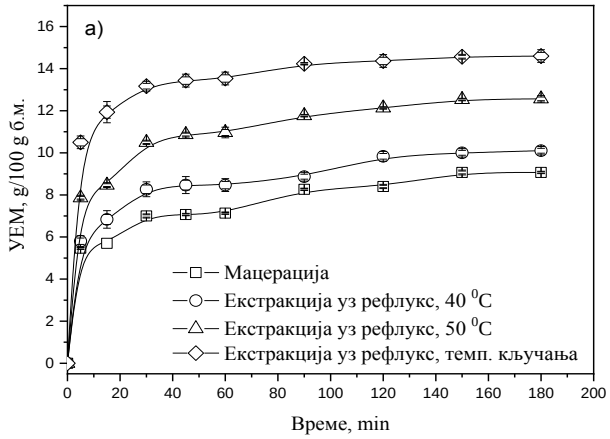
Са повећањем температуре екстракције, принос укупних екстрактивних материја (УЕМ) се континуирано повећава, што је у складу са подацима приказаним у Табели 4.5. Ова појава се може објаснити повећаном растворљивошћу екстрактивних компоненти у 70% етанолу при вишим температурама, као и смањењем вискозности растварача, што омогућава лакше продирање растварача у биљни материјал и ефикаснији масени пренос растворљивих једињења из унутрашњости биљног материјала у растварач (Stanojević et al., 2014).

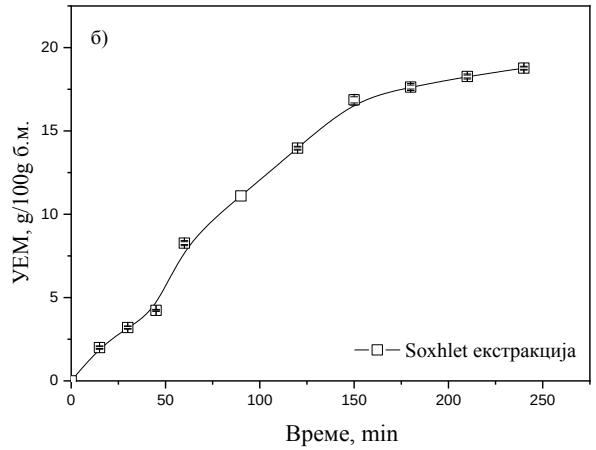
Принос УЕМ добијен на температури кључања био је за 41,54% и 37,67% већи у односу на принос добијен мацерацијом, за временске периоде од 120 и 180 минута, редом. Ови резултати потврђују значај температуре као кључног фактора који утиче на ефикасност екстракције, што је делимично условљено и природом компоненти присутних у анализираном биљном материјалу, чија се растворљивост у растварачу значајно повећава на повишеним температурама.

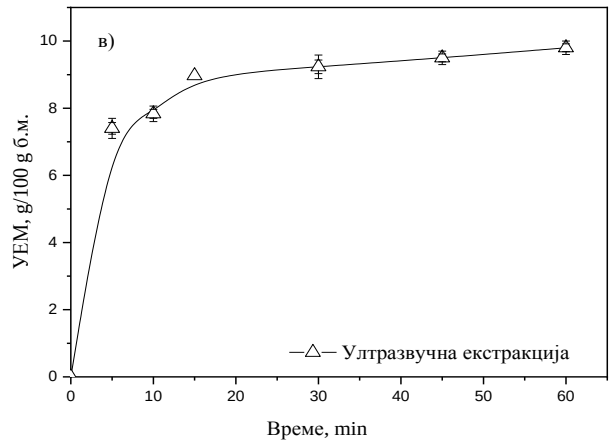
Ефикасност екстракције се повећава и са продужавањем времена екстракције у анализираном опсегу. Принос УЕМ расте са временом екстракције на свим анализираним температурама (Табела 4.5), при чему је повећање израженије на нижим температурама, док се на вишим температурама процес приближава стању засићења. У интервалу од 120 до 180 минута уочен је умерен пораст приноса (просечно 2–4%), након чега даље продужење времена екстракције вероватно не би довело до значајног повећања приноса. Ово указује на постизање динамичке равнотеже између концентрације растворених материја унутар и изван биљног материјала. Стога је време од 180 минута усвојено као оптимално време екстракције (Zhang et al., 2018).

4.2.3. Кинетика екстракције УЕМ мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс, Soxhlet и ултразвучном екстракцијом

Утицај технике екстракције на принос УЕМ у екстрактима црног бибера приказан је на Слици 4.5. Под дефинисаним, оптималним условима екстракције (растварач 70% етанол v/v; солвомодул 1:10 m/V) праћена је кинетика екстракције УЕМ различитим техникама екстракције и приказана је у Табели 4.6.







Слика 4.5 Зависност приноса УЕМ плода црног бибера од технике екстракције: а) мацерација, екстракција уз рефлукс (40 °C, 50 °C, температура кључања), б) Soxhlet екстракција и в) ултразвучна екстракција, при оптималним условима (концентрација етанола: 70% v/v, солвомодул 1:10 m/V)

Табела 4.6 Утицај технике екстракције на принос УЕМ из плода црног бибера (концентрација етанола: 70% v/v; солвомодул 1:10 m/V)

Техника екстракције	**Принос УЕМ, g/100 g б.м.**
Мацерација (180 min)	9,10 ± 0,058
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	10,00 ± 0,252
Екстракција уз рефлукс (50 °C, 180 min)	12,57 ± 0,173
Екстракција уз рефлукс (темп. кључања, 180 min)	14,60 ± 0,300
Soxhlet екстракција (240 min)	18,77 ± 0,115
Ултразвучна екстракција (25 °C, 60 min)	9,80 ± 0,200

Слика 4.5а показује да се екстракцијом уз рефлукс на температури кључања постиже највећи принос УЕМ (14,60 g/100 g б.м.) у поређењу са мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс на 40 °C и 50 °C. Слика 4.5б показује да се Soxhlet екстракцијом добија највећи принос УЕМ (18,77 g/100 g б.м.) у поређењу са другим техникама. Ово је последица циркулационог тока растварача до потпуног исцрпљења биљног материјала (Stanojević et al., 2014). Soxhlet метода екстракције интегрише предности рефлукс екстракције и мацерације, при чему користи принцип рефлукса и сифонирања за континуирану екстракцију биљног материјала свежим растварачем. Међутим, висока температура и дуго време екстракције код Soxhlet екстракције вероватно повећавају термичку деградацију или трансформацију неких једињења (Zhang et al., 2018).

Ултразвук је позитивно утицао на процес екстракције УЕМ из плода црног бибера. Принос УЕМ постигнут након 60 минута ултразвучне екстракције на 25 °C био је 9,80 g/100 g б.м. (Слика 4.5в, Табела 4.6). Вероватно је то последица кавитације која убрзава растварање и дифузију растворене супстанце као и пренос топлоте, што побољшава ефикасност екстракције (Zhang et al., 2018). У односу на мацерацију, ефекат ултразвука повећава принос УЕМ (за око 15%), а трајање процеса екстракције се у великој мери смањује (са 180 минута (мацерација) на 60 минута (УЕ) – Слика 4.5в и Табела 4.6). Класична мацерација се одвија механизмом нормалне дифузије кроз ћелијске зидове и овај процес захтева знатно дуже време екстракције (Ponomarev, 1976). Краће време трајања ултразвучне екстракције може се приписати бржем разарању ћелијских зидова под дејством ултразвука, смањењу величине честица и бољем преносу масе УЕМ из биљних ћелија (Stanojević et al., 2014).

Литературном претрагом нађени су подаци који одступају од резултата добијених у овом истраживању. Наиме, Soxhlet екстракцијом (растварач: 96% v/v етанол; време

екстракције: 10–12 h; при солвомодулу 1:8 m/V) добија се принос УЕМ од 3,56 g/100 g б.м. из плода црног бибера (Nahak and Sahu, 2011). Међутим, није увек случај да се добију овако мали приноси. У студији Panda и Kar-a (2003) Soxhlet екстракцијом (растварач: 96% v/v етанол; време екстракције: 30 min, при солвомодулу 1:5 m/V) је добијен принос УЕМ од 10,8 g/100 g б.м. (Panda and Kar, 2003). Ова разлика у приносу може се приписати различитом квалитету биљног материјала из кога се врши екстракција који потиче како од поднебља и климатских услова тако и од начина складиштења биљног материјала.

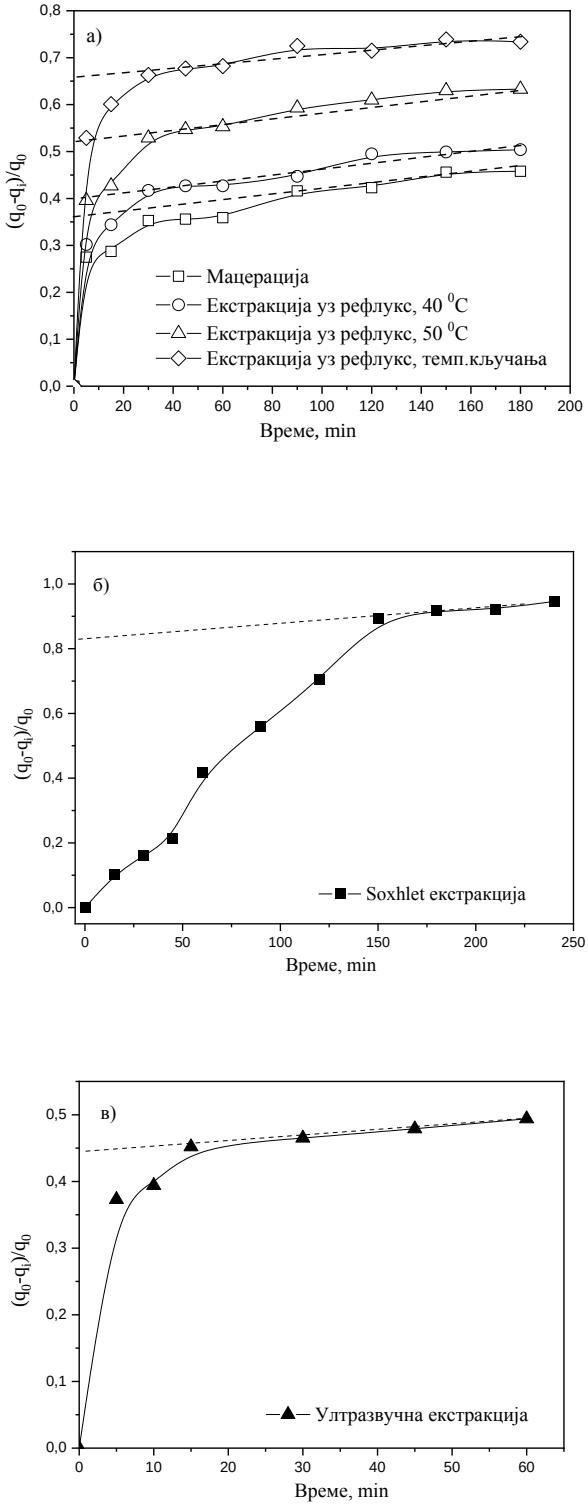
Добијени резултати показују да је екстракција уз рефлукс на температури кључања најповољнија техника за постизање високог приноса УЕМ у трајању од 180 минута, док Soxhlet екстракција обезбеђује највећи укупни принос, али уз већу потрошњу енергије и дужи процес (240 минута). Ултразвучна екстракција представља ефикасну алтернативу за брзу изолацију биоактивних једињења при ниској температури, уз очувану стабилност термолабилних компоненти.

4.2.3.1 Моделовање кинетике екстракције УЕМ

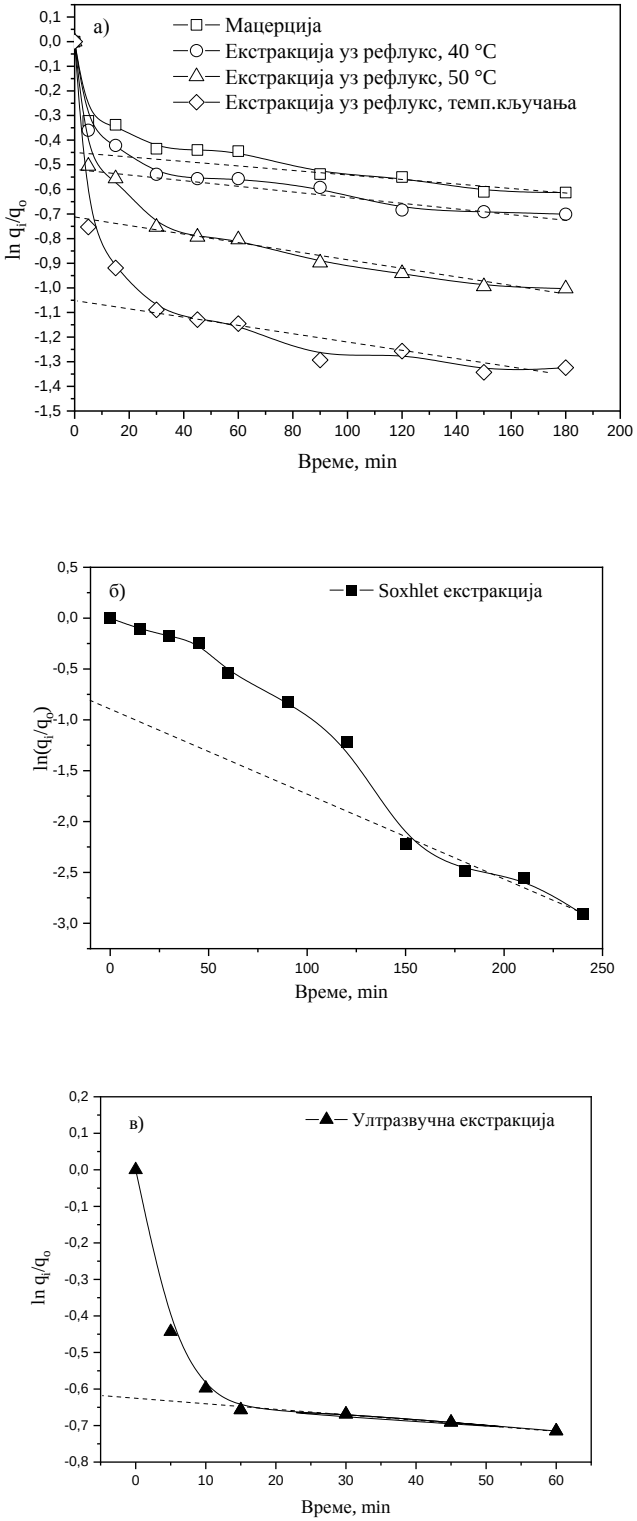
За моделовање кинетике екстракције УЕМ из плода црног бибера коришћена су два кинетичка модела: модел Пономарјева (Ponomarev, 1976; Stanojević et al., 2011) (модел А) и модел заснован на нестационарној дифузији кроз биљни материјал (Veljković and Milenović, 2002) (модел Б).

Зависност $(q_0-q_i)/q_0$ (Модел А) УЕМ од времена екстракције 70% v/v етанолом (различитим техникама екстракције) приказана је на Слици 4.6, док је линеаризована зависност $\ln(q_i/q_0)$ (Модел Б) УЕМ од времена екстракције 70% v/v етанолом (различитим техникама екстракције) дата на Слици 4.7.

Са слике 4.6а се види да су добијене криве кинетике екстракције УЕМ типичне за екстракцију из целуларних материјала (Ponomarev, 1976; Richardson et al., 2002) и да их карактеришу два периода екстракције (Слике 4.6 и 4.7) (Stanković et al., 1994). Први период карактерише брза екстракција у којој се одвија брзо испирање екстрактивних материја растварачем са површине разорених ћелија. У другом периоду одвија се спора молекулска дифузија екстрактивних материја из унутрашњости неразорених ћелија (спора екстракција) (Stanojević et al., 2014). Највећи степен екстракције УЕМ добија се Soxhlet екстракцијом, након 240 минута екстракције (Слика 4.6б).



Слика 4.6 Зависност $(q_0-q_i)/q_0$ од времена екстракције УЕМ: а) мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс (40 °C, 50 °C, темп. кључања), б) Soxhlet екстракцијом, в) ултразвучном екстракцијом



Слика 4.7 Зависност ln q_i/q_o од времена екстракције УЕМ: а) мацерацијом и рефлукс екстракцијом (40 °C, 50 °C, темп.кључања), б) Soxhlet екстракцијом, в) ултразвучном екстракцијом

Коефицијент брзе екстракције расте са повећањем температуре, под утицајем ултразвука, због боље растворљивости екстрактивних материја и повећања коефицијента дифузије, што се објашњава повећањем степена деградације ћелија биљног материјала. Коефицијент споре екстракције такође расте са порастом температуре, услед повећања коефицијента дифузије (краћи пут дифузије екстрактивних материја кроз честице биљног материјала до раствора) и контактне површине чврсто-течност (Veljković and Milenović, 2002). Вредности коефицијената *b* и *k* у кинетичким једначинама за УЕМ екстракцију, времена трајања брзе екстракције и нивоа екстракције за УЕМ екстраховане различитим техникама са оптималном концентрацијом етанола (70% v/v) и оптималним солвомодулом (1:10 m/V), дати су у Табели 4.7.

Табела 4.7 Период брзе екстракције (ПБЕ), степен екстракције (СЕ) у периоду брзе екстракције и вредности коефицијенета *b* и *k* у једначинама кинетике екстракције УЕМ из плода црног бибера према једначинама модела Пономарјева (Модел А) и модела нестационарне дифузије (Модел Б)

Техника екстракције	**ПБЕ, min**	**СЕ, %**	**Модел А**		**Модел Б**	
			b	***k*·10^4, min^{-1}**	***b***	***k*·10^3, min^{-1}**
Мацерација, 180 min	90	41,60	0,367	5,30	0,362	0,95
Екстракција уз рефлукс (40 °C), 180 min	30	41,70	0,396	6,60	0,392	1,23
Екстракција уз рефлукс (50 °C), 180 min	30	52,90	0,514	7,33	0,510	1,77
Екстракција уз рефлукс (темп.кључања), 180 min	30	66,30	0,657	5,00	0,655	1,69
Soxhlet екстракција, 240 min	150	85,10	0,811	5,56	0,687	7,09
Ултразвучна екстракција (25 °C), 60 min	15	45,20	0,437	9,33	0,470	1,31

У периоду брзе екстракције се, спирањем и растварањем екстрактивних материја са површине разорених ћелија биљног материјала екстрахује 41,6–85,10% УЕМ (Табела 4.7). То показује да је уситњеност биљног материјала коришћеног за анализу релативно висока, односно да висок степен разорености ћелија повећава површину са које се у брзом периоду спирају и брзо растварају екстрактивне материје и на тај начин обезбеђује и висок степен њихове екстракције у овом периоду. Степен екстракције у

периоду брзе екстракције Soxhlet екстрацијом износи 85,10%, за време од 150 минута. Ултразвучном екстракцијом се у периоду брзе екстракције остварује степен екстракције од 45,20% за 15 минута. Овом техником екстракције остварује се већи принос УЕМ у периоду брзе екстракције (15 минута) од приноса оствареног у периоду брзе екстракције мацерацијом (90 минута) под истим осталим оперативним условима. Вредност коефицијената *b* већа је за ултразвучну (0,437-Табела 4.7) него за класичну екстракцију мацерацијом (0,367-Табела 4.7). Разлог овоме је највероватније олакшано продирање растварача у честице биљног материјала, повећање брзине преноса масе, као и разарање биљних ћелија под дејством ултразвука. Утицај осталих фактора не може се лако видети, јер је сувише комплексан и вероватно је комбинован са утицајем мешања екстракционог система ултразвуком. Коефицијенти споре екстракције *k* по моделу Пономарјева зависно од технике екстракције су реда величине 5,00–9,33×10^{-4} min^{-1} (Табела 4.7). Ови коефицијенти су битни јер указују на ефикасност продужене екстракције. Што је коефицијент *k* мањи, екстракција дуже траје и мање је ефикасна за преостале материје. Коефицијенти *k* у једначинама кинетике екстракције по моделу нестационарне дифузије (Модел Б, Табела 4.7) већи су од коефицијената *k* у једначинама кинетике екстракције по моделу Пономарјева (Модел А, Табела 4.7). На основу резултата приказаних у Табели 4.7 види се да се кофицијенти *b* у једначинама кинетике екстракције УЕМ по моделу А и В незнатно разликују, изузев у случају Soxhlet екстракције. Ови резултати су у сагласности са претходним истраживањима (Stanojević et al., 2014, Stanojević et al., 2016). Узимајући у обзир добијене резултате, може се закључити да се оба кинетичка модела могу користити за моделовање екстракције УЕМ из плода црног бибера 70% v/v етанолом.

4.2.3 Хемијски састав изолованих екстраката

4.2.3.1 Садржај укупних фенола и флавоноида у етанолним екстрактима црног бибера

На основу једначина калибрационих крива (ј-на 3.10 и ј-на 3.11 – *Експериментални део*) одређен је садржај укупних фенола и флавоноида у етанолним екстрактима. Резултати су изражени по граму сувог екстракта (mg GKE/g с.е. и mg RE/g с.е. за феноле и флавоноиде, редом) и приказани у Табели 4.8.

Добијени резултати указују на то да примењена метода екстракције има значајан утицај на принос укупних фенола и флавоноида из биљног материјала при употреби 70% етанола при солвомодулу 1:10 m/V. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима се повећава са повећањем температуре екстракције, уз пар изузетака, што се може видети у Табели 4.8.

Табела 4.8 Садржај укупних фенола и флавоноида у етанолним екстрактима плода црног бибера добијеним различитим техникама екстракције (мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс (40 °C, 50 °C, температура кључања), Soxhlet и ултразвучном екстракцијом) под оптималним условима екстракције (солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v)

70% EtOH, 1:10	**Укупни феноли**	**Укупни флавоноиди**
	mg GKE/g c.e.	mg RE/g c.e.
Мацерација (180 min)	69,54	59,66
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	76,11	59,80
Екстракција уз рефлукс (50 °C, 180 min)	78,61	60,07
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	79,29	**97,56**
Ултразвучна екстракција (25°C, 60 min)	**85,64**	73,15
Soxhlet екстракција (240 min)	74,75	53,26

Зависност садржаја фенола и флавоноида од температуре и технике екстракције дати су у Табели 4.9.

Табела 4.9 Упоредна анализа садржаја фенола и флавоноида у етанолним екстрактима плода црног бибера добијеним различитим техникама екстракције (мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс (40 °C, 50 °C, температура кључања), Soxhlet и ултразвучном екстракцијом) под оптималним условима екстракције (солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v)

	Технике екстракције
Садржај укупних фенола (mg GKE/g c.e.)	УЕ > РЕ темп.кључ. > РЕ 50 °C > РЕ 40 °C > СЕ > мацерација
Садржај укупних флавоноида (mg RE/g c.e.)	РЕ темп.кључ. > УЕ > РЕ 50 °C > РЕ 40 °C > мацерација > СЕ

Највећи садржај укупних фенола (изражен као mg GKE/g c.e.) утврђен је у екстракту добијеном ултразвучном екстракцијом и износи 85,64 mg GKE/g c.e. (Табела 4.8) (Milenković et al., 2025). Најмањи садржај фенола забележен је код екстракта добијеног мацерацијом на собној температури (69,54 mg GKE/g c.e.). Садржај флавоноида највећи је у екстракту добијеном екстракцијом уз рефлукс на температури кључања (97,56 mg RE/g c.e.). Иако се очекује да садржај фенолних једињења расте са порастом температуре, то се дешава само до одређене границе, и резултати се могу објаснити деградацијом појединих биоактивних компоненти под дејством високих температура у дужем временском периоду (Mitić and Janković, 2017; Milenković-Anđelković, 2017).

У литератури постоји велики број података о садржају фенола и флавоноида у екстрактима црног бибера (Shan et al., 2005; Nahak and Sahu, 2011; Akbar et al., 2014; Lee et al., 2020). Међутим, не постоје доступни подаци који упоређују садржај ових једињења у екстрактима добијеним различитим техникама екстракције под истим условима као у овој студији (70% v/v етанол, солвомодул 1:10 m/V), што чини добијене резултате посебно значајним.

У студији Akbar-a и сарадника садржај укупних фенола (растварач: 96% v/v етанол; време екстракције: 24 h, при солвомодулу 1:10 m/V) износи 140,50 ± 0,8 mg GKE/g екстракта што мало прелази опсег вредности добијене у овој дисертацији, иако се треба узети у обзир да ова вредност важи за сирови екстракт (Akbar et al., 2014).

Према студији из 2018-те у којој су коришћени исти оперативни услови као у овој дисертацији, рефлукс екстракцијом на температури кључања растварача садржај укупних фенола је износио 89,82 ± 1,19 mg GKE/g c.e, а садржај укупних флавоноида 17,14 ± 0,24 mg RE/g c.e. (Milenković, 2018). У поређењу са резултатима добијеним у овој дисертацији постоји извесна сличност, с тим што одступања генерално могу да се припишу факторима који утичу на садржај фенола у биљном материјалу, попут сорте, генотипа, климатских услова, сладиштења сировине, обраде, итд. (Yılmaz-Düzyaman et al., 2023; Martini et al., 2014). У поређењу са сродним врстама, као што је *Piper cubeba*, етанолни екстракти црног бибера добијени рефлукс екстракцијом (96% v/v етанол; време екстракције: 2 h, солвомодул 1:10 m/V) показали су виши садржај укупних фенола и флавоноида, као и бољу антиоксидативну активност (Stanojević et al., 2024).

Литературни подаци показују разлику у садржају фенолних једињења у плодовима црног бибера који су обрађени и сушени на различите начине (црни, бели, зелени). Садржај фенола у плодовима црног бибера (незрео плод, неољуштен, третиран

врелом водом и сушен) је најмањи, затим следе плодови белог бибера (потпуно зрео плод, ољуштен), и на крају са највећим садржајем су плодови зеленог бибера (неољуштен, незрео плод) (Shan et al., 2005; Nahak and Sahu, 2011). Посебно занимљива чињеница је да перикарп (спољашњи омотач плода) црног бибера садржи изразито високе концентрације фенола и флавоноида: 1421,95 ± 22,35 mg GKE/100 g и 983,82 ± 8,19 mg еквивалената катехина/100 g, редом (Lee et al., 2020). Ови резултати сугеришу да се значајан део биоактивних компоненти налази управо у деловима биљке који се често одбацују током индустријске обраде, што представља потенцијал за коришћење нуспроизвода у производњи функционалних додатака исхрани или фармацеутских препарата. Садржај фенола и флавоноида у црном биберу такође варира у зависности од растварача коришћеног за екстракцију. Gülçin (2005) је показао да водени екстракти црног бибера могу имати чак виши садржај укупних фенола (54,3 μg GAE/mg екстракта) него етанолни екстракти (42,8 μg GAE/mg), чиме се потврђује значај избора растварача за оптимизацију екстракције фенолних компоненти (Gülçin, 2005).

Литературни подаци о садржају фенола и флавоноида у етанолним екстрактима црног бибера добијеним на температурама од 40 °C и 50 °C нису пронађени, што чини ове резултате посебно значајним јер први указују на утицај температуре на екстракцију ових једињења и отварају простор за даљу примену у индустрији.

4.2.3.2 UHPLC-DAD-MS/MS анализа етанолних екстраката плода црног бибера

Резултати UHPLC-DAD-MS/MS анализе за анализу ***пиперина и осталих пиперамида*** у позитивном режиму јонизације (+ESI), укључујући идентификована једињења и податке UV-Vis и MS/MS спектара, приказани су у Табели 4.10, док су одговарајући хроматограми представљени на Слици 4.8.

Табела 4.10 Хемијски састав етанолних екстраката плода црног бибера добијених различитим техникама екстракције анализиран применом UHPLC-DAD-MS/MS методе (+ESI)

Пик Бр	***t*R, min MS**	**λ_{max}, nm**	**Молекулски јон $[M+H]^+$ [a]$[M]^+$ [b]$[M+Na]^+$ [c]$[2M+H]^+$ [d]$[2M+Na]^+$ *m/z***	**MS/MS фрагментациони јони**	**Идентификовано једињење/Литература**	1	2	3	4	5	6
1	6,77	294 319	314 (336[b])	177(100%),145,117	н.и.	+	+	+	+	+	+
2	8,61	341	288	203(100%),152,137 ,115	*cis/trans*-пиперанин (Liang et al. 2021)	±	+	+	±	±	+
3	9,53	344 312sh	272	201(100%)/202,171 ,135	пиперилин (Dawid et al., 2012)	+	+	+	+	+	+
4	10,26	340 310sh	274	201(100%),173,135	*cis/trans*-пиперлонгуминин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
5	10,29	341 310sh	276	203/202/201,175,16 1,135(100%)	дихидропиперлонгуминин (Borkar et al., 2012)	±	+	+	+	+	+
6	10,70	-	288	288,201/202(100%) /203,175,161,135,8 6	*cis/trans*-пиперанин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
7	10,78	344 312sh	286 (308[b], 571[c],593[d])	201(100%),161,171 ,135	пиперин (*E*,*E*-(*trans-trans*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+	+	+	+	+	+
8	11,01	344 312sh	286	201(100%),171,135	изокавицин (*E*,*Z*-(*trans-cis*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+	+	+	+	+	+
9	11,72	258	314	228(100%)/229,201 ,171,161,131,112	пипердардин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
10	11,74	359	312 (334[b],645[d])	227(100%),197,112	пиперетин – изомер 1 (Liang et al., 2021)	±	+	+	±	±	+
11	12,01	353	312	227(100%),197,112	пиперетин – изомер 2 (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
12	12,02	263 306	326	255,227(100%),197 ,165,98	1-[(2E,4E,8E)-9-(3,4-метилендиоксибензил)-2,4,8-нонатриеноил]пиролидин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
13	12,03	262 308	316	231,213(100%),194 ,135	пиперолеин А (Liang et al., 2021)	±	+	+	±	+	±
14	12,27	276	328	255,227(100%)/229 ,197,187,173,161,1 31	ретрофрактамид (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
15	12,35	264	224	168,151,133,123,10 9,95,81,69	пелиторин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
16	12,55	263	340	322,255,227(100%) ,197,179,112	дехидропиперноналин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+	+
17	12,99	263 306	356	283,265,255,234,21 5,135(100%)	пиперцид (Liang et al., 2021)	±	+	+	±	+	+

Наставак Табеле 4.10

18	13,02	362 307	344	241,222,211,185,175,145,135(100%),112	пиперолеин Б (Liang et al., 2021)	+	+	±	+	±	±
19	13,26		332	303,240(100%),173	н.и.	+	±	+	±	±	+
20	14,82	279	332	233,231,135(100%),121	дехидроретрофрактамид C – изомер (Liang et al., 2021)	±	+	+	+	+	+
21	15,51	260	334	306,292,149,135,121(100%),109	н.и.	+	+	+	±	+	+
22	16,32	264	312	256(100%),228,144,130	н.и.	±	±	±	+	±	±
23	16,62	260	336	294,280(100%),109	н.и.	+	±	±	+	±	+
24	16,78	259	362	289(100%),261,163,159,137,121,107	*N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид (Dawid et al., 2012)	+	+	+	+	+	+

[b] – https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay

[c] – https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound

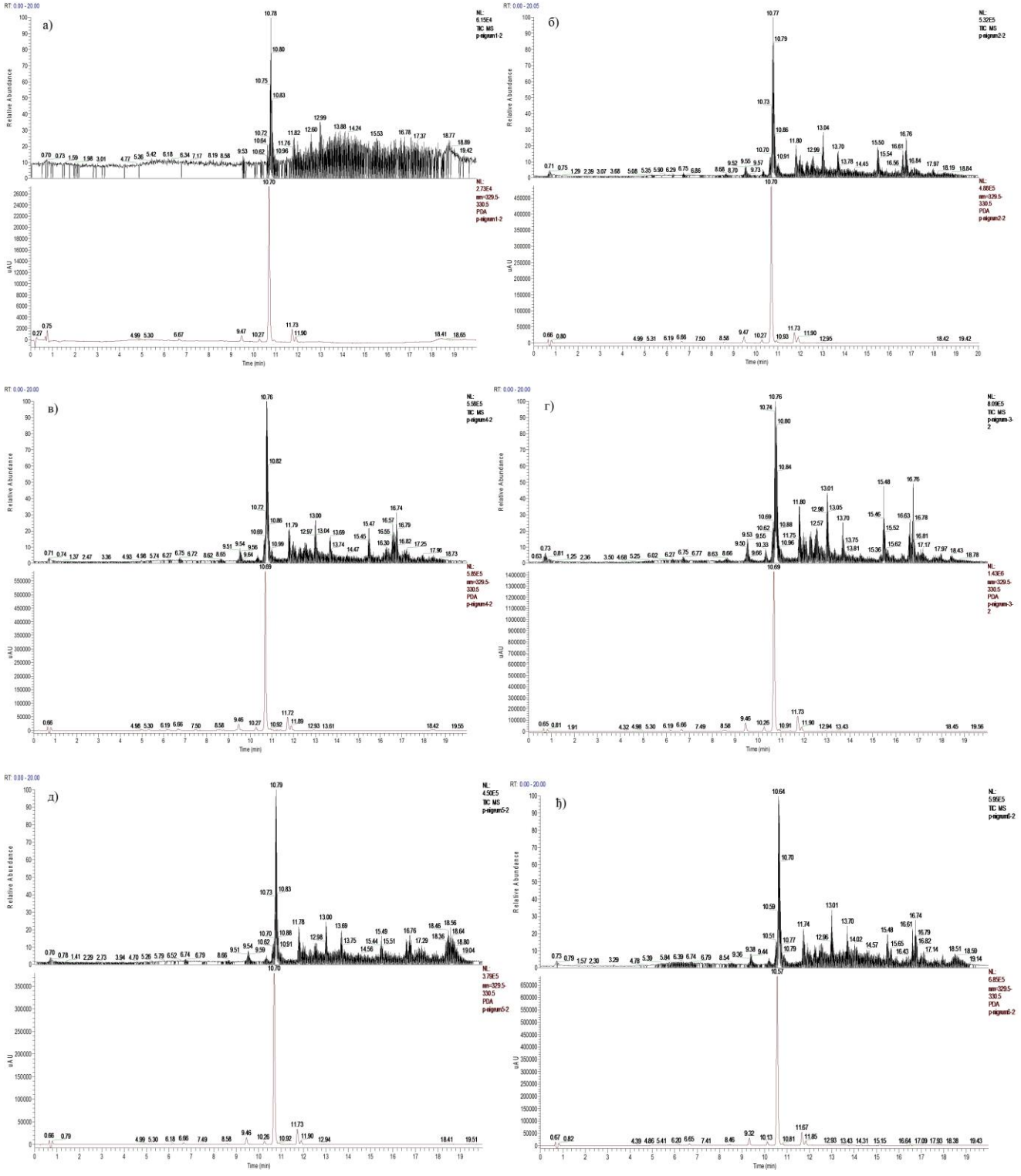
± – слабије присуство детектоване компоненте; MS/MS спектар није, али је детектован пик молекулског јона;

н.и. – није идентификован;

sh – таласна дужина апсорпције у облику рамена за пик у UV-Vis спектру;

_ – подвучени фрагментациони јони са веома израженим интезитетима, који су по вредностима блиски главном, најинтензивнијем јону, код кога је интензитет постављен на 100% (у MS/MS спектрима)

*1-мацерација; 2-екстракција уз рефлукс на 40 °C, 3-екстракција уз рефлукс на 50 °C, 4-екстракција уз рефлукс на температури кључања; 5-ултразвучна екстракција, 6-Soxhlet екстракција



Слика 4.8 UHPLC-MS (горе) и UHPLC-DAD (на 330 nm, доле) хроматограми етанолних екстраката црног бибера добијених различитим техникама екстракције у позитивном режиму јонизације (+ESI): а) мацерација; б) екстракција уз рефлукс на 40 °C; в) екстракција уз рефлукс на 50 °C; г) екстракција уз рефлукс на температури кључања; д) ултразвучна екстракција; ђ) Soxhlet екстракција

У позитивном режиму јонизације (+ESI), укупно је детектовано двадесет четири једињења у свим проучаваним етанолним екстрактима црног бибера, од којих пет није идентификовано. За идентификована једињења бр. 2, 3, 4, 6, 7 и 8, чији су *m/z* вредности молекулских јона приказани у Табели 4.10, забележени су карактеристичан фрагментациони јони највећег интензитета (100%) на *m/z* 203, 202, или 201, а који потичу од цепања на карбоксамидној групи у тим једињењима при чему се добија катјон, $C_{12}H_9O_3^+$. Код једињења бр. 7 (пиперин), уочени су карактеристични молекулски, катјонизовани јони са Na и протоновани јони одговарајућих димера (који су неретка појава у ESI-MS спектрометрији) на *m/z* 286 $[M+H]^+$, 308 $[M+Na]^+$, 571 $[2M+H]^+$ и 593 $[2M+Na]^+$, поред карактеристичне фрагментације (Liang et al., 2021). Једињења бр. 5, 17, 18 и 20 такође показују фрагментациони јон на *m/z* 135, што може указивати на формирање метилен-диоксибензил катјона ($C_8H_7O_2^+$), који је предложио Liang са сарадницима (2021). За једињења бр. 9, 10, 11, 12, 14 и 16, детектован је фрагментациони јон највећег интензитета (100%) на вредностима *m/z* 227 или 228, који одговарају цепању на карбоксамидној групи датих једињења, при чему се добија катјон $C_{14}H_9O_3^+$ (Liang et al., 2021). Једињење бр. 13 молекулског јона на *m/z* 316, показало је интензиван фрагментациони јон на *m/z* 213 (100%) као и остале јоне, док је за једињење бр. 15, идентификованог као пелиторин, регистрован протоновани молекул, тј. $[M+H]^+$ јон на *m/z* 224, уз фрагменте на *m/z* 168, 151 168 и друге (Hiserodt et al., 2004; Liang et al., 2021). Електроспреј-MS анализа једињења бр. 24 потврдила је његову структуру на основу присуства молекулског јона на *m/z* 362 и интензивног фрагментационог јона на *m/z* 289, који одговара ацилном остатку након цепања на карбоксиамидној вези молекула ($C_{20}H_{33}O^+$); на основу овога, ацилни део је идентификован као 2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриеноил група (Dawid et al., 2012).

У циљу идентификације ***фенолних једињења*** у етанолним екстрактима, извршена је UHPLC-DAD-MS/MS анализа екстраката у негативном режиму електроспреј јонизације (-ESI), у другачијим хроматографским условима у односу на претходну анализу.

Списак детектованих фенолних једињења у негативном режиму јонизације у етанолним екстрактима црног бибера добијеним различитим техникама екстракције, заједно са њиховом идентификацијом и подацима UV-Vis и MS/MS спектара, приказан је у Табели 4.11, док су одговарајући хроматограми представљени на Слици 4.9.

Табела 4.11 Хемијски састав етанолних екстраката плода црног бибера добијених различитим техникама екстракције анализиран применом UHPLC-DAD-MS/MS методе (-ESI)

Пик Бр.	t_R, min **MS**	λ_{max}, nm	**Молекулски јон [M-H]$^-$ [a][M-H+HCOOH]$^-$ *m/z***	**MS/MS фрагментнациони јони**	**Идентификовано једињење/Литература**	1	2	3	4	5	6
1	0,87	-	191	172,147,111(100%)	лимунска киселина	+	+	+	+	+	+
2	1,00	-	191	173,145,111(100%)	изолимунска киселина	+	+	+	+	+	+
3	2,53	-	361	315	н.и.	+	+	-	-	-	-
4	4,07	257	-	-	н.и.						
5	5,70	277	477[a]/431	431(100%),408/409	форситозид D (Olalere et al., 2019)	+	+	+	+	+	+
6	6,35	267	489	442,359,197(100%)	н.и.	+	+	-	-	+	+
7	6,58	-	593	503,473,383,357,353(100%),327	лутеолин-*C*-хексозид-*O*-рамнозид (Figueirinha et al., 2008)	+	-	-	-	+	+
8	7,58	279 357	327	197(100%),129	н.и.флавоноид	+	-	-	-	-	+
9	7,61	279 357	327	197(100%),129	н.и.флавоноид	+	+	+	+	+	+
10	7,76	254 350	593	473,429,357,327(100%),309	лутеолин-*C*-хексозид-*O*-рамнозид (Figueirinha et al., 2008)	-	-	-	+	+	+
11	7,98	269 340	577	413(100%),311,293	апигенин-*C*-хексозид (глукозид или галактозид)-*O*-рамнозид (Ferreres et al., 2007)	+	+	+	+	+	+
12	8,20	269 339	577	501,413(100%),341,311,293	апигенин-*C*-хексозид (глукозид или галактозид)-*O*-рамнозид (Ferreres et al., 2007)	+	+	+	+	+	+
13	8,83	294	[a]328	313,259,191,178/175,161/160,149,135(100%)	*N*-кумароилтарамин $C_{17}H_{17}NO_3$ (Olalere et al., 2019)	+	-	-	-	-	+
14	8,89	296	[a]328	313,191/193,179/175,161(100%),151,135	*N*-кумароилтарамин $C_{17}H_{17}NO_3$ (Olalere et al., 2019)	+	+	+	+	+	+
15	9,42	266 350	563	417,399,327,285(100%),175	лутеолин-деоксихексозил-пентозид (Figueirinha et al., 2008)	+	+	+	+	+	+
16	9,80	296sh 319	312	297,178(100%),135	мупинамид $C_{18}H_{19}NO_4$ (Olalere et al., 2019)	+	+	+	+	+	+
17	10,07	-	401	354,268(100%)/269,191	апигенин-пентозид	+	+	+	+	+	+
18	10,13	-	401	268(100%)/269	апигенин-пентозид	+	+	+	+	+	+
19	10,33	268 337	547	269(100%)	апигенин-пентозид - рамнозид	+	+	+	+	+	+
20	12,20	263 339	269	-	апигенин (стандард)	+	+	+	+	+	+
21	12,60	283 340	-	-	н.и. – флавоноид, изофлавон или флаванон	+	+	+	+	+	+

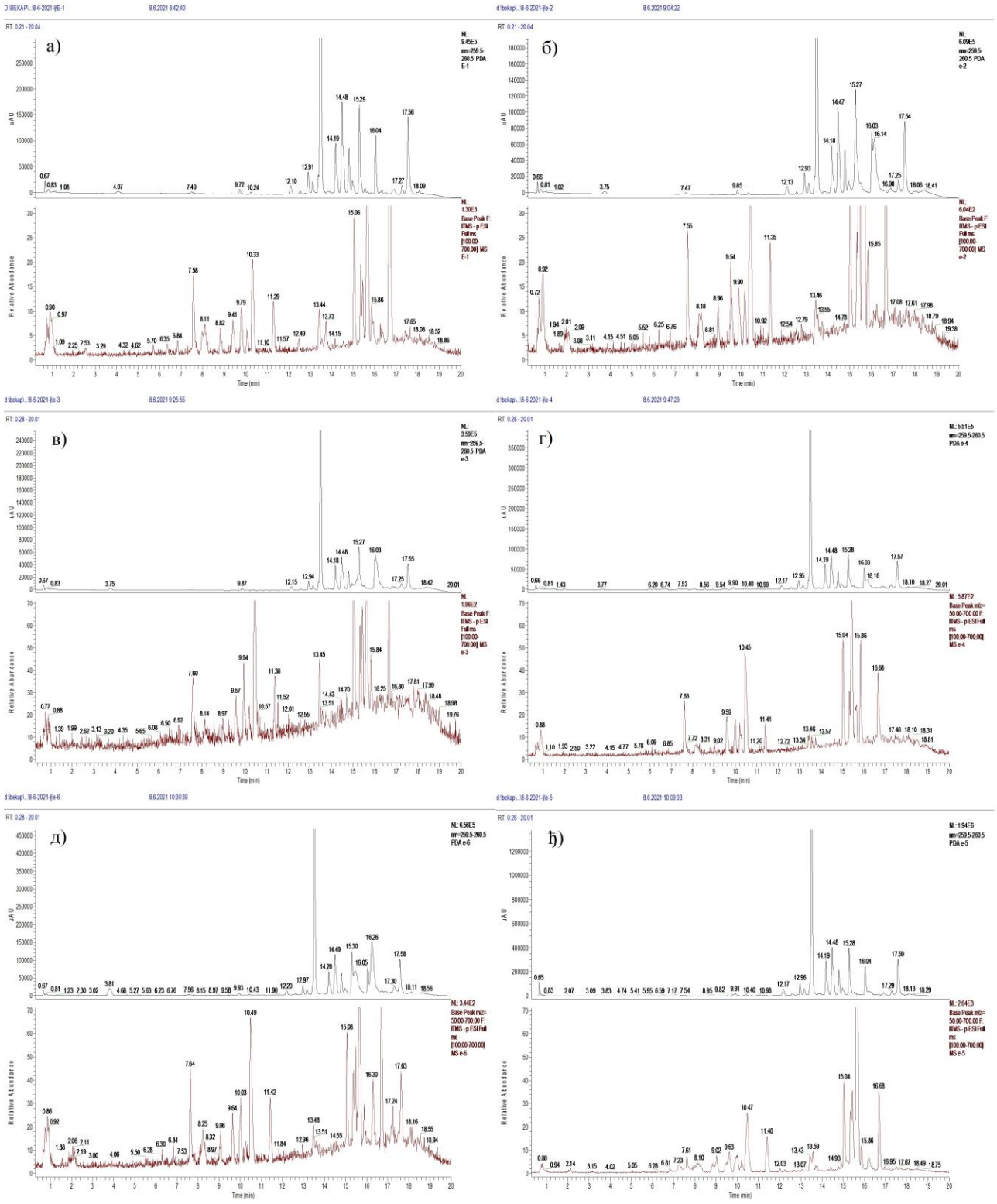
Наставак Табеле 4.11

22	13,50	344 312sh	(+ESI) 286	201(100%)	пиперин (Kozukue et al., 2007)	+	+	+	+	+	+
23	15,05	264	265[a]	97(100%),79.80,197,133	2,6-ди-терц-бутил-4-хидрокситолуен (Oleorere 2019)	+	+	+	+	+	+
24	15,34	264 300	309[a]	265,97(100%)	COO-дериват 2,6-ди-терц-бутил-4-хидрокситолуена	+	+	+	+	+	+
25	16,68	262	339	163(100%)	н.и.	+	+	+	+	+	+

н.и. – није идентификован;

_ – подвучене су таласне дужине апсорпционих максимума трака које су изразито интензивне у UV-Vis спектру, дајући му карактеристичан изглед за класу датог детектованог једињења;

*1-мацерација; 2-екстракција уз рефлукс на 40 °C; 3-екстракција уз рефлукс на 50 °C; 4-екстракција уз рефлукс на температури кључања; 5-ултразвучна екстракција; 6-Soxhlet екстракција



Слика 4.9 UHPLC-MS (доле) и UHPLC-DAD (на 260 nm, горе) хроматограми етанолних екстраката црног бибера добијних различитим техникама екстракције у негативном режиму јонизације (-ESI): а) мацерација; б) екстракција уз рефлукс на 40 °C; в) екстракција уз рефлукс на 50 °C; г) екстракција уз рефлукс на температури кључања; д) ултразвучна екстракција; ђ) Soxhlet екстракција

Укупно двадесет пет једињења је детектовано у негативном режиму јонизације (-ESI), у готово свим испитиваним етанолним екстрактима црног бибера, од којих је седам остало неидентификованих (Табела 4.11).

На основу масено-спектрометријских података и редоследа елуације, лимунска и изолимунска киселина су идентификоване као органске киселине са молекулским јонима $[M–H]^-$ на *m/z* 191, али на различитим ретенционим временима. Фрагментацијом ових јона добијен је доминантан фрагмент *m/z* 111 (100%), што одговара губитку два молекула воде и угљен-диоксида ($[M–H–CO_2–2H_2O]^-$), што сама структура овог једињења дозвољава. Форситозид D, једињење групе фенилетаноидних гликозида, идентификован је на основу молекулског јона $[M–H]^-$ при *m/z* 431 и адукт-јона $[M–H+HCOOH]^-$, *m/z* 477 (у Табели 4.11 су приказани фрагментациони јони који потичу од фрагментације јона-адукта, $[M–H+HCOOH]^-$). Лутеолин-*C*-хексозид-*O*-рамнозид показао је молекулски јон на *m/z* 593, што указује на могуће присуство лутеолина у облику гликозида са једним хексозидом и једним дезоксихексозидом (два изомерна једињења под редним бројем 7 и 10 у Табели 4.11). Фрагментацијом су добијени јони *m/z* 353 (100%) и *m/z* 327 (100%) – бр. 7 и бр. 10, што је у литератури показано као карактеристично за *C*-гликозил флавоноиде. Наиме, према наводима Figueirinha и сарадника (2008), веће вредности за 71 и 41 Da у односу на агликон, указују на присуство *C*-гликозидне везе, при чему детектовани јони на вредностима *m/z* 357 и 327 (једињења бр. 7 и 10), директно указују на то да лутеолин (286 Da) може бити основни агликон (357 = 286 + 71; 327 = 286 + 41).

Једињења 11 и 12 су такође детектована на истој вредности молекулског јона $[M–H]^-$, *m/z* 577, за различита времена елуације, што указује на постојање изомера. Фрагмент *m/z* 311 је идентификован као јон који потиче од агликона апигенина повећан за 41 Da (270+41), који је се може детектовати код *O*-гликозил-*C*-гликозил флавона (Ferreres et al., 2007). Присуство базног фрагментационог јона највећег интензитета *m/z* 413 (100%) код оба изомера, указује на губитак од 164 Da, што одговара губитку рамнознидне јединице и молекула воде (146+18). Ипак, потпуно исправан положај шећерних јединица у молекулима на основу добијених спектара се не може утврдити на основу анализа коришћених у овој докторској дисертацији.

За једињења 13 и 14, претпостављене су структуре изомера *N*-кумароилтарамина (могуће *cis*/*trans*). За оба је детектован молекулски адукт-јон $[M–H+HCOOH]^-$ на *m/z*

328 (Olalere et al., 2019), као и главни фрагментациони јони на вредностима *m/z* 135 (100%) и *m/z* 161 (100%).

Једињење 15 је идентификовано као дериват лутеолина, што је потврђено на основу UV-Vis и MS/MS спектара. Присутан је молекулски јон на *m/z* 563, као и фрагментациони јон *m/z* 285 (100%) који одговара лутеолину као агликону (Figueirinha et al., 2008). Мупинамид, једињење под редним бројем 16, (или *N*-trans-ферулоилтирамин) је показао молекулски јон $[M–H]^-$ на *m/z* 312 (Olalere et al., 2019), са главним, најинтензивнијим јоном у MS/MS спектру на *m/z* 178.

Једињења 17, 18 и 19 представљају гликозиде апигенина, два са пентозом и једно са рамнозом. Идентификована су на основу губитка од 132 Da (пентоза) и 146 Da (рамноза) у негативном режиму јонизације. Сви су дали карактеристичне главне фрагментационе јоне *m/z* 268 и/или 269, који указују на присуство апигенина као агликона. Пиперин (једињење под редним бројем 22), иако пре свега алкалоид, такође је детектован у негативном режиму, али је у овом случају идентификација додатно извршена у позитивном јонизационом режиму (+ESI) са молекулским јоном на *m/z* 286 и главним фрагментом *m/z* 201 (који одговара цепању на карбоксамидној групи, $C_{12}H_9O_3^+$Kozukue et al., 2007).

Једињења 23 и 24 су идентификована као бутиловани хидрокситолуен (BHT) и његов дериват, са адукт-јонима $[M–H+HCOOH]^-$ на *m/z* 265 и 309. Иначе, ова једињења су уобичајено присутна у екстрактима олеорезина (Olalere et al., 2019).

Квантитативно, садржај пиперина у етанолним екстрактима (изражен у g пиперина/100 g екстракта и g пиперина/100 g сувог биљног материјала), одређен је применом UHPLC-DAD анализе (Табела 4.12). За одређивање концентрације пиперина у узорцима припремљени су стандардни раствори пиперина у метанолу, у опсегу концентрација од 0,00625 до 0,4 mg/cm^3, након чега је конструисана стандардна, калибрациона крива пиперина. Једначина калибрационе криве пиперина (на основу које је одређена концентрација пиперина у узорцима) дата је у *Експерименталном делу* (ј-на 3.12).

Табела 4.12 Утицај технике екстракције на садржај пиперина етанолним екстрактима одређен UHPLC-DAD анализом

Узорци	**g пиперина/100 g сувог ектракта**	**g пиперина/100 g биљног материјала**
Мацерација (180 min)	1,134	0,103
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	26,402	2,640
Екстракција уз рефлукс (50 °C, 180 min)	31,362	3,795
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	47,268	6,617
Ултразвучна екстракција (25 °C, 60 min)	20,442	2,003
Soxhlet екстракција (240 min)	38,032	7,009

У овом истраживању, садржај пиперина у етанолним екстрактима кретао се у опсегу од 0,1 до 7,0 g/100 g биљног материјала (тј. 0,1-7,0%), при чему су најниже вредности добијене мацерацијом, а највише екстракцијом по Soxhlet-у и екстракцијом уз рефлукс на температури кључања. Ови резултати су нешто нижи у односу на податке из литературе, где Tripathi (2022) наводи да садржај пиперина у плодовима рода *Piper* износи 2–7,4%, док Gorgani и сарадници (2017) извештавају да се применом секвенцијалне микроталасно-ултразвучне методе добија екстракт са око 46,6 mg/g, односно 4,66% пиперина (Tripathi et al., 2022; Gorgani et al., 2017). Слично томе, Lwamba и сарадници (2023) су користећи „зелене“ растваче – NADES (енг. *Natural Deep Eutectic Solvents*) добили екстракте са садржајем пиперина од 38,8–39,1 mg/g (~3,9%). Упоређујући ове резултате, може се закључити да су добијени етанолни екстракти у овој дисертацији упоредиви са вредностима наведеним у литератури (Tripathi et al., 2022; Gorgani et al., 2017; Lwamba et al., 2023). Разлике могу бити последица поларности коришћеног растварача, услова екстракције, као и сортних и морфолошких карактеристика биљног материјала.

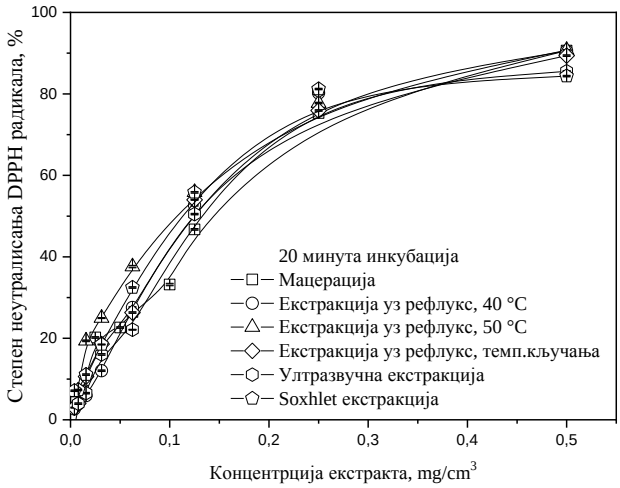
4.2.4 Биолошке активности етанолних екстраката плода црног бибера

4.2.4.1 Антиоксидативна активност екстраката

4.2.4.1.1 DPPH тест

Антиоксидативна активност екстраката добијених различитим техникама екстракције из плода црног бибера је анализирана DPPH тестом. Степен неутралисања

DPPH радикала у зависности од концентрације етанолних екстраката добијених различитим техникама екстракције под оптималним условима (солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v) приказан је на Слици 4.10.



Слика 4.10 Степен неутралисања DPPH радикала у зависности од повећања концентрације етанолних екстраката добијених мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, 50 °C и температури кључања, ултразвучном и Soxhlet екстракцијом под оптималним условима екстракције
(солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v)

У табели 4.13 приказане су EC_{50} вредности етанолних екстраката из плода црног бибера добијеним различитим техникама екстракције при оптималним условима (70% v/v етанол, солвомодул 1:10 m/V).

Табела 4.13 EC_{50} вредности етанолних екстраката плода црног бибера добијене применом DPPH теста

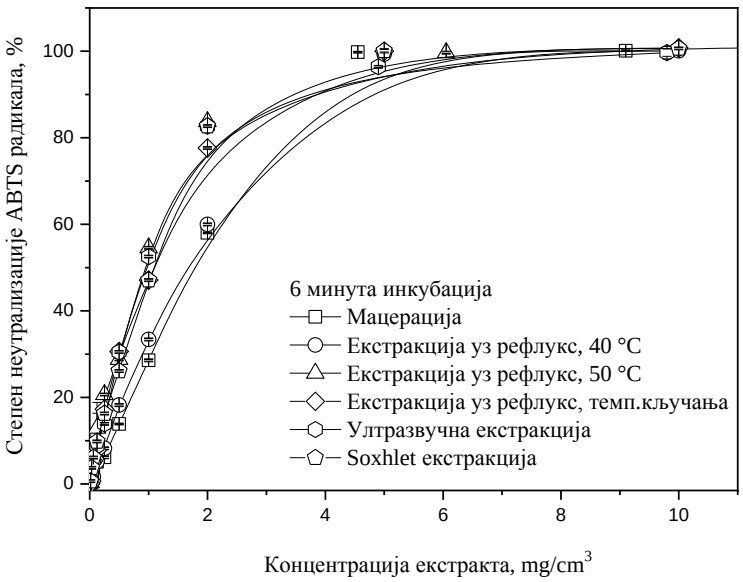
Екстракт	**EC_{50}, DPPH mg/cm^3 ±sd.**
	20 минута инкубација
Мацерација (180 min)	0,152 ± 0,0010
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	0,138 ± 0,0007
Екстракција уз рефлукс. (50 °C, 180 min)	0,133 ± 0,0003
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	**0,112 ± 0,0012**
Ултразвучна екстракција (25 °C, 60 min)	0,142 ± 0,0004
Soxhlet екстракција (240 min)	0,120 ± 0,0007
BHT	0,045 ± 0,0001
BHA	0,0079±0,00001

Антиоксидативна активност екстраката добијених различитим техникама екстракције опада следећим редоследом: PE темп. кључања > CE > PE 50 °C > PE 40 °C > УЕ > мацерација (Табела 4.13). Као што се може видети из Табеле 4.13, боља антиоксидативна активност екстраката добијена је екстракцијом уз рефлукс на температури кључања (најнижа EC_{50} вредност) и Soxhlet екстракцијом у односу на екстракцију уз рефлукс на нижим температурама, мацерацију и ултразвучну екстракцију (Табела 4.13). Ово је највероватније последица примене већих температура услед чега се повећава растворљивост биоактивних компоненти, као и циркулаторног тока растварача (у случају Soxhlet екстракције) којим се у потпуности исцрпљује биљни материјал. Иако највећу антиоксидативну активност показује екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на температури кључања, ово није у складу са резултатима о садржају фенола (Табела 4.8), што значи да за антиоксидативну активност екстракта могу бити одговорна и друга екстрахована једињења.

Антиоксидативна активност одређена DPPH тестом у овој дисертацији у сагласности је са резултатима студије из 2018. године са сличним оптималним условима екстракције (солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 96% v/v), када је EC_{50} вредност за екстракцију уз рефлукс на температури кључања растварача, за период инкубације од 20 минута била 0,104 mg/cm³ (Milenković, 2018). У студији Nahak и Sahu-a (2011) показано је да је етанолни екстракт бибера имао најбољу антиоксидативну активност у свим анализираним концентрацијама у односу на водене и метанолне екстракте. Иако је садржај укупних фенола у црном биберу био готово упола мањи у односу на кубеба бибер (*Piper cubeba* L.), црни бибер је показао двоструко већу антиоксидативну активност. Ово указује да антиоксидативна активност црног бибера није условљена само фенолним једињењима, већ и другим биоактивним супстанцама, као што су алкалоиди, као и могућим синергистичким ефектом фенола и других биомолекула (Nahak and Sahu, 2011).

4.2.4.1.2 ABTS тест

ABTS радикал је погодан због високе стабилности у широком опсегу pH, а антиоксидативна активност се може одредити у узорцима растворљивим и у води и у органским растварачима. Степен неутралисања ABTS радикала у зависности од концентрације етанолних екстраката добијених различитим техникама екстракције при оптималним условима дат је на Слици 4.11.



Слика 4.11 Степен неутралисања ABTS радикала у зависности од концентрације етанолних екстраката добијених мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, 50 °C, на температури кључања, ултразвучном и Soxhlet екстракцијом под оптималним условима екстракције (солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v)

Степен неутралисања ABTS радикала код екстраката расте са порастом концентрације свих узорака инкубираних 6 минута са радикалом (Слика 4.11). У Табели 4.14 приказане су EC_{50} вредности етанолних екстраката плода црног бибера добијених различитим техникама екстракције при оптималним условима (солвомодул 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v). Антиоксидативна активност екстраката добијених различитим техникама екстракције опада следећим редоследом: РЕ темп. кључања > УЕ > СЕ > РЕ 50 °C > РЕ 40 °C > мацерација.

Табела 4.14 EC_{50} вредности етанолних екстраката плода црног бибера добијене применом ABTS теста

Екстракт	**EC_{50}, ABTS mg/cm^3 ± sd.** 6 минута инкубација
Мацерација (180 min)	1,73 ± 0,008
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	1,63 ± 0,012
Екстракција уз рефлукс (50 °C, 180 min)	1,110 ± 0,007
Екстракција уз рефлукс (температура кључања, 180 min)	**1,010 ± 0,002**
Ултразвучна екстракција (25 °C, 60 min)	**1,010 ± 0,005**

Наставак табеле 4.14

Soxhlet екстракција (240 min)	1,110 ± 0,004
BHT	0,080 ± 0,0084

Као што се може видети из Табеле 4.14, боља антиоксидативна активност екстраката остварена је екстракцијом уз рефлукс на температури кључања у односу на екстракцију уз рефлукс на нижим температурама и мацерацију на собној температури. Зависност је аналогна оној добијеној применом DPPH теста.

Оно што се издваја јесте степен неутралисања ABTS радикала екстрактом изолованим ултразвучном екстракцијом. Ово одступање није случајно и може се објаснити чињеницом да су фенолна једињења ефикасни донори водоника, што их чини веома добрим антиоксидансима (Vinson et al., 2001). Посебно су значајни флавоноиди, чије су фармаколошке активности уско повезане са њиховим функционалним групама (O'Byrne et al., 2002). Ултразвучна екстракција на собној температури поспешује ефикасно издвајање фенолних једињења. С обзиром на то да су фенолна једињења растворљива у поларнијим растварачима, постоји могућност боље интеракције са ABTS радикалом.

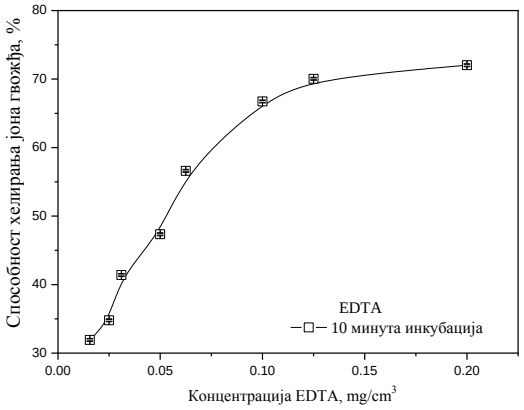
Стога, сматра се да постоји повољнија интеракција изолованих фенолних једињења са реакционим медијумом у ABTS тесту. Поједина биоактивна једињења можда нису растворљива у одређеном растварачу или смеши растварача и због тога не могу испољити своју антиоксидативну активност. Hagerman и сарадници (1998) су закључили да феноли са већом молекулском масом имају већу способност уклањања слободних радикала ($ABTS^{\bullet+}$), те да њихова ефикасност зависи од молекулске масе, броја ароматичних прстенова и положаја хидроксилних група, који могу бити кључни за исказивање снажне антиоксидативне активности (Hagerman et al., 1998; Okawa et al., 2001).

У овој дисертацији добијене су значајно више вредности степена неутралисања ABTS радикала у поређењу са резултатима рада Ökmen-a и сарадника (2017). Степен неутралисања ABTS радикала екстрактом добијеним Soxhlet екстракцијом (при концентрацији од 250 mg/cm^3) износио је 13,2% (Ökmen et al., 2017), док је у овој дисертацији екстракт добијен Soxhlet екстракцијом при концентрацији од 2 mg/cm^3 показао степен неутралисања од чак 83%. Ово одступање се може објаснити бројним факторима који утичу на садржај биоактивних једињења у биљном материјалу, као што

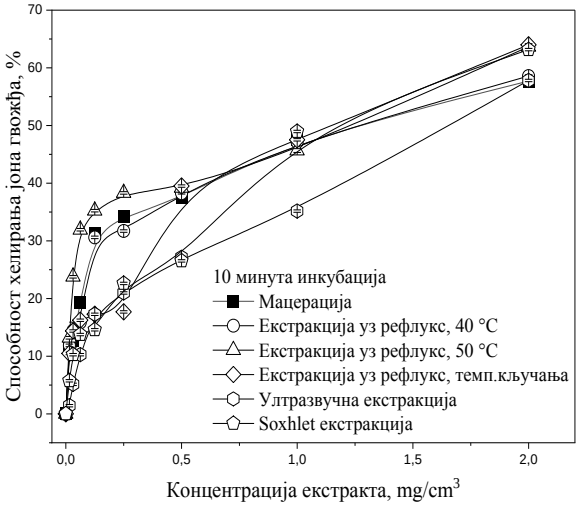
су сорта, генотип, климатски услови, начин складиштења сировине и њене прераде (Dai and Mumper, 2010).

4.2.4.1.3 FIC тест

Способност хелирања јона гвожђа етанолним екстрактима плода црног бибера и раствора EDTA приказана је на Сликама 4.12 и 4.13.



Слика 4.12 Способност хелирања јона гвожђа раствором EDTA



Слика 4.13 Способност хелирања јона гвожђа етанолним екстрактима плода црног бибера добијеним мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, 50 °C, и температури кључања, ултразвучном екстрацијом и Soxhlet екстракцијом, под оптималним условима екстракције (солвомодул: 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v)

У Табели 4.15 су приказане EC_{50} вредности етанолних екстракта из плода црног бибера добијених различитим техникама екстракције при оптималним условима (солвомодул: 1:10 m/V; концентрација етанола: 70% v/v).

Табела 4.15 EC_{50} вредности етанолних екстраката плода црног бибера добијене применом FIC теста

Екстракт	**EC_{50}, FIC mg/cm³ ±sd.**
	10 минута инкубација
Мацерација (180 min)	1,353 ± 0,0006
Екстракција уз рефлукс (40°C, 180 min)	1,319 ± 0,0170
Екстракција уз рефлукс (50°C, 180 min)	1,197 ± 0,0146
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	**1,146 ± 0,0155**
Ултразвучна екс. (25 °C, 60 min)	1,646 ± 0,0046
Soxhlet екстракција (240 min)	1,327 ± 0,0099
EDTA	0,0517 ± 0.0006

Антиоксидативна активност екстраката добијених применом различитих техника екстракције опада следећим редоследом: PE темп. кључања> PE 50 °C> PE 40 °C > Soxhlet екстракција > мацерација > УЕ. Екстракти плода црног бибера показали су највећу способност хелирања јона гвожђа при концентрацији од 2 mg/cm³, при чему су највећу ефикасности постигли екстракти добијени екстракцијом уз рефлукс на температури кључања и на 50 °C (Слике 4.12 и 4.13). Хелирајући ефекат EDTA (опсег концентрација 0,0156–0,2 mg/cm³) је знатно бољи од добијених екстраката (Слика 4.12). Максимална активност EDTA постигнута је при концентрацији од 0,2 mg/cm³ и износила је око 72%.

Постоје научни докази о позитивној корелацији између способности хелирања јона гвожђа и садржаја укупних фенола (Budhiyanti et al., 2011). Способност хелирања јона метала коју показују фенолна једињења у функцији је њихове карактеристичне структуре, броја и положаја хидроксилних група (Khokhar and Apenten, 2003).

Антиоксиданси који могу хелирати Fe^{2+} јоне смањиће њихову концентрацију и инхибирати способност катализе процеса стварања слободних радикала, што резултује заштитом од оксидативних оштећења (Gulcin and Alwasel., 2022). Постоје докази о значајној инхибиторној активности етанолног екстракта црног бибера, док су други екстракти (водени и етанолни екстракти белог бибера) показали умерен и слаб инхибиторни ефекат (Akbar et al., 2014). Најактивнији екстракт, етанолни екстракт црног бибера, ометао је формирање комплекса гвожђа и ферозина, што указује на

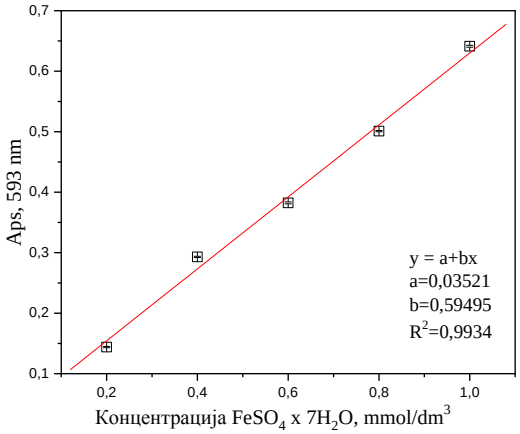
његову хелатну активност и способност да „зароби“ јон гвожђа пре ферозина. При концентрацији од 0,5 mg/cm³, степен хелирања јона гвожђа износио је 65,90 ± 0,07% (Akbar et al., 2014), што представља виши степен хелирања у односу на све анализиране екстракте у овој дисертацији. Gülçin (2005) је утврдио да водени и етанолни екстракти црног бибера постижу 83–84% хелирајуће активности у концентрацији од 75 mg/cm^3, што је више од активности синтетичких антиоксиданаса као што су BHA и BHT приказани у том раду (Gülçin, 2005).

Хелатни агенси могу појачати антиоксидативно деловање фенолних једињења, због чега се често називају синергистима. Идеалан хелатор мора да испуњава следеће критеријуме: високу растворљивост у води, отпорност на биотрансформацију, способност да допре до места складиштења метала, очување хелатне активности при различитим вредностима pH, као и способност формирања металних комплекса који су мање токсични од слободних јона метала (Flora, 2009).

Поклапање резултата из DPPH и ABTS тестова указује на најбољу антиоксидативну активност, што није случај када се посматра најнижа антиоксидативна активност. На основу оваквих резултата може се закључити да једињења изолована из плода црног бибера различитим техникама екстракције поседују добре (екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на температури кључања) или слабије хелатне способности (екстракт добијен ултразвучном екстракцијом).

4.2.4.1.4 FRAP тест

FRAP метода (Benzie and Starin, 1996) заснива се на редукцији комплекса [Fe^{3+}–TPTZ] у интензивно плави комплекс [Fe^{2+}–TPTZ], који има апсорпциони максимум на 593 nm, у киселој средини. Концентрација еквивалената Fe^{2+} (FRAP вредност) у екстракту се очитава директно са калибрационе криве (Слика 4.14), на основу које се одређује концентрација Fe^{2+} у узорцима и прерачунава на масу екстракта.



Слика 4.14 Калибрациона крива раствора $FeSO_4 \times 7H_2O$ за спектрофотометријско одређивање FRAP вредности анализираних екстраката

У Табели 4.16 су приказане FRAP вредности (mg Fe^{2+}/g сувог екстракта) етанолних екстраката црног бибера добијених различитим техникама екстракције (70% v/v етанол, солвомодул, 1:10 m/V)

Табела 4.16 FRAP вредности етанолних екстраката црног бибера

Екстракт	**mgEFe^{2+}/g екс. sr ±sd., FRAP** 30 минута инкубација
Мацерација (180 min)	64,67 ± 0,35
Екстракција уз рефлукс (40°C, 180 min)	65,13 ± 0,06
Екстракција уз рефлукс (50°C, 180 min)	66,64 ± 0,05
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	**67,82 ± 0,08**
Ултразвучна екстракција(25°C, 60 min)	66,64 ± 0,05
Soxhlet екстракција (240 min)	63,72 ± 0,05
BHT	810,92 ± 0,85

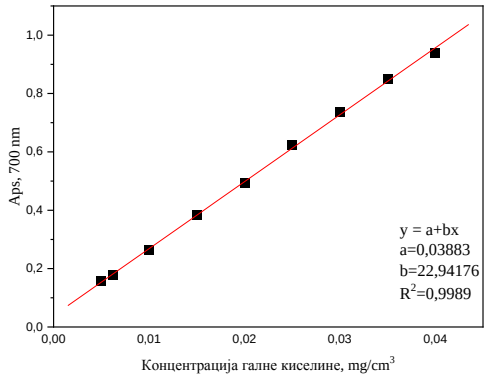
Резултати приказани у Табели 4.16 показују да највећу FRAP вредност, а самим тим и најбољу редукциону способност, односно антиоксидативну активност, има екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на температури кључања. Ипак, BHT испољава знатно већу антиоксидативну активност у односу на етанолне екстракте црног бибера, али екстракти, као природни антиоксиданси, представљају алтернативу услед потенцијално мањих нежељених ефеката. Антиоксидативна активност екстраката добијених различитим техникама екстракције опада следећим редоследом: PE темп. кључања > PE 50 °C и УЕ > PE 40 °C > мацерација > CE. Овај редослед

поклапа се са резултатима DPPH, ABTS и FIC тестова за највишу антиоксидативну активност, што није случај код најнижих вредности активности (екстракт добијен Soxhlet екстракцијом).

Подаци о FRAP тесту примењеном на екстракте плода црног бибера могу се пронаћи и у литератури. У студији Akbar-a и сарадника (2018) FRAP вредност за екстракт добијен мацерацијом 96%-им етанолом (солвомодул 1:10 m/V, време екстракције: 24 h) износила је 6,62 ± 0,02 mgEFe^{2+}/1 g екстракта, док је водени екстракт показао нешто мању антиоксидативну активност (6,51 ± 0,01 mgEFe^{2+}/1 g екстракта) (Akbar et al., 2018). Значајна је и FRAP вредност за етанолни екстракт белог бибера, која је у поменутој студији износила 5,82 ± 0,03 mgEFe^{2+}/1 g екстракта. Имајући у виду да је садржај фенола у белом биберу углавном већи него у црном (Shan et al., 2005; Nahak and Sahu, 2011), не може се тврдити да је антиоксидативна активност етанолних екстраката црног бибера последица само присуства фенолних једињења, већ је вероватно резултат синергистичког деловања више група биоактивних једињења (Aziz et al., 2018; Akbar et al., 2014). На основу резултата Kittisakulnam-a и сарадника (2017), водени екстракт црног бибера показао је највећу активност у FRAP тесту са EC_{50} вредношћу од 0,16 mg/cm^3, што је мало боље у односу на етанолне екстракте (0,18 mg/cm^3). У тој студији, водени екстракт имао је нижи садржај фенола и флавоноида, што може указивати на значајну улогу не-флавоноидних фенолних једињења у антиоксидативном деловању (Kittisakulnam et al., 2017).

4.2.4.1.5 Ферицијанидна метода

Ова метода се заснива на редукцији јона гвожђа Fe^{3+} у јоне Fe^{2+} у присуству антиоксиданаса (екстраката), при чему је редукциона способност екстраката изражена преко еквивалената галне киселине. Вредности које одговарају количини редукованог гвожђа (Fe^{3+} у Fe^{2+}) очитаване су са калибрационе криве галне киселине (Слика 4.15) и приказане су у Табели 4.17 као mg GKE/g сувог екстракта, а означене су као RP вредност.



Слика 4.15 Калибрациона крива раствора галне киселине за спектрофотометријско одређивање редукционе способности етанолних екстраката ферицијанидном методом

Табела 4.17 Редукциона способност етанолних екстраката плода црног бибера одређена ферицијанидном методом

Екстракт	**RP (Fe^{3+} - Fe^{2+})**
	mg GKE/g c.e. ± с.д..
Мацерација (180 min)	25,10 ± 0,22
Екстракција уз рефлукс (40°C, 180 min)	25,97 ± 0,22
Екстракција уз рефлукс (50°C, 180 min)	29,24 ± 0,22
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	27,28 ± 0,22
Ултразвучна екстракција (25°C, 60 min)	**31,20 ± 0,22**
Soxhlet екстракција (240 min)	22,27 ± 0,22
Аскорбинска киселина	176,93 ± 0,333

Редукциона способност екстраката добијених различитим техникама екстракције опада следећим редоследом (mg GKE/g c.e. ± стандардна девијација): УЕ > РЕ 50 °C > РЕ темп. кључања > РЕ 40 °C > мацерација > СЕ.

Овакво поређење редукционе способности односно антиоксидативне активности екстраката добијених различитим техникама екстракције показује сличну зависност као и у претходним тестовима, с мањим одступањима која могу бити последица виших температура екстракције, нестабилности биоактивних једињења под утицајем неких изолованих нечистоћа итд. (Nisha et al., 2009; Kotte et al., 2014; Kopjar et al., 2016).

Најбоља редукциона способност се приписује екстракту изолованом ултразвучном екстракцијом (31,2 ± 0,22 mg GKE/g c.e.) (Табела 4.17). У радовима је пронађена и повезаност редукционе способности са обимом конјугације у фенолима као и са бројем хидроксилних група (Schaich, 2005). У раду Zarai и сарадника (2013)

редукциона способност етанолног екстракта црног бибера и пречишћеног пиперина расла је са порастом концентрације од 25–75 μg/cm^3. С обзиром да је екстракт показао бољу редукциону способност, претпоставља се да поред пиперина у екстракту постоје и друга једињења која делују у синергији са њим и тиме повећавају антиоксидативну способност екстракта (Zarai et al., 2013). У студији Akbar-a и сарадника (2014) етанолни екстракт црног бибера у концентрацији од 500 μg/cm^3 имао је вредност апсорбанце од 0,25 ± 0,008 у односу на аскорбинску киселину која је коришћена као стандард, у истој концентрацији (500 μg/cm^3) са апсорбанцом од 1,99 ± 0,009. У истој концентрацији (500 μg/cm^3) редукциона способност етанолног екстракта белог бибера је већа у односу на вредност црног бибера, што се може приписати већем садржају фенолних једињења у белом биберу (Akbar et al., 2014). У литератури не постоје докази о редукционој способности етанолних екстраката црног бибера изражене преко еквивалената галне киселине. Генерално гледано, као најбољи потенцијални антиоксидативни агенси су се показали етанолни екстракти добијени екстракцијом уз рефлукс на температури кључања и Soxhlet екстракцијом. Познато је да се са повећањем температуре постиже бољи пренос масе у току екстракције. Добијени резултати су, са мањим одступањима, у складу са претраженом литературом. Ова одступања углавном су последица различитих структура и особина молекула радикала који се користе за антиоксидативне тестове, као и особине и интеракције изолованих материја у самом екстракту.

4.2.4.1.6 Упоредни приказ резултата антиоксидативне активности и хемијског састава екстраката

Специфични механизми појединачних тестова у великој мери условљавају добијене резултате, што објашњава варијације уочене у корелацијама између антиоксидативне активности и садржаја укупних фенола и флавоноида у екстрактима (Табела 4.8). Код DPPH, ABTS и FIC тестова, где је мања EC_{50} вредност показатељ јачег антиоксидативног дејства, корелација са укупним фенолима и флавоноидима је ниска до умерена. Ово значи да садржај фенола и флавоноида није пресудан фактор за ефикасност у овим тестовима. Са друге стране, FRAP тест је показао веома високу корелацију са флавоноидима (R^2 = 0,9253), што потврђује да они представљају главне носиоце редукционе способности екстраката, при чему веће вредности директно

указују на јачи антиоксидативни потенцијал. Насупрот томе, у RP методи укупни феноли показују бољу корелацију (R^2 = 0,6526) у односу на флавоноиде, што истиче допринос ових једињења у редукцији Fe^{3+} у Fe^{2+}. Корелација (Табела 4.18) представља користан, али не и апсолутан показатељ, већ указује на смернице које се касније могу разјаснити UHPLC-DAD-MS/MS анализом.

Табела 4.18 Корелација између садржаја укупних фенола и флавоноида и антиоксидативне активности етанолних екстраката плода црног бибера (изражено као коефицијент корелације, R^2)

Тест антиоксидативне активности	**Коефицијент корелације, R^2**	
	Укупни феноли	**Укупни флавоноиди**
DPPH	0,0448	0,2281
ABTS	0,6765	0,2341
FIC	0,2442	0,1307
FRAP	0,4337	0,9253
Ферицијанидна метода	0,6526	0,3020

Антиоксидативна активност етанолних екстраката плода црног бибера варира у зависности од примене различитих техника екстракције и врсте испитних метода (DPPH, ABTS, FRAP, FIC и ферицијанидна метода). Највећи антиоксидативни потенцијал остварен је екстракцијом уз рефлукс на температури кључања и Soxhlet екстракцијом, при чему повишена температура (код обе технике) и континуирани проток растварача (код Soxhlet екстракције) доприносе ефикаснијем издвајању биоактивних једињења (Milenković, 2018; Akbar et al., 2014). Ултразвучна екстракција, иако изведена на собној температури, показала је високу редукциону способност и значајну неутрализацију ABTS радикала, што се приписује добром издвајању поларних фенолних једињења растворљивих у воденим медијумима (Vinson et al., 2001; Hagerman et al., 1998). Резултати указују да антиоксидативна активност није искључиво условљена садржајем фенола, већ и присуством других биоактивних супстанци, као што су алкалоиди и хелатни агенси, који делују синергистички у изолованим екстрактима (Nahak and Sahu, 2011; Aziz et al., 2018). Различити реакциони медијуми и структуре молекула радикала у тестовима објашњавају варијације у добијеним резултатима, истичући мултифакторски карактер антиоксидативне активности. Екстракти добијени термички интензивним и континуалним техникама екстракције

издвајају се као најперспективнији природни антиоксиданси погодни за примену у биофармацеутским и нутрацеутским формулацијама.

Антиоксидативна активност идентификованих једињења у етанолним екстрактима црног бибера (*4.2.3.2 UHPLC-DAD-MS/MS анализа етанолних екстраката плода црног бибера*) и сродних биљних врста зависи од њихове хемијске структуре, присуства функционалних група, врсте екстракције, као и примене различитих метода испитивања (DPPH, ABTS, FRAP, FIC и ферицијанидна метода). У општем смислу, активност је израженија код једињења која садрже фенолне групе или имају способност хелирања јона метала.

Фенолна једињења као што су лутеолин-*C*-хексозид-*O*-рамнозид, лутеолин-деоксихексозил-пентозид, апигенин-*C*-хексозид-*O*-рамнозид, апигенин-пентозид, и апигенин-пентозид-рамнозид показала су најизраженију активност у DPPH и FRAP тестовима, што се приписује њиховој флавоноидној структури и присуству вишеструких -OH група (Figueirinha et al., 2008; Ferreres et al., 2007). Апигенин, као агликонска форма, такође је потврђен као снажан антиоксиданс у свим коришћеним методама (Zhou et al., 2017). Пиперин, један од најпознатијих алкалоида из рода *Piper*, испољио је релативно слабу активност у DPPH тесту (10,28% при 50 μg/cm^3; IC_{50} ≈ 94,5 μM), што је последица одсуства високо реактивних функционалних група (Kozukue et al., 2007, Lertnitikul et al., 2023). Насупрот томе, пиперинска киселина, са –COOH групом, испољила је знатно бољу антиоксидативну активност у истом раду (Kozukue et al., 2007). Форситозид D, као дериват хидроксициметне киселине, показује високу антиоксидативну активност у DPPH и ABTS тестовима, при чему је у неким условима била упоредива са BHT (Olalere et al., 2019). Умерена активност забележена је и за мупинамид ($C_{18}H_{19}NO_4$) и *N-trans*-кумароилтарамин ($C_{17}H_{17}NO_3$), који припадају групи азотних деривата са ароматичном структуром. Од алкамида, пелиторин, ретрофрактамид A, дехидропиперноналин, пиперцид и дехидроретрофрактамид C показују индиректну антиоксидативну активност преко инхибиције ACAT (енг. *Acyl CoA: Cholesterol Acyltransferase*) ензима и активације Nrf2/HO-1 (енг. *Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2/Heme Oxygenase-1*) сигналног пута, што указује на њихову способност индукције ендогеног одговора на оксидативни стрес (Rho et al., 2007; Ngo et al., 2017).

Пиперлонгуминин и дихидропиперлонгуминин имају значајан биолошки ефекат у ћелијским моделима, где су инхибирали настанак *β*-амилоида, што може указивати на њихов антиоксидативни и неуропротективни потенцијал (Qi et al., 2009).

Лимунска и изолимунска киселина испољавају значајну хелатну способност у FIC тесту, смањујући доступност Fe^{2+} и тиме инхибирајући формирање реактивних врста кисеоника (Allen, 2015). Синтетски антиоксиданс као што је 2,6-дитер-бутил-4-хидрокситолуен (BHT) је испољио одличну антиоксидативну активност у DPPH, ABTS и FRAP тестовима, док за његов COO- дериват не постоје директни подаци, али се очекује задржавање активности због фенолне структуре (Olalere et al., 2019).

Имајући у виду да су у етанолним екстрактима плода црног бибера идентификоване компоненте са поменутим активностима, може се рећи да антиоксидативна активност екстраката највероватније представља синергистички ефекат различитих компоненти присутних у плоду бибера.

4.2.4.2 Антимикробна активност

Резултати одређивања антимикробне активности екстраката црног бибера (*Piper nigrum* L.) показују да екстракти поседују изражену антимикробну активност против широког спектра бактеријских и гљивичних сојева, и то у концентрацијама у распону од 0,781 до 5 mg/cm^3.

У Табели 4.18 су приказане минималне инхибиторне (МИК), а у Табели 4.19 минималне микробицидне (ММК) (бактерицидне/фунгицидне) (МБК/МФК) концентрације екстраката црног бибера у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама.

Табела 4.18 Минималне инхибиторне (МИК) концентрације екстраката црног бибера у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама

Бактерија/ гљива		*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја		Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Екстракти	1	3,125	3,125	0,781	2,5	>5	>5	5	3,125
	2	3,125	3,125	1,56	2,5	5	5	5	3,125
	3	3,125	3,125	1,56	2,5	5	5	5	3,125
	4	3,125	3,125	1,56	2,5	5	>5	5	3,125
	5	5	3,125	1,56	5	>5	>5	5	1,56
	6	5	3,125	1,56	1,25	5	5	5	1,56

Наставак табеле 4.18

Антибиотик/антимикотик, mg/cm^3	хлорамфеникол		ципрофлоксацин				нистатин	
	0,006	0,003	0,00003125	0,0000625	0,0000078125	0,0000078125	0,004	0,004

*1-мацерација; 2-екстракција уз рефлукс на 40 °C, 3-екстракција уз рефлукс на 50 °C, 4-екстракција уз рефлукс на температури кључања; 5-ултразвучна екстракција, 6-Soxhlet екстракција

Табела 4.19 Минималне микробицидне (ММК) (бактерицидне/фунгицидне) концентрације екстраката црног бибера у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама

Бактерија/гљива		*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја		Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Екстракти	1	5	>5	5	5	>5	>5	>5	>5
	2	5	>5	5	5	>5	>5	>5	>5
	3	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	4	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
	6	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5

*1-мацерација; 2-екстракција уз рефлукс на 40 °C, 3-екстракција уз рефлукс на 50 °C, 4-екстракција уз рефлукс на температури кључања; 5-ултразвучна екстракција, 6-Soxhlet екстракција

Посматрано са аспекта микробиолошке ефикасности, екстракти бибера показали су антимикробну активност према Грам-позитивном соју *Bacillus cereus* (ATCC 11778), са МИК вредношћу од 0,781 mg/cm^3. Овај резултат показује инхибиторну способност компоненти екстракта према спорогеним, ентеротоксикогеним бактеријама, што је од посебног значаја у контексту безбедности хране. С обзиром на то да *Bacillus cereus* има значајну улогу као узрочник тровања храном, оваква активност може имати практичну примену у биоконтроли контаминације у агроиндустрији. Са друге стране, осетљивост *Candida albicans* (ATCC 24433), са МИК вредностима у распону од 1,56 до 3,125 mg/cm^3, указује на постојећу фунгистатичку активност екстраката. Ово је посебно релевантно у светлу све већег проблема резистенције *Candida* сојева на конвенционалне антимикотике. Добијени резултати упућују на могућност примене екстраката црног бибера у формулацијама природних антимикотичких средстава, како у фармацеутској, тако и у козметичкој и прехрамбеној индустрији. Сојеви *Escherichia coli* (ATCC 8739 и изолат из хране) показали су резистенцију, са МИК вредностима

већим од 5 mg/cm^3, што је у складу са литературним подацима да су Грам-негативне бактерије често отпорније због комплексне структуре ћелијског зида (Zou et al., 2015). На основу добијених резултата, код сојева *Salmonella* (изолата и референтног соја ATCC 13076) уочене су сличне МИК вредности за већину анализираних екстраката. Код оба соја најнижа МИК вредност износила је 3,125 mg/cm³ (екстракти добијени мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, 50 °C и температури кључања), док су екстракти добијени ултразвучном и Soxhlet екстракцијом показали више МИК вредности (5 mg/cm³). Ови резултати указују на сличан образац осетљивости између изолата и референтног соја у анализираним условима. У поређењу са стандардним антибиотицима и антимикотиима као што су хлорамфеникол, ципрофлоксацин и нистатин, који су имали МИК вредности у датим опсезима (хлорамфеникол: 0,003–0,006 mg/cm^3; ципрофлоксацин: 0,0000078125–0,0000625 mg/cm^3; нистатин: 0,004 mg/cm^3), екстракти црног бибера су показали слабију, али ипак значајну активност. Разлике у ефикасности екстраката означених бројевима 1 до 6 у Табели 4.18, указују на то да примењене методе екстракције значајно утичу на антимикробну активности црног бибера (Wafi et al., 2025).

Табела 4.19 приказује минималне микробицидне концентрације (ММК, mg/cm³) анализираних екстраката према различитим сојевима бактерија (МБК) и квасаца (МФК) и њиховим изолатима. Најбољу антимикробну одн. у овом случају бактерицидну активност према *Salmonella* ATCC 13076 и *Bacillus cereus* ATCC 11778 показали су екстракти 1 и 2, са МБК вредностима од 5 mg/cm³. За остале изолате (укључујући *Salmonella* изолат из хране, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* изолат из хране, *Candida albicans* изолате) није уочена значајна активност у оквиру анализираног концентрационог опсега (>5 mg/cm³). Ови резултати указују на селективну антимикробну активност одређених екстраката према појединим бактеријским сојевима, са израженијом ефективношћу према *Salmonella* и *Bacillus cereus*. Изостала активност према *Escherichia coli* и *Candida albicans* може указивати на природну резистентност или ниску концентрацију специфичних антимикробних једињења у екстрактима.

4.2.4.2.1 Повезаност хемијског профила екстраката са антимикробном активношћу

Анализом хемијског састава врста рода *Piper,* са посебним фокусом на једињења идентификована у позитивном јонизационом моду (*4.2.3.2 UHPLC-DAD-MS/MS анализа етанолних екстраката плода црног бибера*), идентификован је низ амида и алкалоида за које постоје докази о антимикробној активности. Међу њима, пиперин, једно од најпознатијих једињења из *Piper nigrum*, показује изражену антибактеријску и антифунгалну активност. Студије су показале његову ефикасност против широког спектра микроорганизама, укључујући *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida* врсте, са минималним инхибиторним концентрацијама (МИК) које се крећу између 39 и 625 μg/cm^3 (Mgbeahuruike et al., 2018). У студији Karsha и Lakshmi (2010), пиперин је испољио антимикробну активност са МИК вредношћу од 0,25 mg/cm^3 против седам различитих сојева: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhi*, што указује на широк спектар деловања (Karsha and Lakshmi, 2010). Поред чистог пиперина, ацетонски и дихлорметански екстракти црног бибера испољили су чак и бољу активност у појединим случајевима: на пример, ацетонски екстракт је имао МИК вредност од 0,125 mg/cm^3 за *Staphylococcus aureus* и 0,0625 mg/cm^3 за *Pseudomonas aeruginosa*, чиме је овај сој означен као најосетљивији (Karsha and Lakshmi, 2010).

Слично томе, пелиторин и дехидропиперноналин, изоловани из *Piper retrofractum* и *Piper nigrum*, показују значајну антифунгалну активност, нарочито против *Cladosporium cladosporioides*, уз додатну цитотоксичност према ћелијама лимфома (Muharini et al., 2015), као и инхибицију ензима ACAT (енг. *Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase*) повезаног са патогеним механизмима код микроорганизама (Rho et al., 2007), и имуносупресивни ефекат кроз смањену продукцију NO (Ngo et al., 2017). На пример, пиперанин је у студији Liang и сарадника (2021) показао фунгицидну и бактерицидну активност према *Candida albicans* и *Bacillus cereus*, са МИК вредностима у распону 0,781–3,125 mg/cm^3 (Liang et al., 2021). Мупинамид, као дериват амидних једињења, показао је значајну ефикасност према Грам-позитивним бактеријама, са МИК = 2,5 mg/cm^3 и МБК = 5 mg/cm^3 (Olalere, 2019).

N-trans-кумароилтарамин, идентификован у истом истраживању, имао је умерену антимикробну активност са МИК вредностима >4 mg/cm^3, што указује на ограничену

ефикасност у нижим концентрацијама. Слично томе, форзитозид D је испољио активност према Грам-позитивним сојевима са МИК = 2 mg/cm^3, док је активност према Грам-негативним бактеријама била минимална. Лимунска киселина показује бактериостатску и фунгистатичку активност према више сојева, укључујући *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*, са МИК вредностима у опсегу од 2 mg/cm^3 до 10 mg/cm^3, при чему њен механизам дејства подразумева смањење pH и хелирање металних јона (Karsha and Lakshmi, 2010).

Флавоноиди лутеолин- и апигенин-гликозиди (нпр. *C*-хексозид-*O*-рамнозид) показали су добру активност према *Candida albicans* и Грам-позитивним бактеријама, са МИК у опсегу 500–1000 μg/cm^3, док су у неким случајевима, као код *Escherichia coli*, достигле 250 μg/cm^3, чиме су потврдили своју значајну улогу као природни антимикробни агенси (Karpiński et al., 2019). У поређењу са резултатима у овој дисертацији, екстракти означени као 1 и 2 показали су МИК од 0,781 mg/cm^3 према *Bacillus cereus* и МБК од 5 mg/cm^3 према *Salmonella* и *Bacillus cereus*, што показује добру сагласност са литературом. Осетљивост *Candida albicans* на екстракте са МИК = 1,56–3,125 mg/cm^3 потврђује фунгистатичку активност, док резистенција *Escherichia coli* (MIC >5 mg/cm^3) упућује на структурну отпорност овог соја због сложене спољашње мембране (Zou et al., 2015).

Једињење *N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид показује изражену антибактеријску активност, нарочито против Грам-позитивних бактерија попут *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* (Salleh et al., 2020). Такође, ретрофрактамид А се истиче као једињење са антиинфламаторним и антимикробним потенцијалом, с обзиром на способност да инхибира проинфламаторне медијаторе попут азот-моноксида, што може допринети индиректном антимикробном ефекту (Ngo et al., 2017).

За низ једињења као што су *cis/trans*-пиперанин, пиперилин, пиперлонгуминан, дихидропиперлонгуминин, изокавицин, пипердардин, пиперетин (изомери), пиперолеин А и В, као и 1-[(2*E*,4*E*,8*E*)-9-(3,4-метилендиоксибензил)-2,4,8-нонтриеноил]пиролидин, није пронађена директна експериментална потврда о антимикробној активности у доступној литератури. Међутим, због њихове структурне сличности са једињењима која јесу активна (посебно са амидним структурама које садрже ароматичне и незасићене бочне ланце), може се претпоставити да и ова једињења поседују одређени антимикробни потенцијал. Ово отвара простор за даља

истраживања и *in vitro* тестирања како би се потврдио или одбацио њихов биоактивни профил.

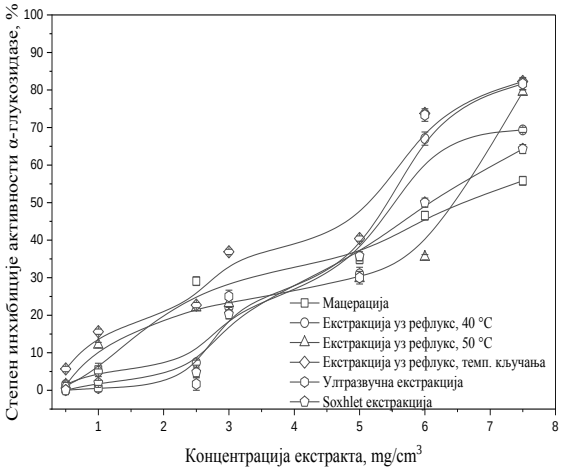
У том контексту, хемијска разноликост и присуство више изомера и деривата код *Piper* једињења, нарочито са варијацијама у геометрији двоструких веза (*E/Z* изомери), могу имати значајан утицај на биолошку активност, што би требало додатно размотрити кроз студије односа структура–активност у будућим радовима.

4.2.4.3 Антихипергликемијска активност

Један од кључних механизама у терапији дијабетес мелитуса јесте смањење гастроинтестиналне апсорпције глукозе путем инхибиције ензима *α*-глукозидазе, што је препознато као обећавајућа стратегија у контроли повећаног нивоа шећера у крви (хипергликемије) (Tundis et al., 2010).

У овој дисертацији је анализирана способност етанолних екстраката плода црног бибера да инхибирају активност *α*-глукозидазе, према методи коју су описали Apostolidis и сарадници (2007), уз мање модификације (Apostolidis et al., 2007).

Тестирани су екстракти добијени различитим техникама екстракције: мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, 50 °C и на температури кључања, ултразвучном екстракцијом и Soxhlet екстракцијом. Сви тестирани екстракти су показали *in vitro* антихипергликемијску активност, што потврђује њихов потенцијал као природних инхибитора *α*-глукозидазе. Резултати су приказани на Слици 4.16 и у Табели 4.20.



Слика 4.16 Степен инхибиције *α*-глукозидазе у зависности од концентрације екстракта и технике екстракције

На основу резултата приказаних на Слици 4.16, може се уочити да су екстракти добијени екстракцијом уз рефлукс на температури кључања и ултразвучном екстракцијом показали највећи степен инхибиције *α*-глукозидазе за све анализиране концентрације, док је екстракт добијен мацерацијом показао најнижу ефикасност. Ово се у потпуности слаже са добијеним EC_{50} вредностима приказаним у Табели 4.20.

Табела 4.20 EC_{50} вредности етанолних екстраката црног бибера добијених различитим техникама екстракције, одређене применом *in vitro* теста за проучавање инхибиторне активности на ензим *α*-глукозидазу

Узорци	**EC_{50}, mg/cm^3**
Мацерација (180 min)	6,689 ± 0,1092
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	5,405 ± 0,067
Екстракција уз рефлукс (50 °C, 180 min)	6,253 ± 0,014
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	5,189 ± 0,046
Ултразвучна екстракција (25 °C, 60 min)	5,565 ± 0,065
Soxhlet екстракција (240 min)	6,166 ± 0,069

Резултати одређивања инхибиторне активности етанолних екстраката плода црног бибера на ензим *α*-глукозидазу, показују варијације у ефективности, изражене кроз EC_{50} вредности. EC_{50} представља концентрацију екстракта потребну да се постигне 50% инхибиција ензима, где нижа вредност указује на већу инхибиторну активност. Најнижу EC_{50} вредност показао је екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на температури кључања (5,189 mg/cm^3), што указује на његову највећу инхибиторну способност међу анализираним узорцима. Сличну ефикасност показао је и екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на 40 °C (EC_{50} = 5,405 mg/cm^3), као и екстракт добијен ултразвучном екстракцијом (EC_{50} = 5,565 mg/cm^3). Екстракт добијен мацерацијом показао је најслабији инхибитони ефекат са највишом EC_{50} вредношћу (6,689 mg/cm^3).

Упоређујући ове резултате са литературом, различите фракције екстракта црног бибера показале су бољу *α*-глукозидазну инхибиторну активност према студији Mollik и сарадника (2024). Њихова најактивнија петролетарска фракција (енг. *petroleum ether fraction* – PEF) показала је EC_{50} вредност од 1,47 mg/cm^3, док је хлороформска фракција (енг. *chloroform fraction* - CHF) показала вредност од 2,95 mg/cm^3. Етанолни екстракти бибера показали су слабију инхибиторну активност што је највероватније последица употребе различитих екстрагенаса, а самим тим и разлике у хемијском саставу добијених екстраката (Mollik et al., 2024).

Фитохемијска анализа етанолних екстраката плодова црног бибера показала је присуство више класа једињења са потенцијалном антихипергликемијском активношћу, од којих су нека у литератури већ описана као инхибитори *α*-глукозидазе. Најзначајнији међу њима су флавоноиди лутеолин и апигенин, чији гликозидни облици (*C*-хексозиди, *O*-рамнозиди и пентозиди) испољавају снажну или умерену инхибиторну активност на *α*-глукозидазу, често надмашујући дејство стандардног инхибитора акарбозе (Yan et al., 2014, Cheng et al., 2014). Алкалоиди карактеристични за род *Piper*, као што су пиперин, пелиторин, ретрофрактамид А и дехидропиперноналин, показали су умерену али значајну *α*-глукозидазну инхибиторну активност, што је потврђено у неколико *in vitro* студија (Kumar et al., 2013; Gou et al., 2023; Magaña-Barajas et al., 2021; Pullela et al., 2006). Magaña-Barajas и сарадници (2021) су доказали да пиперин инхибира *α*-глукозидазу *in vitro* са EC_{50} = 147 μg/cm^3, док је етанолни екстракт плода бибера показао нижу активност, што јасно говори да пиперин има доминантну улогу у инхибицији ензима. Такође, деривати кумароилтирамина, попут *N-trans*-кумароилтирамина и мупинамида, иако не делују директно на *α*-глукозидазу, показали су способност да стимулишу потрошњу глукозе у ћелијским моделима и потенцијално побољшају осетљивост на инсулин (Liu et al., 2023).

Фенилетаноид-гликозиди попут форзитозида D, иако немају директно потврђену *α*-глукозидазну активност, познати су по антиоксидативном и цитопротективном дејству, што може индиректно допринети гликемијској стабилизацији (Quan et al., 2021). Осим тога, бројна једињења из групе амидних деривата пиперина, попут пиперанина, пиперетина, пиперолеина А и В, као и пиперлонгуминина, идентификована су у активним фракцијама у неким студијама, али захтевају појединачну изолацију и биолошку валидацију за прецизну процену њихове активности (Stöhr et al., 2001). У целини, антихипергликемијски ефекат екстраката црног бибера највероватније је резултат синергистичког дејства више класа једињења, при чему метода екстракције, поларност растварача и профил изолованих метаболита играју кључну улогу у одређивању степена инхибиције *α*-глукозидазе (Tundis et al., 2010).

4.2.4.4 Антиинфламаторна активност

Проучавање антиинфламаторног потенцијала етанолних екстраката плода црног бибера засновано је на моделу инхибиције денатурације протеина, који представља један од најчешће коришћених *in vitro* тестова за предвиђање противупалног дејства. Познато је да денатурација протеина, као што је серумски албумин, доводи до губитка његове секундарне и терцијарне структуре и на тај начин може индуковати запаљенске процесе. Једињења која спречавају овај процес могу се сматрати потенцијалним антиинфламаторним агенсима, што оправдава примену ове методе у иницијалном скринингу биолошке активности (Lavanya et al., 2010).

Резултати антиинфламаторне акивности етанолних екстраката плода црног бибера добијених различитим техникама екстракције приказани су у Табели 4.21.

Табела 4.21 Инхибиција денатурације протеина у различитим екстрактима (средња вредност ± СД)

Узорак, 0,1 mg /cm^3	**Инхибиција денатурације протеина, %**
Мацерација (180 min)	84,27±0,007
Екстракција уз рефлукс (40 °C, 180 min)	83,08±0,007
Екстракција уз рефлукс (50 °C, 180 min)	80,11±0,006
Екстракција уз рефлукс (темп. кључ., 180 min)	82,93±0,006
Ултразвучна екстракција (25 °C, 60 min)	84,86±0,006
Soxhlet екстракција (240 min)	89,61±0,013
Диклофенак-натријум	95,60±0,001

На основу резултата приказаних у Табели 4.21 може се видети да сви анализирани екстракти показују изражену способност инхибиције денатурације BSA при концентрацији од 0,1 mg/cm^3, што указује на значајан антиинфламаторни потенцијал. Највиши степен заштите од денатурације протеина забележен је код екстракта добијеног Soxhlet екстракцијом (89,61±0.013)%, док је најнижа активност уочена код екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс на 50 °C (80,11±0,006)%. Иако ниједан од екстраката није достигао вредности стандардног лека диклофенака натријума (95,60±0,001)%, добијени резултати ипак указују на снажан ефекат који је релативно близак фармаколошком стандарду. У литератури су пријављене ниже вредности. Enyang и сарадници (2024) су показали да 70%-ни етанолни екстракт

стабљике *Piper nigrum* постиже инхибицију од 62,9–74,4% у опсегу концентрација од 0,1–1,0 mg/cm^3 (Enyang et al., 2024).

У другој студији, за 70% етанолни екстракт плода црног бибера су добијене вредности од 47,0% (62,5 μg/cm^3), 58,92% (125 μg/cm^3) и 70,24% (250 μg/cm^3) (Ali et al., 2024). Разлике могу настати услед различитог биљног дела (плод или стабљика), различитих метода екстракције, као и профила секундарних метаболита. Нажалост, за већину идентификованих једињења у етанолним екстрактима нису пронађена *in vitro* истраживања, али постоје она рађена на животињским моделима што олакшава и показује и механизме деловања (Bang et al., 2009; Kumar et al., 2015; Kim et al., 2012).

Добијени резултати указују да етанолни екстракти црног бибера испољавају значајан антиинфламаторни потенцијал, што се може довести у везу са присуством пиперина и сродних алкалоида. Ранија истраживања су потврдила да пиперин делује кроз више механизама, пре свега инхибицијом продукције простагландина, азот-моноксида и цитокина попут TNF-*α* (енг. *Tumor Necrosis Factor alpha*), IL-1*β* и IL-6 (енг. *Interleukin*), као и супресијом експресије ензима COX-2 и iNOS (енг. *inducible Nitric Oxide Synthase*) (Stojanović-Radić et al., 2019; Tripathi et al., 2022). Пиперлонгумин је алкалоид такође познат по добром антиинфламаторном ефекту. Делује углавном инхибицијом NF-κB и NLRP3 инфламазома (енг. *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome*), што доводи до смањене продукције проинфламаторних цитокина и инхибиције пироптозе (Sun et al., 2015; Shi et al., 2022). Међутим, подаци о његовом дејству на денатурацију албумина за сада нису доступни, што представља потенцијалну област будућих истраживања. Поред пиперина, антиинфламаторно дејство је показано и за сродне амиде попут пелиторина**,** који делује преко активације Nrf2/HO-1 (енг. *Nuclear factor erythroid 2–related factor 2/Heme oxygenase-1*) и супресије HMGB1-индуковане упале (енг. *High Mobility Group Box 1*) (Ngo et al., 2017; Ku et al., 2014), као и за *N-trans*-кумароилтирамин**,** за који је утврђено да утиче на медијаторе упале у ћелијским и животињским системима (Boucher et al., 2025). Такође, поједина истраживања указују и на потенцијал сродног мупинамида, чије деловање укључује редукцију iNOS и COX-2 (Aswad et al., 2018).

Међу флавоноидним компонентама, присуство лутеолин- и апигенин-гликозида може додатно допринети антиинфламаторном ефекту, јер су ова једињења добро позната по својој способности да инхибирају NF-κB и MAPK (енг. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) сигналне путеве, смање продукцију цитокина и спрече едем (оток) у експерименталним моделима (Ginwala et al., 2019; Wang et al., 2014a; Kim and Lee.,

2018; Xia et al., 2014). Слично томе, апигенин као агликон је више пута потврђен као референтни антиинфламаторни флавоноид (Shukla and Gupta, 2010). Интересантно је да чак и лимунска киселина показује антиинфламаторни ефекат у моделима LPS-индуковане упале (енг. *Lipopolysaccharide*) кроз редукцију NF-κB/p38 сигнализације и модулацију цитокинског профила (Abdel-Salam Omar et al., 2014), док је за изолимунску киселину (изоцитрат) активност посредно повезана са имунометаболичким променама у макрофагима и продукцијом итаконата (Williams and O'Neill, 2018). Сумирано, поред пиперина, више једињења из група амидних деривата и флавоноида може синергистички допринети уоченом ефекту инхибиције денатурације протеина. Док су за пиперин, пелиторин и флавоноиде докази јасни, за поједине амиде попут мупинамида или ретрофрактамида С подаци су ограничени али охрабрујући (Aswad et al., 2018, Lim et al., 2020). За остале идентификоване молекуле антиинфламаторна активност тек треба бити детаљније анализирана.

4.2.5 Минерални састав етанолних екстракта плода црног бибера

Црни бибер је један од најчешће коришћених зачина, како у свету, тако и на Балкану. Поред познатих антиоксидативних, антимикробних и антиинфламаторних ефеката, посебан значај има његов минерални састав, који директно утиче на нутритивну вредност, органолептичке особине и потенцијалне здравствене користи. Минерали као што су калијум, калцијум и магнезијум најзаступљенији су у екстрактима и перикарпу црног бибера (Nwofia et al., 2013; Hossain et al., 2014; Ameh et al., 2016; Olalere et al., 2019), док микроелементи попут гвожђа, никла и бакра, иако неопходни у малим концентрацијама, у већим концентрацијама могу бити потенцијално штетни. Насупрот томе, тешки метали као што су олово, кадмијум и жива токсични су и у траговима, што захтева сталну контролу квалитета сировина и екстраката (Inam et al., 2013; Olayiwola et al., 2017). Савремене аналитичке методе, попут ICP-OES спектрометрије, омогућавају истовремено одређивање макро- и микроелемената, као и присуства токсичних метала у биљним екстрактима (Savić et al., 2019). Полазећи од тога, циљ овог дела истраживања био је да се анализира утицај различитих техника екстракције (мацерација, рефлукс, Soxhlet и ултразвук) на садржај макро- (P, K, Ca, Mg, Na) и микроелемената (Fe, Mn, Cr, Cu, Li, Ni, Zn, Si), као и присуство одабраних тешких метала (Cd, Co, Pb, Hg) у етанолним екстрактима плода црног бибера.

Резултати ICP-OES анализе приказани су у Табели 4.22.

Табела 4.22 Садржај макро- и микроелемената у екстрактима црног бибера

Елемент	**Јединица**	Екстракти црног бибера					
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Макроелементи							
P	mg/g с.е.	11,696	18,146	11,214	7,796	5,876	11,738
	mg/kg б.м.	1058,488	1526,784	1104,579	943,316	1713,748	575,848
K	mg/g с.е.	26,370	47,228	25,294	22,790	20,412	24,850
	mg/kg б.м.	2386,485	3967,152	2491,459	2757,590	3628,100	2000,376
Ca	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Mg	mg/g с.е.	0,650	1,756	0,636	0,534	0,246	0,744
	mg/kg б.м.	58,825	147,504	62,646	64,614	108,624	24,108
Na	mg/g с.е.	2,850	6,556	2,406	5,206	3,450	3,080
	mg/kg б.м.	257,925	551,544	236,991	629,926	449,680	338,100
S	mg/g с.е.	2,730	4,066	2,898	3,120	2,756	2,440
	mg/kg б.м.	247,065	341,544	285,453	377,520	402,376	239,120
Микроелементи							
Ag	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Fe	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Mn	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Cr	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Cu	mg/g с.е.	0,042	0,076	0,044	0,044	0,044	0,040
	mg/kg б.м.	3,801	6,384	4,334	5,324	5,840	4,312
Li	mg/g с.е.	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
	mg/kg б.м.	0,724	0,672	0,788	0,968	1,168	0,784
Ni	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.

Наставак Табеле 4.22

Zn	mg/g с.е.	0,102	0,202	0,094	0,182	0,208	0,110
	mg/kg б.м.	9,231	16,968	9,259	22,022	16,060	20,384
Si	mg/g с.е.	2,472	2,382	2,300	2,490	2,268	2,462
	mg/kg б.м.	223,716	200,088	226,550	301,290	359,452	222,264
Елементи са непознатим функцијама							
B	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	0,098
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	9,604
Ba	mg/g с.е.	0,050	0,054	0,050	0,052	0,054	0,050
	mg/kg б.м.	4,525	4,536	4,925	6,292	7,300	5,292
In	mg/g с.е.	0,030	0,030	0,030	0,032	0,032	0,030
	mg/kg б.м.	2,715	2,520	2,955	3,872	4,672	2,940
Sr	mg/g с.е.	0,012	0,038	0,014	0,034	0,038	0,016
	mg/kg б.м.	1,086	3,192	1,379	4,114	2,336	3,724
Тешки метали							
Bi	mg/g с.е.	0,156	0,148	0,146	0,144	0,152	0,134
	mg/kg б.м.	14,118	12,432	14,381	17,424	22,192	13,132
Cd	mg/g с.е.	0,006	0,010	0,006	0,006	0,006	0,008
	mg/kg б.м.	0,543	0,840	0,591	0,726	0,876	0,784
Co	mg/g с.е.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
	mg/kg б.м.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Pb	mg/g с.е.	н.и.	0,050	0,014	0,016	н.и.	0,008
	mg/kg б.м.	н.и.	4,200	1,379	1,936	н.и.	0,784
Hg	mg/g с.е.	0,072	0,120	0,098	0,092	0,090	0,100
	mg/kg б.м.	6,516	10,080	9,653	11,132	13,140	9,800

*1-мацерација; 2-екстракција уз рефлукс на 40 °C; 3-екстракција уз рефлукс на 50 °C; 4-екстракција уз рефлукс на темп.кључања; 5-ултразвучна екстракција; 6-Soxhlet екстракција; н.и.-није идентификовано

Добијени резултати варирају у анализираним узорцима у зависности од технике екстракције којом су екстракти добијени. На основу представљених резултата може се закључити да присуство сребра, бора, калцијума, кобалта, хрома, гвожђа, мангана и никла није детектовано ни у једном од анализираних узорака, односно да је њихов садржај у узорцима био испод границе детекције (Табела 4.22).

Од макроелемената чији је садржај одређен у екстрактима (P, K, Ca, Mg, Na и S), највећи садржај калијума (20,412–47,228 mg/g сувог екстракта; 2000,376-3967,152

mg/kg биљног материјла) детектован је у свим узорцима, а највише га је било у екстракту добијеном екстракцијом уз рефлукс на 40 °C. Ови резултати се углавном слажу са доступним студијама (Lee et al., 2020; Al-Jasass and Al-Jasser, 2012; Özcan and Akbulut, 2008) где је калијум био најзаступљенији од свих макроелемената са вредностима од 663–2377 mg/100 g. Студија Lee и сарадника показала је да перикарп црног бибера садржи много већи ниво калијума у односу на бели бибер (463,1 mg/100 g) (Lee et al., 2020), један од најбољих извора калијума. Калијум је веома важан електролит за одржавање ацидо-базне равнотеже у организму као и осмотског притиска. Има сличну улогу у организму као натријум, калцијум и магнезијум, и важан је за пренос нервних импулса, правилно функционисање црева и мишића, као и срчане контракције, учествује у метаболизму угљених хидрата и транспорту кроз мембране (Petrović et al., 2015). Калцијум и магнезијум су есенцијални елементи који помажу у формирању костију, јачању функције срца, релаксацији мишића, функцији меморије и метаболизму глукозе. Иако су узорци у наведеним радовима садржали висок ниво калцијума, он није детектован у анализираним узорцима у овој дисертацији. Ниво магнезијума у екстрактима бибера је детектован у опсегу од 0,246–1,756 mg/g сувог екстракта односно 24,108-147,504 mg/kg биљног материјала, са највећим садржајем у екстракту добијеном екстракцијом уз рефлукс на 40 °C. Концентрације магнезијума у анализираним екстрактима црног бибера биле су сличне концентрацијама у перикарпу црног бибера из студије Al-Jasass и Al-Jasser (Al-Jasass and Al-Jasser, 2012). Када је реч о натријуму, он је најчешћи катјон који учествује у метаболизму воде, контракцији мишића и омогућава пренос угљен-диоксида у плућа. Садржај натријума у екстрактима бибера био је у опсегу од 2,850–6,556 mg/g сувог екстракта односно 236,991-629,926 mg/kg биљног материјала. Ове вредности се не могу директно поредити са свим литературним подацима, јер су у ранијим студијама резултати често приказани на другој основи (нпр. mg/100 g свежег или сувог биљног материјала). Ипак, може се уочити да су добијене вредности више од појединих (Ameh et al., 2016; Lee et al., 2020), а ниже од неких других литературно наведених вредности за црни бибер (Özcan and Akbulut, 2008). Сумпор је трећи најзаступљенији минерал у људском организму после калцијума и фосфора, без препорученог дневног уноса. Он је есенцијалан за биосинтезу хондроитина у костима и хрскавици, хепарина и инсулина. Такође, сумпор је важна компонента ензима глутатион-пероксидазе (Nimni et al., 2007). Подаци тренутно нису довољни да се утврди толерантни горњи ниво уноса (Institute of

Medicine, 2006). У анализираним екстрактима бибера, садржај сумпора је детектован у опсегу 2,440–4,066 mg/g сувог екстракта односно 239,120 - 402,376 mg/kg биљног материјала (највећи садржај је детектован у екстрактима добијеним екстракцијом уз рефлукс на 40 °C и ултразвучном екстракцијом, редом).

Присуство литијума, цинка, бакра и силицијума је детектовано у микроелементима у свим анализираним екстрактима. Студија Cicero и сарадника (2022) показала је присуство хрома, гвожђа и мангана који нису детектовани у овој дисертацији, као и потенцијално опасних минерала као што су кадмијум, олово, жива и алуминијум (Cicero et al., 2022). Веће количине цинка детектоване су у овој дисертацији (9,231-22,022 mg/kg б.м.) него у студијама Lee и сарадника (2020) (1,02 mg/100 g), Al-Jasass и Al-Jasser-a (2012) (0,9 mg/100 g) и Özcan и Akbulut-a (2008) (0,93 mg/100 g) (Lee et al., 2020; Al-Jasass and Al-Jasser, 2012; Özcan and Akbulut, 2008). Цинк је микроелемент неопходан за ефикасно функционисање мозга и биомембрана, као и за лечење менталних болести. Такође је потребан за метаболизам протеина и угљених хидрата, функцију простате, синтезу ДНК, и важан је за развој и функцију репродуктивних органа (Savić et al., 2019).

Бакар, заједно са цинком и витамином C, има значајну улогу у очувању структурног интегритета коже, док његов недостатак може бити повезан са различитим поремећајима, укључујући анемију, депигментацију косе и деформације костију. Исхрана која не садржи есенцијалне елементе као што су Zn, Fe и Cu може потенцијално довести до акумулације токсичних метала, укључујући Cd или Pb (WHO, 1996). Према WHO (енг. *World Health Organisation*), референтне вредности уноса бакра за одрасле износе 1,3 mg/dan за мушкарце и 1,2 mg/dan за жене, док су горње границе безбедног просечног уноса 12 mg/dan и 10 mg/dan, редом (WHO, 1996). У овој дисертацији, садржај бакра у екстрактима бибера износио је 0,040–0,076 mg/g сувог екстракта, односно 3,801–6,384 mg/kg биљног материјала (Табела 4.22). Имајући у виду да је FAO/WHO (енг. *Food and Agriculture Organization/World Health Organisation*) за јестиве биљке навео максимално дозвољену концентрацију бакра од 3,00 mg/kg биљног материјала, добијене вредности прерачунате на полазни биљни материјал указују на њихово прекорачење. Међутим, за потпунију процену безбедности употребе екстраката потребно је узети у обзир и реалну дневну дозу екстракта, с обзиром на то да се препоруке WHO односе на дневни унос бакра, а не на његов садржај у самом екстракту (FAO/WHO, 1984; WHO, 1996).

Од анализираних микроелемената, највећи садржај силицијума (2,268–2,490 mg/g сувог екстракта односно 200,088-359,452 mg/kg б.м.) детектован је у свим узорцима, док гвожђе, манган, хром и никл нису идентификовани у екстрактима. Силицијум је есенцијални елемент за раст усева, али има и улогу у здрављу човека. Биорасположивост силицијума у људској исхрани, на пример, јача кости и побољшава имуни одговор, као и здравље неурона и везивног ткива (Farooq and Dietz, 2015). Подаци из литературе не пружају конкретне информације о садржају силицијума у црном биберу.

Еколошко загађење тешким металима и дугорочни кумулативни здравствени ефекти представљају један од водећих здравствених проблема у свету. У овој дисертацији у екстрактима бибера детектовано је присуство тешких метала. Кобалт није идентификован у екстрактима. Од свих анализираних тешких метала, детектован је највећи садржај бизмута (0,134–0,156 mg/g сувог екстракта односно 12,432-22,192 mg/kg б.м.) у свим узорцима. Нема много информација о директним токсичним ефектима овог елемента (Sano et al., 2005), али токсичност бизмута и његових једињења јавља се углавном када се користи као терапијско средство током продужене примене, што углавном доводи до отказивања бубрега или менталних поремећаја (Michalke et al., 2008). Биоакумулација олова (Pb) у људском организму ремети функционисање митохондрија, што утиче на дисање и изазива отицање мозга, парализу и коначно смрт. Олово је детектовано само у екстрактима добијеним екстракцијом уз рефлукс и Soxhlet екстракцијом са вредностима које су испод границе максимално дозвољених нивоа за овај метал које је поставила WHO - 10 mg/kg (WHO, 2007). Доступне студије су показале ниже вредности у односу на вредности добијене у овој дисертацији и одсуство олова (Savić et al., 2019; Al-Eed et al., 2002). Представљени резултати такође се слажу са анализама узорака зачина спроведеним у другим европским земљама, на пример у Србији, где је концентрација олова у узорцима црног бибера варирала у опсегу од 0,280 mg/kg до 0,42 mg/kg. Међутим, треба нагласити да се црни бибер не гаји у овим земљама, већ се искључиво увози (Blagojević et al., 2015). Кадмијум је детектован у свим анализираним узорцима у концентрационом опсегу од 0,006–0,010 mg/g с.е. односно 0,543-0,876 mg/kg б.м.) што премашује граничну вредност коју је поставила WHO на нивоу од 0,3 mg/kg (WHO, 2007).

С обзиром на утврђено присуство тешких метала, оправдано је да се у будућим истраживањима већа пажња посвети контроли квалитета увозних сировина на тлу Србије и других балканских земаља, уз истовремену процену безбедности екстраката у

складу са њиховом наменом, дозом и начином употребе. Разлике у добијеним резултатима и онима који су објављени у ранијим истраживањима могу бити последица еколошких фактора који преовлађују у производним подручјима, сорти које се користе за производњу семена и различитих метода припреме узорака (Fatoki, 2000). Такође, неке технике ремедијације су *ex-situ* прање земљишта коришћењем хелатних агенаса или пречишћавање већ изолованих екстраката (Shyam Sunder et al., 2020; Tandy et al., 2004).

4.3 Изолација и карактеризација олеорезина из плода бибера

Добијени олеорезин је уљасте конзистенције, карактеристичне мрке боје, љутог укуса и пријатног мириса, што је у складу са описима из литературе који указују да су органолептичка својства директно условљена садржајем пиперина и испарљивих компоненти етарског уља (Pruthi, 1999; Nair, 2011). Принос олеорезина у овој дисератацији је износио 13,76 g/100 g биљног материјала, што представља вредност у горњем опсегу наведеном у литератури (6–13%) (Ravindran, 2003), и може се повезати са специфичним условима екстракције и степеном уситњености биљне сировине. Садржај пиперина у добијеном олеорезину је 41,026 g/100 g олеорезина, што потврђује да је пиперин главни носилац љутине и једна од доминантних биоактивних компоненти. У поређењу са комерцијално доступним олеорезинима, који обично садрже 35–55% пиперина и 15–20% етарског уља (Nair, 2011), уочена вредност указује на могуће разлике у коришћеном растварачу, дужини екстракције и поларности система. Ови резултати потврђују да на принос и састав олеорезина значајно утичу технолошки параметри процеса, као и варијабилност самог биљног материјала, укључујући сорту и фазу зрелости плодова.

Принос олеорезина из плода црног бибера значајно варира у зависности од технике екстракције, растварача и услова екстракције. Према истраживању Induruwe и Jittanita (2022), принос олеорезина из црног бибера значајно је зависио од величине честица и односа чврсте супстанце према растварачу односно солвомодула. Коришћењем етанола као растварача, максимални принос олеорезина од 16,2% је постигнут са величином честица мањом од 0,125 mm и солвомодулом од 1:10 m/V (Induruwa et al., 2022), што је веома слично са истраживањем у овој дисертацији. Ови резултати указују на то да смањење величине честица и повећање количине растварача

могу побољшати ефикасност екстракције олеорезина. Студија Hailemichael и сарадника (2009) показала је да се приноси олеорезина крећу између 13,63 % и 16,01 % у зависности од сорте бибера, док је највећи принос (19,41 %) добијен при најранијој жетви (3,5 месеца након цветања). У раду се такође наводи да се олеорезин традиционално добија екстракцијом уситњеног плода бибера органским растварачима попут ацетона, етанола, етил-ацетата и етилен-дихлорида (Hailemichael et al., 2009). Ацетон, због своје способности да ефикасно екстрахује пиперин, био је широко коришћен, али је његова примена ограничена због стварања мезитил оксида, једињења које у комбинацији са водоник-сулфидом ствара интензивне непријатне мирисе, што је проблем за индустрију меса, где су ови мириси неприхватљиви (Hailemichael et al., 2009). Резултати које наводе Aziz и сарадници (2021) указују да је метанол био најефикаснији растварач за екстракцију олеорезина из белог бибера, са статистички значајно највећим приносом (13,89 %) (Aziz et al., 2021).

Ипак, модерна истраживања су усмерена на еколошки прихватљиве и технолошки напредније методе које смањују заостале трагове штетних супстанци, истовремено повећавајући принос и квалитет олеорезина. Суперкритична екстракција угљен-диоксидом је постала једна од водећих метода екстракције захваљујући томе што безбедно изолује пиперин и етарска уља без токсичних остатака. У оптималним условима екстракције (266 bar, 47 °C, 150 min) је постигнут принос олеорезина од 5,33%, док је садржај пиперина достигао вредности између 25,74% и 48,32% (Dang and Phan, 2014). Ова метода пружа изванредну селективност и чистоћу производа, али високи капитални трошкови потребни за инсталацију суперкритичних система ограничавају њену ширу примену у мањим производним јединицама. Упркос почетним улагањима, суперкритична екстракција остаје дугорочно исплатива због смањене потребе за даљим пречишћавањем и смањеног ризика од регулаторних проблема. Поред суперкритичне екстракције, микроталасна екстракција представља ефикасну алтернативу која се одликује брзином и нижим енергетским трошковима. Експерименти су показали да ова техника омогућава принос од 5,64%, уз очување високог антиоксидативног капацитета олеорезина (Olalere et al., 2018).

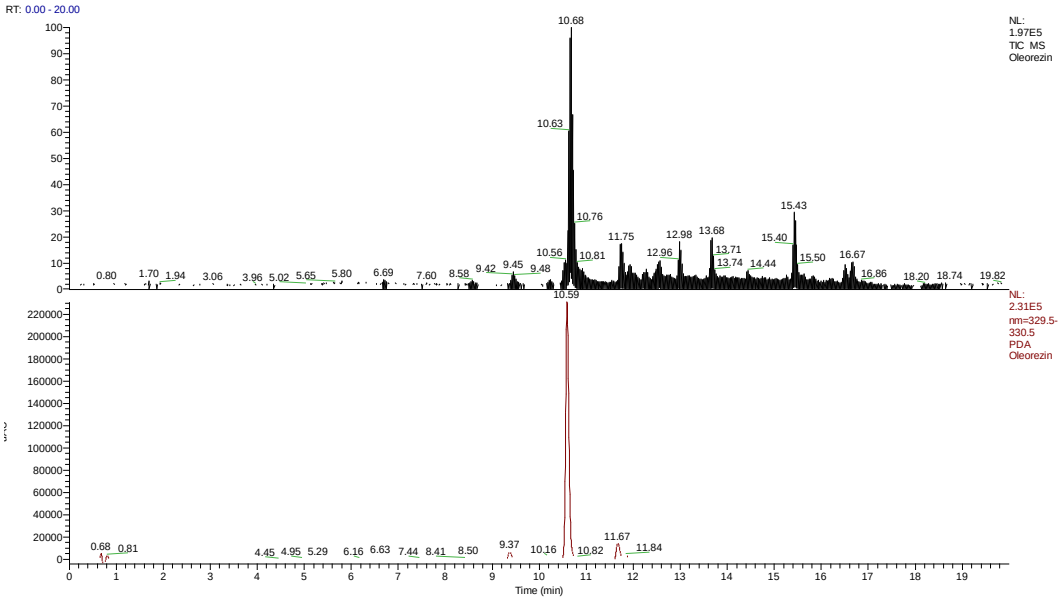
Микроталасна технологија нуди значајну уштеду времена у поређењу са конвенционалним методама, као што је Soxhlet екстракција, и пружа већу контролу над параметрима процеса. Упркос овим предностима, потребна је стандардизација кључних оперативних параметара како би се обезбедила репродуктивност резултата у индустријским размерама. Као растварач, етанол пружа сигурну и регулаторно

прихватљиву опцију за екстракцију олеорезина. Истраживања показују да солвомодул 1:10 m/V, у комбинацији са величином честица мањом од 0,125 mm, обезбеђује принос до 16,2% (Arachchige and Jittanit, 2022). Етанол се лако уклања, а преостале количине, чак и до 1%, могу побољшати конзистенцију и дисперзибилност олеорезина, што доприноси његовој широкој употреби у прехрамбеној индустрији. Предност етанола у поређењу са ацетоном и осталим растварачима лежи у одсуству токсичних остатака и економској исплативости. Истовремено, савремени приступи усмерени су ка развоју технологија које обједињују ефикасност, економичност, безбедност и одрживост производње (Madhusankha et al., 2023).

4.3.1 Хемијски састав изолованог олеорезина

4.3.1.1 UHPLC-DAD-MS/MS анализа олеорезина

Хроматографском UHPLC-DAD-MS/MS анализом утврђен је квалитативни хемијски профил олеорезина и квантитативни садржај пиперина у олеорезину. Хроматограм олеорезина (Слика 4.17), поред главног пика који потиче од пиперина (олеорезин садржи око 13% чистог пиперина), бележи и неке мање пикове, који највероватније потичу од фенолних једињења или једињења која су саставни део етарског уља црног бибера, а екстраховани су у олеорезину.



Слика 4.17 UHPLC-MS (горе) и UHPLC-DAD (на 330 nm, доле) хроматограм олеорезина црног бибера

У позитивном режиму јонизације (+ESI) у олеорезину црног бибера, детектована су слична једињења као и у етанолним екстрактима која су приказана у Табели 4.23. Код већине идентификованих једињења (пиперанин, пиперилин, пиперлонгуминин и изомерне форме пиперина), забележени су карактеристични фрагменти на *m/z* 201, 202 и 203, који одговарају цепању карбоксамидне групе при чему се добија детектовани катјон, $C_{12}H_9O_3^+$. Пиперин (једињење под редним бројем 7) је потврђен присуством јона $[M+H]^+$ (*m/z* 286), $[M+Na]^+$ (*m/z* 308) и димерних форми ($[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$), као и фрагмнтацијуом, а у складу са литературним подацима (Liang et al., 2021; Kozukue et al., 2007).

Посебну групу чине једињења са израженим сигналом на *m/z* 135 (пиперлонгуминин, дихидропиперлонгуминин, пиперолеин B, пиперцид), што указује на формирање метилен-диоксибензил катјона, карактеристичног за деривате са метилен-диокси супституисаним бензеновим прстеном (Liang et al., 2021). Друга подгрупа (пиперетини, ретрофрактамиди, дехидропиперноналин) показала је доминантне фрагменте на *m/z* 227–229, што је типично за цепања на карбоксамидним везама, при чему се добија катјон $C_{14}H_9O_3^+$. Пиперолеин A се издвојио по једноставнијем MS/MS спектру протонованог молекулског јона на *m/z* 316, док је пелиторин идентификован на основу молекулског јона *m/z* 224, што је у складу са њиховом структуром (Liang et al., 2021; Baky et al., 2025). Најдужи полиенски амиди, као што је *N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид, потврђени су молекулским јоном на *m/z* 362 и интензивним фрагментом на *m/z* 289, који одговара ацилном остатку 2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриеноил групе (Dawid et al., 2012; Sun et al., 2007).

Табела 4.23 Хемијски састав олеорезина плода црног бибера анализиран применом UHPLC-DAD-MS/MS методе (ESI+)

Пик, бр.	**t_R, min MS**	**λ_{max}, nm**	**Молекулски јон $[M+H]^+$ [a]$[M+Na]^+$ [b]$[2M+H]^+$ [c]$[2M+Na]^+$ *m/z***	**MS/MS фрагментациони јони**	**Идентификовано једињење/Литература**	
1	6,77	294 319	314 (336[a])	177(100%),145,117	н.и.	+
2	8,61	341	288	203(100%),152,137,115	*cis/trans*-пиперанин (Liang et al., 2021)	+
3	9,53	344 312sh	272	201(100%)/202,171,135	пиперилин (Dawid et al., 2012)	+

Наставак Табеле 4.23

4	10,26	340 310sh	274	201(100%),173,135	*cis/trans*-пиперлонгуминин (Liang et al., 2021)	+
5	10,29	341 310sh	276	203/202/201,175,161,135(100%)	дихидропиперлонгуминин (Bose Kote, Dubey i Murali 2012)	+
6	10,70	-	288	-	*cis/trans*-пиперанин (Liang et al., 2021)	+
7	10,78	344 312sh	286 (308[a], 571[b],593[c])	201(100%),161,171,135	пиперин (*E*,*E*-(*trans*-*trans*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+
8	11.01	-	286	-	изокавицин (*E*,*Z*-(*trans*-*cis*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+
9	11,72	258	314	228(100%)/229,201,171,161,131,112	пипердардин (Liang et al., 2021)	+
10	11,74	359	312 (334[a],645[c])	227(100%),197,112	пиперетин – изомер 1 (Liang et al., 2021)	+
11	12,01	353	312	227(100%),197,112	пиперетин – изомер 2 (Liang et al., 2021)	+
12	12,02	263 306	326	255,227(100%),197,165,98	1-[(2*E*,4*E*,8*E*)-9-(3,4-метилендиоксибензил)-2,4,8-нонатриеноил]пиролидин (Liang et al., 2021)	+
13	12,03	-	316	-	пиперолеин А (Liang et al., 2021)	+
14	12,27	276	328	255,227(100%)/229,197,187,173,161,131	ретрофрактамид (Liang et al., 2021)	+
15	12,35	-	224	-	пелиторин (Liang et al., 2021)	+
16	12,55	263	340	322,255,227(100%),197,179,112	дехидропиперноналин (Liang et al., 2021)	+
17	12,99	263 306	356	283,265,255,234,215,135(100%)	пиперцид (Liang et al., 2021)	+
18	13,02	362 307	344	241,222,211,185,175,145,135(100%),112	пиперолеин В (Liang et al., 2021)	+
19	13,26	-	332	-	н.и.	+
20	14,82	279	332	233,231,135,121(100%)	дехидроретрофрактамид С – изомер (Liang et al., 2021)	+
21	15,51	260	334	306,292,149,135,121(100%),109	н.и.	+
22	16,32	264	312	256(100%),228,144,130	н.и.	-
23	16,62	260	336	294,280(100%),109	н.и.	-
24	16,78	259	362	289(100%),261,163,159,137,121,107	*N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид (Dawid et al., 2012; Sun et al., 2007)	+

н.и. – није идентификован;
sh – таласна дужина апсорпције у облику рамена за пик у UV-Vis спектру;
_ – подвучени фрагментациони јони са веома израженим интезитетима, који су по вредностима блиски главном, најинтензивнијем јону, код кога је интензитет постављен на 100% (у MS/MS спектрима)

4.3.1.1.1 Садржај пиперина у олеорезину плода црног бибера

Након квалитативне анализе олеорезина одређен је садржај пиперина у олеорезину (квантитативна анализа). Анализиран узорак олеорезина је припремљен у концентрацији од 0,5 mg/cm^3. За одређивање концентрације пиперина коришћени су стандардни раствори пиперина у метанолу у опсегу од 0,00625 до 0,4 mg/cm^3, на основу којих је конструисана калибрациона крива. Калибрациона крива пиперина, претходно дефинисана (ј-на 3.12 - *Експериментални део*), коришћена је за квантитативно одређивање концентрације пиперина у олеорезину. Добијени резултати су изражени као садржај пиперина на 100 g олеорезина (g/100 g олеорезина) и на 100 g биљног материјала (g/100 g биљног материјала).

Садржај пиперина у 100 g олеорезина износи 13,0 g/100 g олеорезина (13%), док је на нивоу биљног материјала 5,64 g/100 g биљног материјала (≈5,64%). Ови резултати указују на то да пиперин представља једну од доминантних компоненти олеорезина и показују добру сагласност са подацима из литературе, уз одређена одступања која могу бити последица разлика у методама изолације и анализе (Kapoor et al., 2009; Nagavekar and Singhal, 2018).

Упоређујући добијене резултате за етанолне екстракте и олеорезин, уочава се јасна разлика у садржају пиперина. Док је у екстрактима садржај варирао између 0,1 и 7,0 g/100 g биљног материјала, у олеорезину је достигао 5,64 g/100 g биљног материјала, односно 41,0% у односу на масу олеорезина. Ови подаци показују да су класичне технике са етанолом као растварачем мање ефикасне у односу на комплексније производе као што је олеорезин, где се постиже виша селективност према пиперину. У литератури су за екстракте добијене вредности садржаја пиперина у распону од 2–7,4% (Tripathi et al., 2022), док модерне методе попут микроталасно-ултразвучне и NADES екстракције дају садржај од 3,9–4,7% пиперина (Gorgani et al., 2017; Lwamba et al., 2023). Насупрот томе, у олеорезинима су утврђене веће концентрације, најчешће 35–55% пиперина (Nair, 2011; EFSA, 2022), што је у сагласности са резултатима добијеним у овој дисертацији. Студија Morsy-ja и Abd El-Salam-a је показала најсличније резултате у поређењу са овом дисертацијом, где је садржај пиперина износио 52,09 ± 0,01%, што представља 5,36 ± 0,04% у односу на суви биљни материјал (Morsy and Abd El-Salam, 2017).

Разлике између екстраката и олеорезина указују на то да селективност и ефикасност изолације пиперина зависе од врсте изолата, технолошког приступка и природе коришћеног растварача.

4.3.2 Биолошке активности изолованог олеорезина

4.3.2.1 Антиоксидативна активност олеорезина

Антиоксидативна активност олеорезина одређена је DPPH, ABTS, FIC, FRAP и феријанидном методом, а EC_{50}, FRAP и RP вредности дате су у Табели 4.24.

Степен неутрализације DPPH и ABTS радикала и способност хелирања јона гвожђа олеорезином приказани су на Сликама 4.18-4.20, редом.

Табела 4.24 Антиоксидативна активност олеорезина одређена различитим антиоксидативним тестовима

Концентрација олеорезина, mg/cm^3	**DPPH (EC_{50}, mg/cm^3)** 20 минута инкубација	**DPPH (EC_{50}, mg/cm^3)** без инкубације
0,0125-0,5	0,29 ± 0,003	0,88
	ABTS (EC_{50}, mg/cm^3) 6 минута инкубација	
0,078-5	1,47 ± 0,075	
	FIC (EC_{50}, mg/cm^3) 10 минута инкубација	
0,0156-2	0,94 ± 0,025	
	FRAP (mgEFe^{2+}/g олеорез.) 30 минута инкубација	
0,5	31,02 ± 0,188	
	RP (Fe^{3+}- Fe^{2+}) (mg GKE/g c.e.) 30 минута инкубација	
0,5	18,50 ± 0,087	

Антиоксидативна активност олеорезина црног бибера анализирана је различитим методама које се заснивају на различитим механизмима деловања. Олеорезин је показао различит степен ефикасности у зависности од примењеног теста.

Олеорезин је применом DPPH теста показао EC_{50} вредност од 0,29 mg/cm^3 након 20 минута инкубације, што указује на одличан радикал „scavenging“ потенцијал (способност „хватања“ слободних радикала). Међутим, етанолни екстракти су у овом

тесту били ефикаснији, нарочито код екстраката добијених екстракцијом уз рефлукс (0,112 mg/cm^3) и Soxhlet екстракцијом (0,120 mg/cm^3), док су екстракт добијен мацерацијом (0,152 mg/cm^3) и ултразвучном екстракцијом (0,142 mg/cm^3) показали нешто слабије активности (Табела 4.13). Сличне вредности за олеорезин објавили су Kapoor и сарадници (2009), који су утврдили јачи антиоксидативни ефекат етил-ацетатног у односу на етанолни олеорезин (Kapoor et al., 2009). Krishna и сарадници (2010) и Dang и Phan (2014) такође су потврдили антиоксидативни ефекат применом DPPH теста (Kapoor et al., 2009; Krishna et al., 2010; Dang and Phan, 2014).

Применом ABTS теста одређена је EC_{50} вредност олеорезина од 1,47 mg/cm^3, што је приближно вредностима добијеним за екстракте добијене екстракцијом уз рефлукс и ултразвучном екстракцијом (~1,01 mg/cm^3, Табела 4.14). Singh и сарадници (2013) показали су да олеорезини белог бибера имају нешто јачу ABTS активност у односу на црни, али да су оба типа значајни антиоксиданси, док су Dang и Phan (2014) указали на добру ABTS активност олеорезина добијеног суперкритичном екстракцијом (Singh et al., 2013; Dang and Phan, 2014).

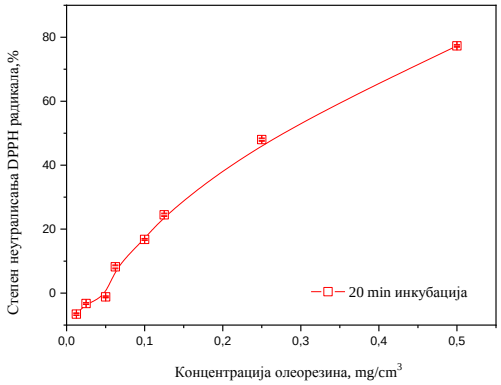
Према FIC тесту, олеорезин је показао већу способност хелирања јона гвожђа (EC_{50} = 0,94 mg/cm^3) у односу на све етанолне екстракте (1,14–1,65 mg/cm^3, Табела 4.15), што потврђују истраживања Kapoor и сар. (2009), који су објавили да је антиоксидативна активност олеорезина делимично заснована на хелирању јона метала (Kapoor et al., 2009).

FRAP вредност анализираног олеорезина (31,02 mgEFe^{2+}/g олеорезина) била је нешто виша у односу на екстракте (63–67 mgEFe^{2+}/1g екс., Табела 4.16), што указује на допринос липофилних компоненти попут пиперина и *β*-кариофилена редукционој активности, а у складу је са истраживањима Kapoor и сарадника (2009) и Krishna и сарадника (2010) (Kapoor et al., 2009; Krishna et al., 2010).

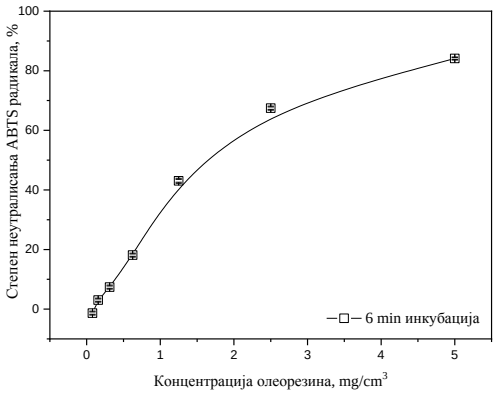
У ферицијанидној методи олеорезин је имао вредност од 18,5 mg GKE/g, док су екстракти показали упоредиве или нешто више вредности (22–31 mg GKE/g, Табела 4.17), при чему је ултразвучни екстракт показао најјачу активност.

Практични значај антиоксидативне активности олеорезина потврђен је и у раду Tipsrisukond и сарадника (1998), где је олеорезин добијен суперкритичном екстракцијом значајно инхибирао липидну пероксидацију у млевеном месу и био упоредив или чак бољи од синтетичких антиоксиданаса BHA и BHT (Tipsrisukond et al., 1998). У целини, и резултати ове дисертације и подаци из литературе показују да етанолни екстракти, захваљујући већем садржају фенола, испољавају супериорну

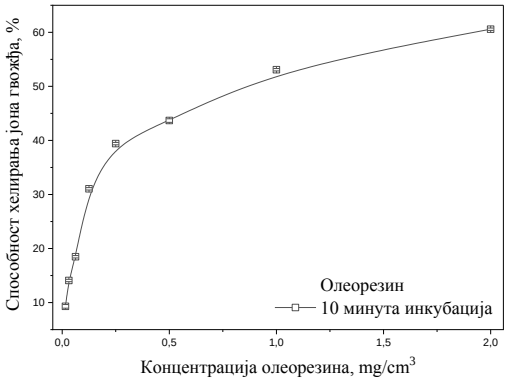
активност у тестовима попут DPPH, ABTS, док олеорезин показује бољу хелирајућу способност (FIC) и упоредиву или нешто јачу редукциону моћ (FRAP, фericјанидна метода).



Слика 4.18 Зависност степена неутралисања DPPH радикала од концентрације олеорезина



Слика 4.19 Зависност степена неутралисања ABTS радикала од концентрације олеорезина



Слика 4.20 Зависност степена хелирања јона гвожђа од концентрације олеорезина

Антиоксидативна активност идентификованих једињења у олеорезину црног бибера показује сличну активност као и етанолни екстракти, што је очекивано с обзиром на веома сличан квалитативни састав. У олеорезину су доминантни пиперин и његови деривати (*cis/trans*-пиперанин, пиперилин, пиперлонгуминин, дихидропиперлонгуминин, изокавицин, пиперетини, пиперолеини A и B), као и бројни амиди и алкиламиди (ретрофрактамид, пелиторин, пипердардин, дехидропипернонолин, пиперцид, дехидроретрофрактамид C) (Табела 4.23). С обзиром да ова једињења поседују ароматичне прстенове и различите функционалне групе, њихова активност је умерена када је у питању неутрализација DPPH и ABTS радикала, али значајна у моделима редукционе способности и метал-хелирања, што је у складу са добијеним резултатима за примењене тестове (DPPH, ABTS, FIC, FRAP, ферицијанидна метода). Алкиламиде попут пелиторина и ретрофрактамида A карактерише индиректно антиоксидативно деловање преко већ поменуте инхибиције ACAT ензима и активације Nrf2/HO-1 сигналног пута (Rho et al., 2007; Ngo et al., 2017). Такође, пиперлонгуминин и дихидропиперлонгуминин показују потенцијалну неуропротективну активност кроз инхибицију настанка *β*-амилоида (Qi et al., 2009).

Закључно, олеорезин црног бибера, захваљујући комбинацији амидних деривата пиперина и терпенских компонената етарског уља, представља богатији извор липофилних једињења у односу на етанолне екстракте и, иако дели сличан антиоксидативни профил, испољава наглашенију активност у FIC и FRAP тестовима, што потврђује кључну улогу липофилних састојака у обликовању укупне антиоксидативне ефикасности.

4.3.2.2 Антимикробна активност олеорезина

Антимикробна анализа показала је да олеорезин црног бибера испољава антимикробну активност према тестираним микроорганизмима, са вредностима МИК у опсегу од 1,56 до 5 mg/cm^3 (Табела 4.25). Најосетљивији сој био је *Bacillus cereus* ATCC 11778, са МИК = 1,56 mg/cm^3, док су остали сојеви (*Salmonella spp., Escherichia coli, Candida albicans*) показали нижу осетљивост (МИК = 5 mg/cm^3). Упоређујући ове резултате са стандардним антибиотицима и антимикотицима (хлорамфеникол, ципрофлоксацин, нистатин), јасно је да је активност олеорезина значајно слабија, с обзиром да су МИК вредности лекова неколико редова величине ниже. Такође, ММК за све тестиране микроорганизме износила је >5 mg/cm^3, што указује да олеорезин

углавном има микробиостатски, а не микробицидни ефекат у анализираним концентрацијама.

Табела 4.25 Минималне инхибиторне (МИК) и микробицидне (ММК) (бактерицидне/фунгицидне) концентрације олеорезина црног бибера у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама

Бактерија/ гљива	*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја	Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Олеорезин	МИК, mg/cm^3							
	5	>5	1,56	2,5	5	>5	5	2,5
	ММК, mg/cm^3							
	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
Антибиотик/ антимикотик	МИК, mg/cm^3							
	хлорамфеникол		ципрофлоксацин				нистатин	
	0,006	0,003	0,000031 25	0,000062 5	0,0000 078125	0,0000 078125	0,004	0,004

Добијени резултати су у складу са литературом која наводи да је пиперин, као главни алкалоид олеорезина, превасходно одговоран за антимикробну активност, али да је његов ефекат слабији у поређењу са синтетичким антибиотицима и да може деловати синергистички у комбинацији са другим биљним метаболитима (Morsy and Abd El-Salam, 2017; Alves et al., 2022).

У овој дисертацији је утврђено да етанолни екстракти и олеорезин црног бибера испољавају умерену антимикробну активност. Најниже МИК вредности забележене су према *Bacillus cereus* (0,78–1,56 mg/cm^3), док су *Salmonella spp., Escherichia coli* и *Candida albicans* показале слабију осетљивост (МИК = 2,5–5 mg/cm^3). У већини случајева ММК је била већа од 5 mg/cm^3, што указује да су екстракти и олеорезин углавном деловали микробиостатски, а не микробицидно у анализираним концентрацијама. Поређењем екстраката и олеорезина није уочена значајна разлика у спектру активности, иако су поједини екстракти (Soxhlet, ултразвучни екстракт) имали

нешто ниже МИК вредности у односу на олеорезин, нарочито према *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Candida albicans* ATCC 24433 (Табела 4.18).

У поређењу са литературом, добијени резултати у овој дисертацији показују сличан тренд, али уз више МИК вредности. Наиме, Morsy и Abd El-Salam (2017) су навели да је МИК олеорезина према *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* био 31,25 μg/cm^3, а према *Candida albicans* 62,5 μg/cm^3, што је ниже од вредности добијених у овој дисертацији (Morsy and Abd El-Salam, 2017). Према студији Martinelli и сарадника (2017), олеорезини из различитих врста бибера показали су минималне инхибиторне концентрације 0,25% за *Bacillus cereus,* 1,00% за *Escherichia coli,* 0,50% за *Staphylococcus aureus* и 0,50% за *Candida albicans* (Martinelli et al., 2017). С друге стране, добијени резултати за олеорезин (Табела 4.25) су у складу са налазима Alves и сарадника (2022), који указују да је активност олеорезина слабија у односу на екстракте добијене динамичким техникама попут Soxhlet екстракције, док екстракт добијен мацерацијом показује најслабију активност (Alves et al., 2022).

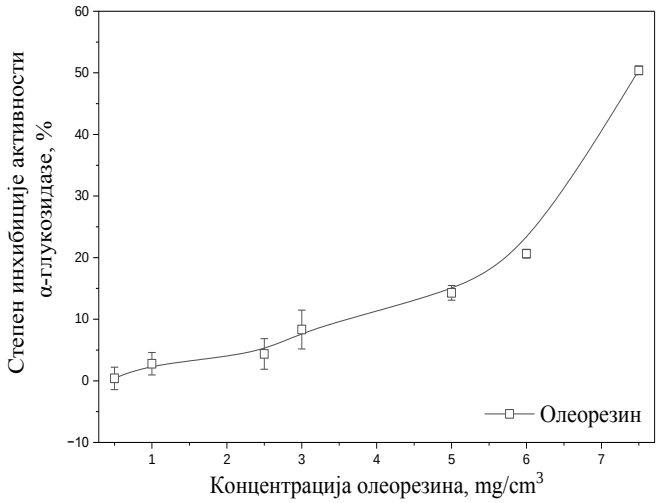
Закључно, добијени резултати потврђују да олеорезин црног бибера има ограничену антимикробну ефикасност, са израженијим ефектом према Грам-позитивним бактеријама (*Bacillus cereus*), док су Грам-негативне бактерије и гљиве отпорније. У поређењу са литературом, активност је нешто слабија, али олеорезини делују углавном микробиостатски, са нижом активношћу у односу на екстракте добијене Soxhlet методом и чисти пиперин.

Упоређујући са стандардним антибиотицима и антимикотицима (хлорамфеникол, ципрофлоксацин, нистатин), који су у овом истраживању показали много ниже МИК вредности, јасно је да је антимикробна активност екстраката и олеорезина вишеструко слабија. Ипак, њихова безбедност као природних производа и потенцијал за синергистичко деловање са класичним антибиотицима чине их значајним кандидатима за развој биофункционалних препарата и природних адитива у прехрамбеној индустрији (Feudjieu et al., 2023; Shang et al., 2024).

4.3.2.3 Антихипергликемијска активност олеорезина

У овом делу је анализирана способност олеорезина плода црног бибера да инхибира активност *α*-глукозидазе, према већ описаној методи Apostolidis-a и сарадника (2007), уз мање модификације (Apostolidis et al., 2007). Узорак је показао *in*

vitro антихипергликемијску активност са EC_{50} вредношћу од 7,603 ± 0,052, а степен инхибиције је графички приказан на Слици 4.21.



Слика 4.21 Зависност степена инхибиције *α*-глукозидазе од концентрације олеорезина

У поређењу са већ приказаним резултатима за етанолне екстракте црног бибера (Табела 4.20) олеорезин је показао мало слабију активност. Фитохемијска анализа олеорезина плода црног бибера је показала сличан хемијски састав као и етанолни екстракти где су нека од присутних једињења већ описана као потенцијални инхибитори (пиперин, *β*-карофилен, лимонен, сабинен и *α*-пинен) *α*-глукозидазе, што пружа логично објашњење за уочену активност олеорезина (Pop et al., 2024; Ara et al., 2023). Иако је активност нешто нижа у односу на етанолне екстракте, чињеница да олеорезин представља концентровану фракцију која садржи и липофилне и амфипатичне молекуле указује на његов специфичан профил деловања.

У досадашњој литератури нису пронађени радови који директно анализирају антихипергликемијску активност олеорезина црног бибера. Једини рад који укључује олеорезин бибера односи се на олеорезин белог бибера употребљен за синтезу селено-наночестица, где су забележени антидијабетички ефекти у *in vivo* моделу, али без могућности директног приписивања деловања самом олеорезину (Keerthana et al., 2021).

Сумирајући, може се закључити да олеорезин црног бибера показује *in vitro* антихипергликемијску активност кроз инхибицију *α*-глукозидазе, вероватно захваљујући присуству алкалоида пиперинског типа и сродних деривата. Истовремено, недовољно података у литератури оставља простор за будућа истраживања која би

могла детаљније да процене његов потенцијал и омогуће поређење са другим екстрактима и изолованим компонентама ове биљке.

4.3.2.4 Антиинфламаторна активност

У литератури BSA протеинска денатурација се најчешће користи за проучавање у води растворљивих и умерено поларних биолошки активних екстраката, јер овај тест процењује способност супстанци да инхибирају денатурацију протеина у воденој средини у трагу са механизмом неких антиинфламаторних лекова и природних фенолних једињења (Bailey-Shaw et al., 2017).

Примена BSA *in vitro* теста на етарска уља и олеорезине, као код црног бибера, има више методолошких ограничења. Пре свега, ова метода је развијена за узорке који садрже поларне антиинфламаторне супстанце растворљиве у воденој фази и чија интеракција са протеином може да инхибира његову денатурацију током загревања или другог стреса. За липофилне компоненте, као што су угљоводонична терпенска једињења и смоласте фракције олеорезина, растворљивост у BSA систему је ограничена и може довести до неспецифичних интеракција, фазних раздвајања или нетачних процена инхибиције. Због тога резултати таквих тестова могу бити непоуздани или тешки за тумачење у контексту стварног антиинфламаторног механизма. Ово ограничење метода подржава и примена у литератури, где се BSA антиинфламаторна анализа најчешће користи за фенолне и поларне екстракте биљака и сличне материјале, али ретко за етарска уља која су у већој мери састављена од хидрофобних компоненти (Bailey-Shaw et al., 2017).

С обзиром на наведено, у оквиру овог рада није примењена BSA *in vitro* метода за етарска уља и олеорезин црног бибера јер она не би поуздано одражавала специфичне антиинфламаторне механизме оваквих липофилних мешавина, и резултати би могли бити методолошки неадекватни за научну интерпретацију. Овакав избор методолошког оквира је стога научно оправдан, те омогућава боље фокусирање на методе које су адекватне за овакав тип узорака.

4.4 Изолација и карактеризација масног уља из плода црног бибера

Тренутно постоји ограничена доступна литература о масном уљу из плода црног бибера (Daulatabad et al., 1995, Hossain et al., 2014, Ahmad et al., 2024). Иако су бројна истраживања фокусирана на етарско уље и активне компоненте попут пиперина, научни подаци о саставу, биолошким својствима и потенцијалним применама масног уља црног бибера су ретки. Из наведених разлога је један од циљева истраживања у овој дисертацији била првенствено изолација, а касније и карактеризација масног уља црног бибера. Даља истраживања су неопходна како би се боље разумела његова хемијска и биолошка својства.

Принос „масног уља“ црног бибера у овом истраживању је био 6,78 g/100 g б.м. односно 6,78%. Изоловано масно уље представља непокретну жуту масу, која својим ароматичним мирисом подсећа на бибер. Претходна истраживања су доказала присуство масног уља у плоду црног бибера од 6-12% (Peter, 2006; Al-Jasass and Al-Jasser, 2012; Morshed et al., 2017; Hossain et al., 2014), што одговара и добијеном приносу. Међутим, треба нагласити да се применом хексана као растварача не изолује само чисто масно уље већ и остале нежељене примесе које могу дати лажан већи принос уља.

Принос масног уља је један од битних фактора, али је и састав масних киселина за масно уље такође веома битан. Засићене масне киселине су често део овог уља. Палмитинска киселина, према поменутим истраживањима (Daulatabad et al., 1995, Hossain et al., 2014) чини од 12,24% до 27,2% укупног састава уља, док садржај стеаринске киселине варира од 7,3% до чак 17,28%. У студији Hossain-a (2014) је пронађено чак 68,71% засићених масних киселина, са доминантним уделом лауринске киселине (26,93%) и миристинске киселине (8,26%), што је карактеристично за масна уља попут кокосовог. Олеинска киселина, варира од 17,82% до 29,9%, док је линолна киселина, као есенцијална омега-6 масна киселина, присутна са око 7,7% у уљу бибера. Присуство палмитолеинске киселине (13,47%), које је забележено у студији Hossain-a (2014), даје овом уљу додатну нутритивну вредност (Hossain et al., 2014).

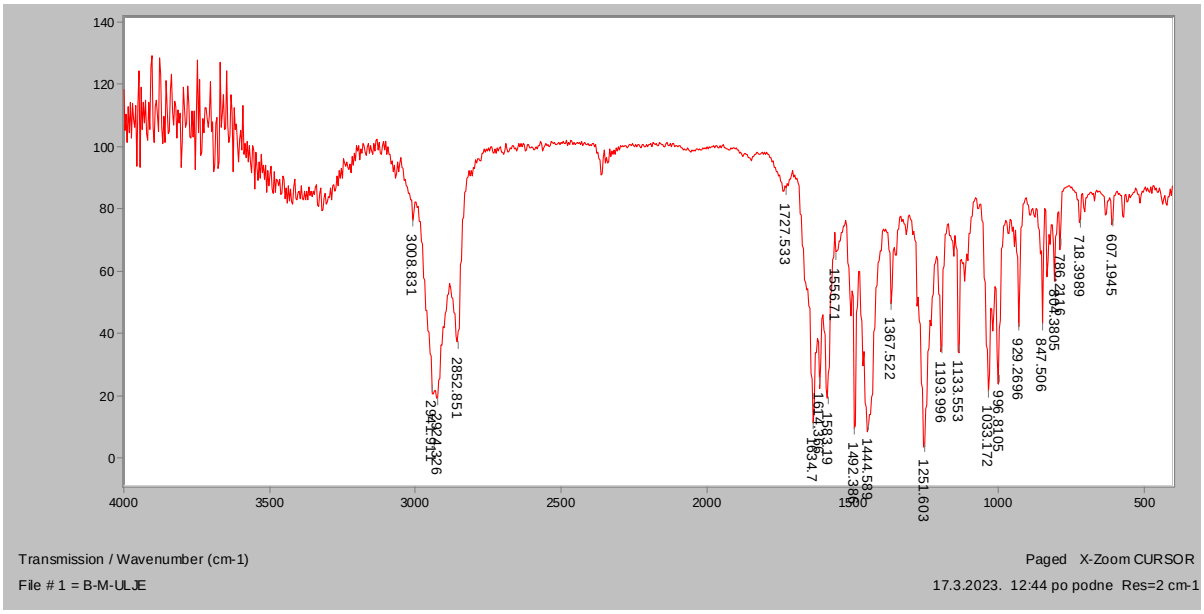
„Масно уље“ које је добијено у овој дисертацији је густа, жута паста, што може бити последица високог садржаја воскова и несапонификованих материја као и великог удела засићених масних киселина, попут лауринске и лигноцерске, као што је забележено у студији Hossain-a (2014). Уље је описано као вискозно, полу-чврсто и

тамно зелено, што указује на присуство стерола, угљоводоника и алкохола, који доприносе густој структури. Ови фактори заједно објашњавају зашто уље може изгледати више као паста него као течно уље. Ипак, конзистенција и сензорне особине нису у складу са типичним изгледом биљних масних (фиксних) уља, која су по правилу бистра, течно-вискозна и триглицеридна уља (Bhattacharya et al., 2012). Добијено уље у овој дисертацији показује висок садржај воска (≈29%) и низак киселински број (0,645 mg KOH/g), што је значајно одступање од вредности карактеристичних за права масна уља, која обично садрже мање од 1% воска и имају киселински број у опсегу 0,5–2 mg KOH/g (Rocha et al., 2017). Ови подаци указују да изолована липофилна фракција има пре свега воскасто-олеорезински карактер, а не особине триглицеридног масног уља.

Имајући у виду да макроскопске и физичко-хемијске особине добијеног изолата нису упућивале на присуство класичног масног уља, било је неопходно спровести спектроскопске и хроматографске анализе ради детаљније карактеризације његовог хемијског састава.

4.4.1 FT-IR анализа масног уља

FT-IR спектар изоловане липофилне фракције црног бибера (Слика 4.22) показује присуство карактеристичних опсега за алкилне ланце (асиметрично и симетрично истезање C–H веза при ~2920 и 2850 cm^{-1}), као и слабији максимум при око 1735 cm^{-1} који одговара карбонилним (C=O) вибрацијама естарских група. У опсегу 1460–1375 cm^{-1} присутне су вибрације савијања $–CH_2$ и $–CH_3$ група, док су у делу од 1160–1050 cm^{-1} уочљиве C–O вибрације које се могу приписати естарским и етарским везама карактеристичним за воскове. Широка, слабо изражена трака око 3400 cm^{-1} указује на присуство хидроксилних или амидних група, што може потицати од алкалоида и фенолних једињења типичних за олеорезин црног бибера. Овакав FT-IR спектар не одговара профилу класичних биљних масних уља, која имају изражен и интензиван C=O опсег у области 1740–1750 cm^{-1} и јасне C–O вибрације у области 1240–1160 cm^{-1}, као што је описано за типична триглицеридна уља сунцокрета, кикирикија и куминовог семена (El-Agbar et al., 2018). Резултати јасно указују да изолована фракција не представља класично масно уље, већ мешавину воскова и липофилних секундарних метаболита карактеристичних за олеорезин црног бибера.



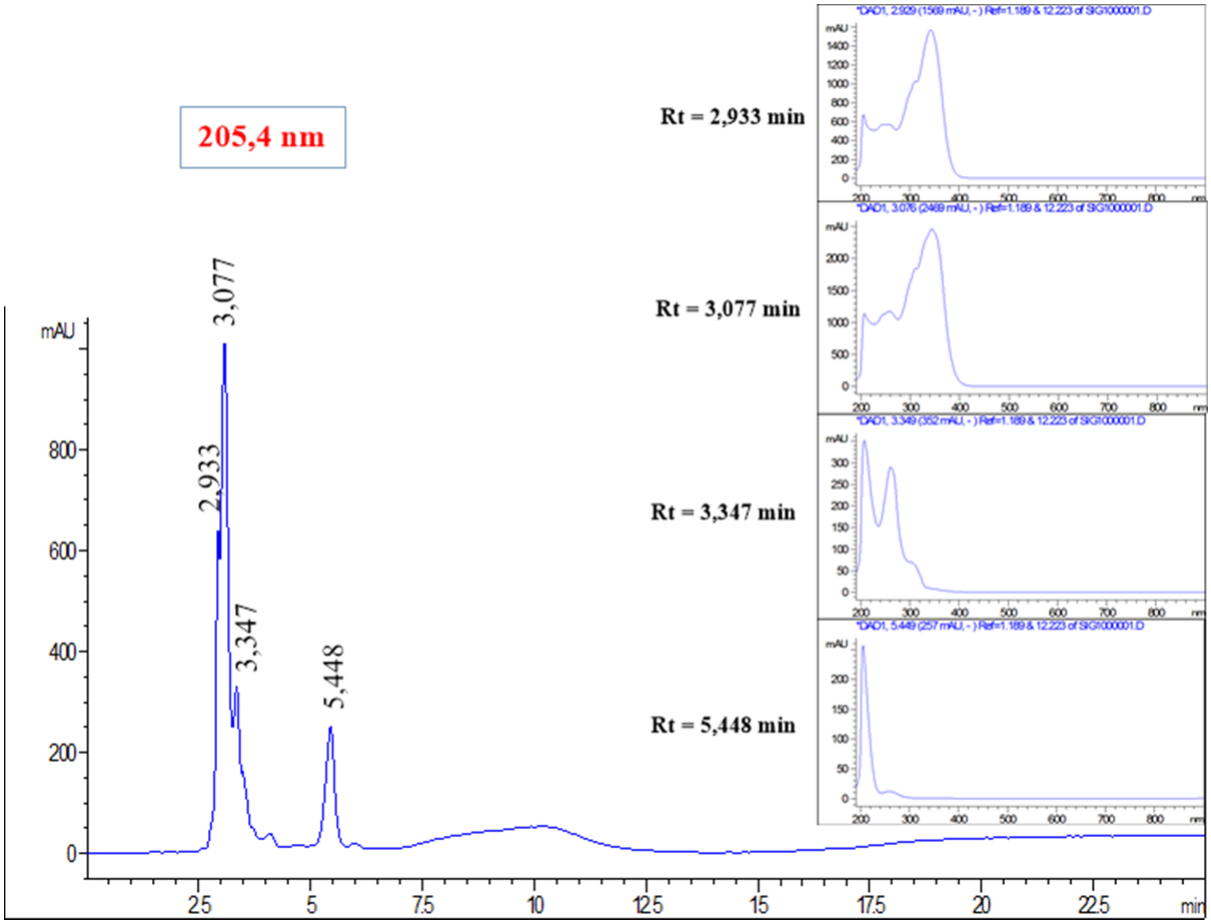
Слика 4.22 FT-IR спектар изолованог масног уља црног бибера

Како би се ови резултати потврдили и детаљније испитао хемијски састав масног уља, наредни корак је био HPLC анализа ради идентификације појединачних липидних компоненти и евентуалног утврђивања постојања триглицеридне фракције у узорку.

4.4.2 HPLC анализа масног уља

HPLC хроматограм изолованог „масног уља“ црног бибера (Слика 4.23), добијеног Soxhlet екстракцијом из плода бибера *n*-хексаном, показује више рано елуирајућих пикова у интервалу 3–5,5 min, без присуства изражених пикова у каснијој зони елуирања. При примењеним хроматографским условима и коришћеној колони (Zorbax Eclipse XDB-C18), очекује се да високо хидрофобна једињења, као што су триглицериди и метил-естри дуголанчних масних киселина, показују повећану ретенцију и елуирају у каснијој зони хроматограма, што је у складу са литературним подацима за анализу биљних масних уља и њихових метил-естара на оваквом типу колона (Hartman and Lago, 1973; Aveldano et al., 1983; Rocha et al., 2017). Најинтензивнији пик јавља се на 3,077 min, док су остали пикови нижег интензитета на 2,933 min, 3,347 min и 5,448 min, без појаве каснијих пикова који би указивали на присуство триглицерида или деривата масних киселина. Присуство два доминантна пика у почетној фази елуирања (Rt = 2,933 и 3,077 min) указује да је реч о средње поларним компонентама, што је у складу са хроматографским понашањем пиперина и

сродних амидних деривата који су главни састојци олеорезинске фракције бибера, а што се додатно може потврдити на основу UV спектара (Слика 4.23) (Suvarna et al., 2022a). На основу тога, може се закључити да добијени *n*-хексански изолат представља липофилну олеорезинску мешавину терпенских и амидних једињења, а не масно уље богато триглицеридима у класичном смислу.



Слика 4.23 HPLC-DAD хроматограм узорка „масног уља“ плода црног бибера

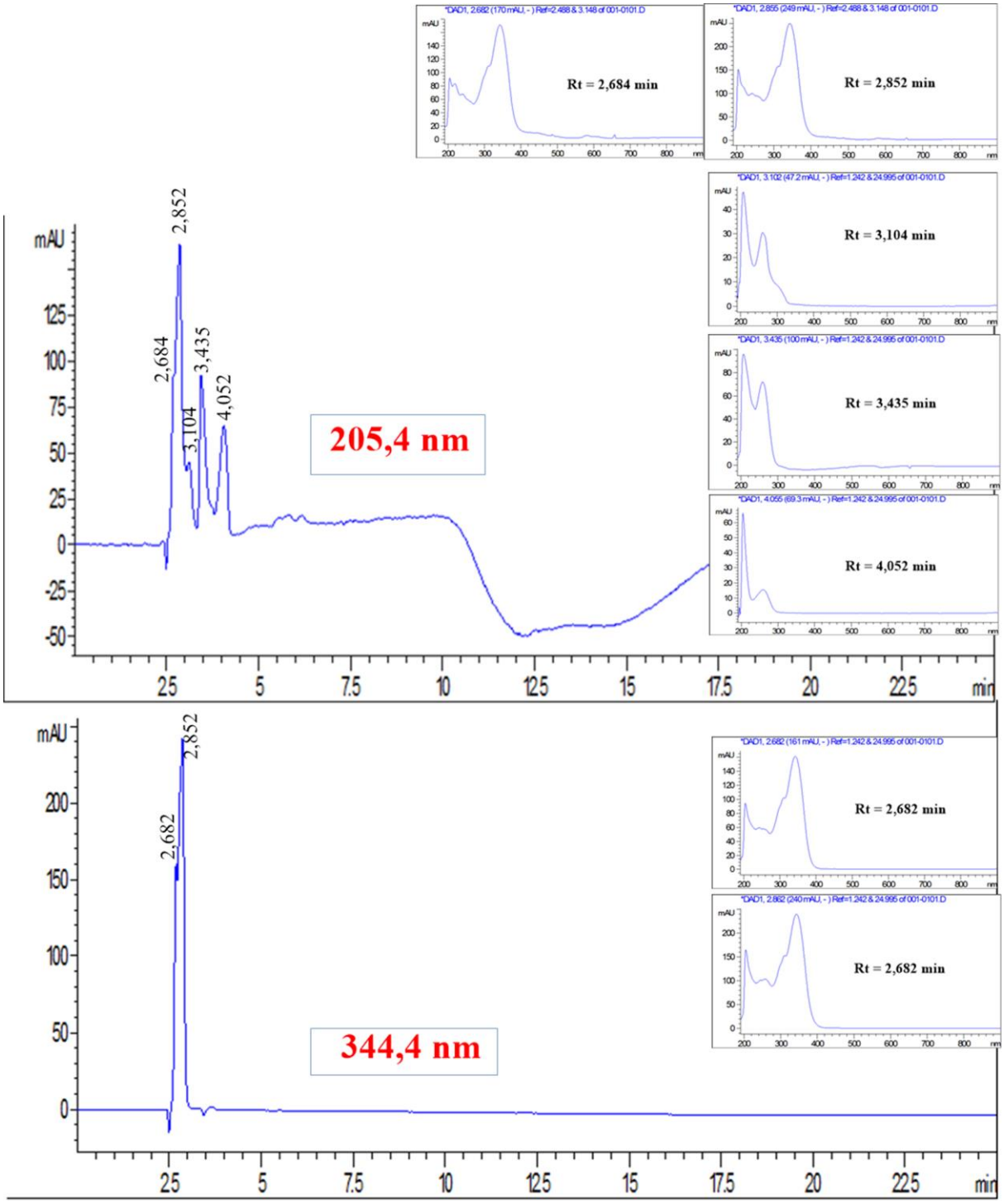
4.4.3 HPLC анализа метил етара масних киселина (метилованог n-хексанског изолата)

HPLC хроматограми снимљени на таласним дужинама детекције од 205 nm и 344 nm добијени након метиловања липидне фракције (*n*-хексанског изолата) по Хартмановом поступку показују један доминантан пик на t_{ret} = 2,852 min, као и неколико мањих пикова у интервалу 2,5-5 min, док изнад 5 min нема детектованих сигнала (Слика 4.24). Оваква хроматографска слика указује да је реакција метанолизе резултирала ограниченим бројем метилованих производа, без формирања серије добро

раздвојених пикова карактеристичних за метил-естре масних киселина (Hartman and Lago 1973).

Упоредна анализа хроматограма снимљених на 205 nm и 344 nm показује да анализирани узорак не поседује хроматографски профил карактеристичан за метил-естре масних киселина. На обе таласне дужине детектован је доминантан пик (t_{ret} = 2,852 min), чији UV спектар, са израженом апсорпцијом у области око 340 nm, одговара пиперину или његовим изомерима (Слика 4.24). Насупрот томе, остали пикови регистровани на 205 nm не показују значајну апсорпцију у подручју виших таласних дужина, што указује на одсуство конјугованих ароматичних хромофора. Добијени резултати јасно указују да је у анализираном узорку присутна доминантна UV-активна пиперамидна компонента, док липидна фракција, укључујући метил-естре масних киселина, није поуздано детектована примењеном HPLC-DAD методом.

Мањи пикови уочени у раној зони хроматограма могу се приписати споредним или парцијално метилованим липидним дериватима, али њихова ниска UV-апсорпција и одсуство карактеристичне елуационе серије не указују на присуство типичних МЕМК деривата, као што су метил-палмитат, метил-стеарат или метил-олеат (Aveldano et al., 1983). Поређењем овог хроматограма са литературним подацима за биљна уља (Hartman and Lago, 1973; Rocha et al., 2017), у којима се МЕМК компоненте елуирају као низ добро раздвојених пикова у каснијим зонама хроматограма, јасно се види да нема раздвојених МЕМК. Стога се може претпоставити да је током метиловања вероватно настала само занемарљива количина метил-естара, услед присуства воскова што недвосмислено потврђује одсуство триглицерида (масног уља) у анализираном узорку. Уместо тога, хроматографски профил сугерише да је присутна воскасто-терпенска олеорезинска фракција, у којој пиперин остаје доминантна UV-активна компонента (прилог UV-Vis спектар пиперина са HPLC-а).



Слика 4.24 HPLC-DAD хроматограм метил естара масних киселина (метилованог *n*-хексанског изолата) „масног уља“

4.4.3.1 UHPLC-DAD-MS/MS анализа матил естара масних киселина (метилованог n-хексанског изолата)

Као додатна потврда исправности резултата HPLC анализе, извршена је и UHPLC-DAD-MS/MS хроматографија *n*-хексанског изолата. Ова анализа је такође

показала да у узорку нису детектовани класични метил-естри масних киселина (МЕМК), већ искључиво једињења амидне природе, карактеристична за олеорезинску фракцију црног бибера, што се може видети у Табели 4.26.

Табела 4.26 Хемијски састав метилованог *n*-хексанског изолата плода црног бибера анализиран применом UHPLC-DAD-MS/MS методе

Пик, бр.	**t_R, min MS**	**λ_{max}, nm**	**Молекулски јон $[M+H]^+$ [a]$[M+Na]^+$ *m/z***	**MS/MS фрагментациони јони**	**Идентификовано једињење/Литература**	**Метиловани *n*-хексански изолат**
1	4,90	268 347	595	449,433(100%),287	кемферол-рамнозид-галактозид (MassBank: PR101019)	-
2	5,58	267 352	595	449,433,287(100%)	кемферол-рамнозид-глукозид (MassBank: PR101011)	-
3	6,77	294 319	314 (336[a])	177(100%),145,117	н.и.	-
4	8,41	341	288	203(100%),152,137,115	*cis/trans*-пиперанин (Liang et al., 2021)	±
5	9,30	344 312sh	272	201(100%)/202,171,135	пиперилин (Dawid et al., 2012)	+
6	10,10	340 310sh	274	201(100%),173,135	*cis/trans*-пиперлонгуминин (Liang et al., 2021)	+
7	10,02	341 310sh	276	203/202/201,175,161,135(100%)	дихидропиперлонгуминин (Kotte et al., 2014)	+
8	10,40	-	288	288,201/202(100%)/203,175,161,135,86	*cis/trans*-пиперанин (Liang et al., 2021)	+
9	10,45	-	274	274(100%),256,230,102,88	н.и.	+
10	10,53	344 312sh	286 (308[a])	201(100%),161,171,135	пиперин (*E,E*–(*trans-trans*)–пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+
11	10,77	344 312sh	286	201(100%),171,135	изокавицин (*E,Z*–(*trans - cis*)–пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+
12	11,72	258	314	228(100%)/229,201,171,161,131,112	пипердардин (Liang et al., 2021)	+
13	11,63	359	312 (334[a])	227(100%),197,112	пиперетин–изомер 1 (Liang et al., 2021)	+
14	11,70	353	312	227(100%),197,112	пиперетин–изомер 2 (Liang et al., 2021)	+
15	11,83	263 306	326	255,227(100%),197,165,98	1–[(2*E*,4*E*,8*E*)–9–(3,4–метилендиоксифенил)–2,4,8–нонатриеноил] пиролидин (Liang et al., 2021)	+
16	11,93	262 308	316	231,213(100%),194,135	пиперолеин А (Liang et al., 2021)	+

Наставак Табеле 4.26

17	12,11	276	328	255,227(100%)/229,197, 187,173,161,131	ретрофрактамид (Liang et al., 2021)	+
18	12,17	264	224	168,151,133,123,109,95, 81,69	пелиторин (Liang et al., 2021)	+
19	12,40	263	340	322,255,227(100%),197, 179,112	дехидропиперноналин (Liang et al., 2021)	+
20	12,57	312	342	229(100%),199,161,135	пиперноналин (PubChem CID: 9974595)	+
21	12,85	263 306	356	283,265,255,234,215,135 (100%)	пиперцид (Liang et al., 2021)	+
22	12,90	362 307	344	241,222,211,185,175,145 ,135(100%),112	пиперолеин B (Liang et al., 2021)	+
23	14,68	279	332	233,231,135(100%),121	дехидроретрофрактамид *C*–изомер (Liang et al., 2021)	±
24	15,33	260	334	306,292,149,135,121(10 0%),109	н.и.	+
25	15,89	264	312	256(100%),228,144,130	н.и.	+
26	16,34	260	336		н.и.	±
27	16,50	259	362	289(100%),261,163,159, 137,121,107	*N*–изобутил–2*E*,4*E*,8*Z*–еикосатриенамид (Dawid et al., 2012; Sun et al., 2007)	+

[a] – катјонизовани молекулски јон са натријумом, често присутан у ESI-MS спектрима
[b] – https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay
[c] – https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound
± – слабије присуство детектоване компоненте; MS/MS спектар није, али је детектован пик молекулског јона
н.и. – није идентификован
sh – таласна дужина апсорпције у облику рамена за пик у UV-Vis спектру
_ – подвучени фрагментациони јони са веома израженим интезитетима, који су по вредностима блиски главном, најинтензивнијем јону, код кога је интензитет постављен на 100% (у MS/MS спектрима)

Укупно је детектовано 27 компоненти од којих су идентификоване 22, међу којима доминирају пиперин (*m/z* 286), његов изомер изокавицин (*m/z* 286), као и сродни пиперолеин A и B (*m/z* 316 и 344), пиперноналин (*m/z* 342), ретрофрактамид (*m/z* 328) и низ сродних *N*-изобутил-амидних деривата као што су пелиторин и пипероналин. Њихови MS/MS спектри показују доминантне фрагменте *m/z* 201, 171 и 135, што је карактеристично за амидне деривате пиперина (Liang i sar., 2021). Насупрот томе, нема једињења у фракцији које је показало масено-спектралне карактеристике метил-естара, какви би били јони $[M+H]^+$ или $[M+Na]^+$ у области *m/z* 255–299, као ни MS/MS фрагменте на са губитком $–OCH_3$, који су типични за МЕМК као што су метил-палмитат, метил-стеарат или метил-олеат. У читавом временском опсегу елуирања (4,9–16,5 min) није уочен сигнал који би се могао приписати дуголанчним метилованим карбоксилним јонима (*m/z* 270–330). Ови резултати показују да метанолиза највероватније није резултирала настанком метил-естара масних киселина, што указује на то да у полазном узорку није постојала триглицеридна фракција. Доминирајућа

присутност пиперина и сродних пиперамидних структура уместо деривата МЕМК, указује на то да добијени липидни изолат није класично масно уље, већ воскасто-амидна олеорезинска фракција у којој пиперин и сродни амиди представљају главне компоненте.

Квантитативном UHPLC-DAD-MS/MS анализом одређен је садржај пиперина у метилованом *n*-хексанском изолату плода црног бибера на основу калибрационе криве пиперина (ј-на 3.22, *Експериментални део*).

Израчунавањем по граму метилованог *n*-хексанског изолата добијено је 415,88 mg пиперина/g, односно 41,59 g пиперина/100 g метилованог изолата, односно анализираног узорка, с обзиром да присуство метил естара није доказано. Ови резултати указују да пиперин, као стабилно амидно једињење, остаје присутан и након поступка метиловања, док истовремено није детектовано значајно присуство метил-естара масних киселина, што потврђује одсуство триглицерида у узорку.

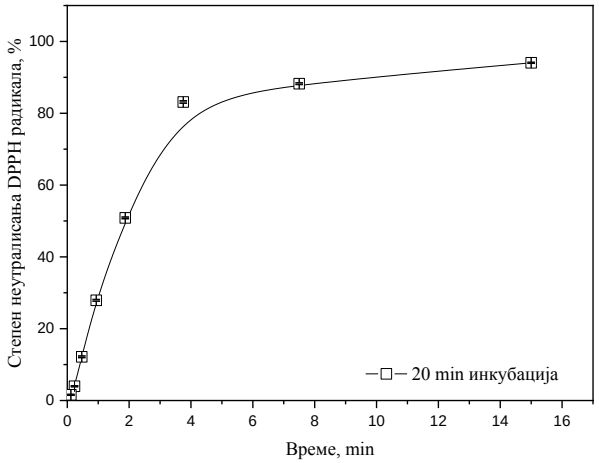
4.4.4 Биолошке активности „масног уља“ (изолованог *n*-хексанског изолата) плода црног бибера

4.4.4.1 Антиоксидативна активност

Антиоксидативна активност изолованог *n*-хексанског изолата црног бибера (означеног као „масно уље“) проучавана је са циљем да се утврди у којој мери његова биолошка активност одступа од активности типичног олеорезина бибера, чији је хемијски састав по природи најсличнији овом липофилном изолату. С обзиром на то да претходне анализе (FT-IR, HPLC и UHPLC-DAD-MS/MS) нису потврдиле присуство триглицеридне фракције, већ углавном амидних и терпенских једињења, процена антиоксидативне активности спроведена је као комплементарни тест ради утврђивања да ли таква липофилна фракција задржава биолошке особине типичне за олеорезин. Анализа је имала за циљ да утврди потенцијалне разлике у интензитету антиоксидативног дејства и тиме индиректно потврди сродност или одступање изолованог „масног уља“ у односу на познати профил олеорезинских екстраката бибера.

Антиоксидативна активност изолованог *n*-хексанског изтолата црног бибера, означеног као „масно уље“, одређена је DPPH методом ради поређења са активностима типичног олеорезина исте биљке (Слика 4.25). Добијена EC_{50} вредност износила је

1,982 ± 0,014 mg/cm^3, што указује на знатно слабији радикал „scavenging“ потенцијал у односу на етанолне екстракте и олеорезин црног бибера, чије су вредности из литературе у распону од 0,11 до 0,30 mg/cm^3 (Kapoor et al., 2009; Krishna et al., 2010; Dang and Phan, 2014).



Слика 4.25 Зависност степена неутралисања DPPH радикала од концентрације „масног уља“

На Слици 4.25 се види да је реакција неутрализације DPPH радикала релативно брза у почетним минутима, али да се већ након пет минута стабилизује на око 80–90% инхибиције, што указује на присуство ограниченог броја активних компоненти способних за донирање водониковог атома. Слабија антиоксидативна активност у односу на етанолне екстракте и олеорезин последица је пре свега хемијског састава изолованог *n*-хексанског изолата. FT-IR, HPLC и UHPLC-DAD-MS/MS анализе су показале да овај узорак не садржи триглицеридну фракцију нити фенолна једињења, већ углавном воскове, пиперин и сродне амидне деривате, који имају ограничену способност стабилизације слободних радикала. За разлику од тога, етанолни екстракти и олеорезин садрже значајне количине фенолних и терпеноидних једињења, што објашњава њихову већу DPPH активност и нижу EC_{50} вредност. Иако је антиоксидативна активност изолованог „масног уља“ умерена, његова брза почетна реакција указује да су присутне неке компоненте са лако доступним водоником (нпр. пиперин, пиперолеин или сродни амиди), који могу деловати као иницијални редуктанти. Међутим, одсуство дуготрајнијег ефекта и висока EC_{50} вредност потврђују да липофилна фракција бибера изолована *n*-хексаном не поседује антиоксидативни

потенцијал карактеристичан за олеорезин, већ представља систем са ограниченим редукционим деловањем, условљеним присуством неполарних, нефенолних једињења.

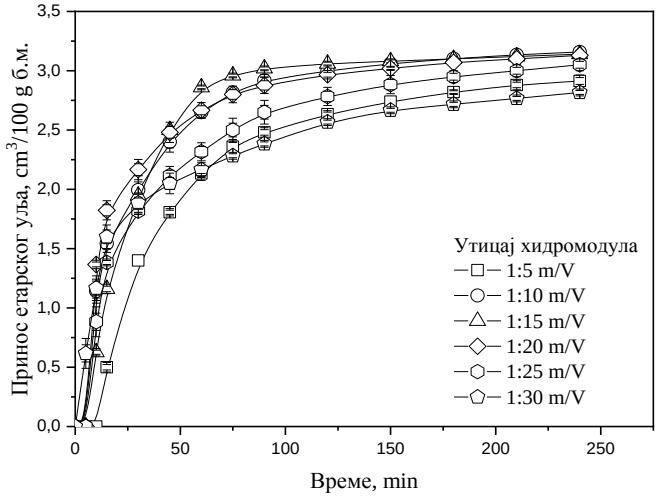
У целини, добијени резултати су у складу са литературним подацима (Kapoor et al., 2009; Singh et al., 2013), која указују да степен поларности растварача значајно утиче на антиоксидативни капацитет екстраката бибера, при чему се јача активност добија у поларнијим (етанолним, метанолним) системима, док неполарни екстракти, попут *n*-хексанског, садрже углавном неактивне или слабо активне липидне компоненте.

4.5 Хидродестилација

4.5.1 Техника хидродестилације I

4.5.1.1 Утицај хидромодула на принос етарског уља

Утицај различитих хидромодула (хидромодул 1:5 m/V до 1:30 m/V) на принос етарског уља из плода црног бибера за време хидродестилације од 240 min приказан је на Слици 4.26, док је у Табели 4.27 упоредно дат и степен хидродестилације (%) у односу на садржај етарског уља у полазном биљном материјалу (q_o, EV = 3,26 cm^3/100 g б.м.).



Слика 4.26 Зависност приноса етарског уља из плода црног бибера од времена хидродестилације при различитим хидромодулима (хидромодул 1:5 m/V до 1:30 m/V, време хидродестилације: 240 min)

Табела 4.27 Утицај хидромодула на принос етарског уља
(време хидродестилације: 240 min)

Принос етарског уља				
	180 min		240 min	
Хидромодул (m/V)	**cm^3/100 g б.м.**	**СХ, %***	**cm^3/100 g б.м.**	**СХ, %***
1:5	2,82	86,50	2,91	89,26
1:10	**3,10**	**95,09**	**3,16**	**96,93**
1:15	3,09	95,09	3,14	96,32
1:20	3,07	94,17	3,13	96,01
1:25	2,95	90,49	3,05	93,56
1:30	2,72	83,44	2,82	86,50

* Степен хидродестилације (СХ) уља изражен у процентима у односу на садржај етарског уља (q_o=3,26)

Као што се може видети са Слике 4.26 и из Табеле 4.28, највећи принос етарског уља из плода црног бибера постиже се применом хидромодула 1:10 m/V (3,16 cm^3/100 g б.м., односно 96,93%), који је и изабран за оптимални хидромодул.

Разлика између хидромодула при коме је добијен највећи принос етарског уља (1:10 m/V) и оног са најмањим приносом (1:30 m/V) је око 10%. Такође, занемарљива је разлика између хидромодула 1:10 m/V, 1:15 m/V и 1:20 m/V (Табела 4.28). Оптимална количина воде представља кључан фактор у овом процесу, јер уколико је њена запремина недовољна, не долази до потпуног разлагања колоидних структура и соли које окружују мехуриће етарског уља у епидермалном слоју, што доводи до смањеног приноса. Прекомерна количина воде може довести до растварања или емулзификације етарског уља, што умањује укупну ефикасност екстракције и економску исплативост процеса, због повећане потрошње енергије и продуженог трајања дестилације (Dao et al., 2020). Ови резултати су од значаја за индустријске процесе, јер доприносе оптимизацији ресурса и унапређењу квалитета финалног производа (Tran et al., 2019).

Принос етарског уља из плода црног бибера значајно зависи од примењеног хидромодула и технике изолације. Различити истраживачи су оптимизовали различите услове изолације како би се постигао већи принос уз минималне губитке етарског уља и оптималну потрошњу енергије. Примена хидромодула има кључну улогу у ефикасности хидродестилације. Ово је јасно показано у истраживању Dao и сарадника (2020), где је утврђено да варијација хидромодула од 1:2 m/V до 1:20 m/V доводи до разлике у приносу етарског уља од само 0,1%, при чему најнижи и највиши хидромодул дају једнак принос (0,65%), док је као оптималан издвојен 1:5 m/V са највећим приносом од 0,75% (Dao et al., 2020). Студија Tran и сарадника (2019) је

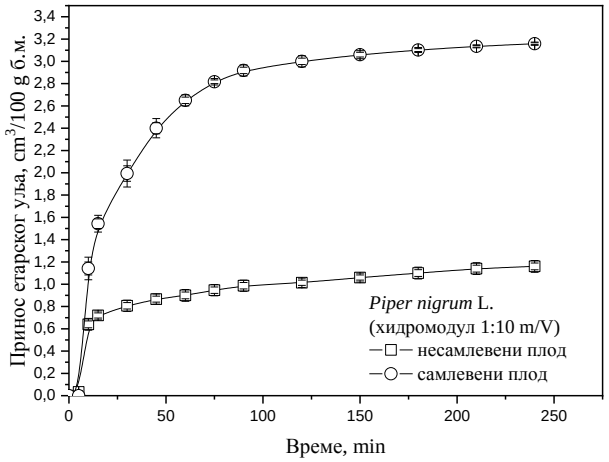
показала да је оптималан однос биљног материјала и воде 1:21 g/cm^3 при температури од 150 °C и трајању од 5,2 сата, при чему је постигнут принос етарског уља од 2,4% (Tran et al., 2019). Техника изолације такође игра значајну улогу у постизању већег приноса. Студија Dinh и сарадника (2020) показала је да је хидродестилација са односом биљног материјала и воде од 1:15 g/cm^3 резултирала највећим приносом етарског уља од 2,19% (Dinh et al., 2020). Wang и сарадници (2009) су упоређивали класичну и микроталасну хидродестилацију црног бибера и утврдили да је оптималан однос биљног материјала и воде 1:10 m/V за микроталасну хидродестилацију, при чему је принос етарског уља био већи у поређењу са класичном методом (3,8% у односу на 3,1%). Ови резултати сугеришу да микроталаси могу побољшати ефикасност хидродестилације етарског уља, вероватно захваљујући бржем загревању и бољем преносу масе између биљног материјала и воде (Wang et al., 2009). Студија Rmili и сарадници (2014) додатно потврђује да хидромодул може утицати на састав етарског уља, посебно код микроталасне хидродестилације. Они су показали да већи хидромодул не мора нужно значајно утицати на хемијски састав код класичне хидродестилације, док код микроталасне различити хидромодули доводе до варијација у саставу етарског уља, па је за ову методу прецизна контрола односа биљног материјала и воде кључна како би се оптимизовао хемијски састав етарског уља (Rmili et al., 2014).

Иако се екстракција суперкритичним угљен-диоксидом (CO_2) сматра ефикасном методом за добијање изолата високог квалитета (Ferreira et al., 1993), важно је нагласити да се овом техником изолује екстракт богат уљима, али не и чистим етарским уљем. Због тога се ова техника не може директно упоредити са хидродестилацијом у погледу приноса етарског уља.

Савремене методе изолације, попут субкритичне водене екстракције, показале су се веома ефикасним за добијање етарског уља црног бибера са очуваним профилом биоактивних компоненти. Према студији Lee и Ko (2021), оптимални услови за изолацију *β*-кариофилена, једне од доминантних компоненти етарског уља постигнути су на температури од 170 °C током 10 минута, док је даље повећање температуре на 200 °C довело до оксидације и смањења приноса етарског уља, што указује на осетљивост ових термолабилних једињења. Ови резултати потврђују да се прецизним избором екстракционих услова може циљано изоловати појединачна жељена компонента етарског уља (Lee and Ko, 2021).

4.5.1.2 Утицај самлевености биљног материјала на принос етарског уља

Анализом приказаних резултата на Слици 4.27 уочава се знатан пораст приноса етарског уља из самлевеног плода црног бибера (средњи пречник честица 0,258 mm) у односу на несамлевени плод. Принос етарског уља након 240 min хидродестилације износи 3,16±0,014 и 1,16±0,053 cm^3/100 g б.м. из самлевенног и несамлевеног плода, редом. Овакави резултати могу се приписати повећаној специфичној површини самлевене сировине, што олакшава продор растварача и ослобађање испарљивих компоненти из биљног материјала (Dao et al., 2020). Насупрот томе, хидродестилација из целог плода одвија се спорије и постиже се нижи принос етарског уља, због ограниченог контакта растварача са унутрашњим структурама зрна. Ови резултати указују на значај адекватне припреме узорка, нарочито уситњавања, за ефикаснију изолацију етарских уља, што је од кључне важности при оптимизацији индустријских и лабораторијских процеса.



Слика 4.27 Зависност приноса етарског уља из несамлевеног и самлевеног плода црног бибера од времена хидродестилације (хидромодул 1:10 m/V)

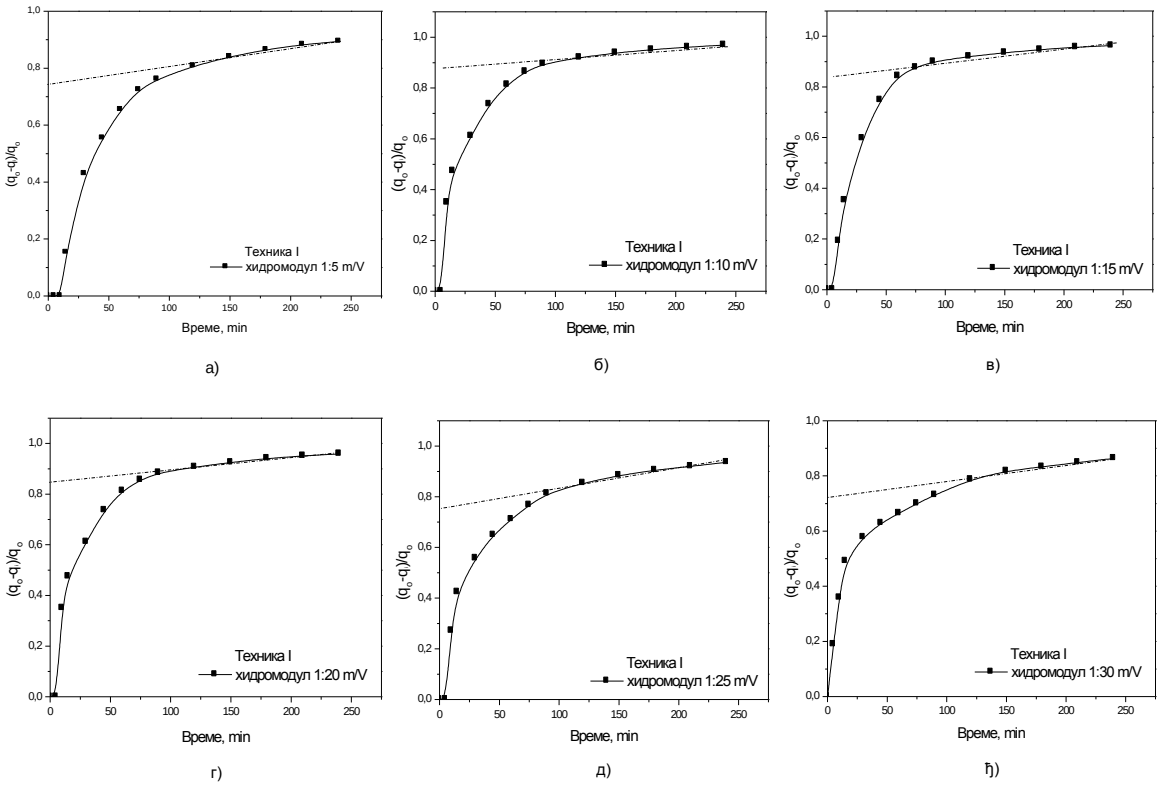
Литературни подаци (Murphy et al., 1999, Rouatbi et al., 2007, Tran et al., 2019) су у складу са резултатима добијеним у овој дисертацији. Студија Rouatbi и сарадника (2007) показује да је принос добијен из млевеног плода црног бибера био знатно већи од оног из целих плодова (Rouatbi et al., 2007). Murthy и сарадници (1999) су такође закључили да млевење црног бибера повећава принос етарског уља, и то са 1% на 3%

када се средња величина честица смањи са 2,1 на 0,14 mm (Murthy et al., 1999). Tran и сарадници (2019) су утврдили да се из самлевеног плода црног бибера добија значајно већи принос, чак до седам пута већи у поређењу са несамлевеним плодом (Tran et al., 2019).

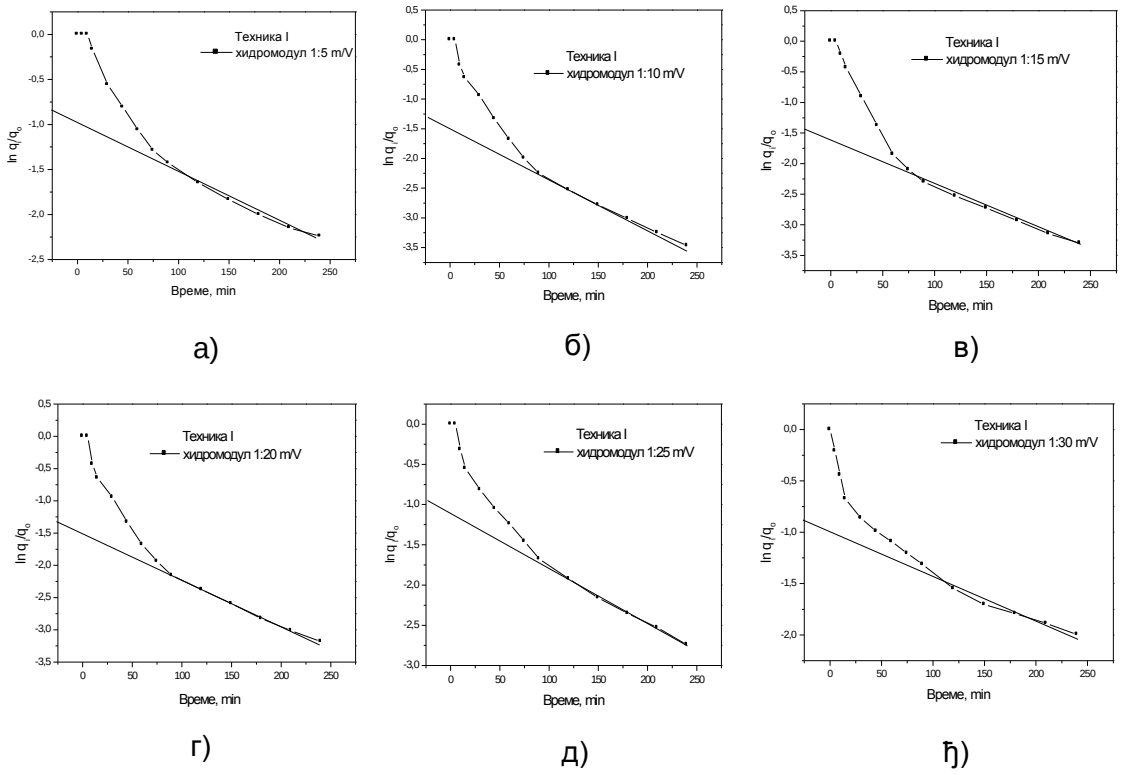
4.5.1.3 Кинетика хидродестилације

Моделовање процеса хидродестилације представља кључни корак у развоју ефикасног индустријског процеса, јер не само да омогућава боље разумевање механизама издвајања активних компоненти, већ и доприноси оптимизацији, контроли и дизајну процеса од лабораторијског до индустријског нивоа. Након што су експерименталним путем одређени оптимални услови хидродестилације (самлевени плод, хидромодул 1:10 m/V) и максималан принос етарског уља из плода црног бибера (q_0, ЕУ = 3,26 cm^3/100 g б.м.), приступило се моделовању кинетике процеса са циљем да се опише динамика ослобађања етарског уља током времена. У ту сврху примењени су математички модели засновани на физичким принципима и експерименталним подацима, модел нестационарне дифузије и емпиријски модел Пономарјева, који омогућавају идентификацију доминантних механизама (испирање и дифузија) и прецизнију квантификацију кинетичких параметара процеса хидродестилације.

Зависност $(q_0-q_i)/q_0$ (Модел А) приноса етарског уља из самлевеног плода црног бибера од времена хидродестилације за све анализиране хидромодуле приказана је на Слици 4.28, док је линеаризована зависност $\ln(q_i/q_0)$ (Модел Б) етарског уља од времена хидродестилације дата на Слици 4.29.



Слика 4.28 Зависност $(q_0-q_i)/q_0$ од времена хидродестилације при различитим хидромодулима



Слика 4.29 Зависност ln q_i/q_o од времена хидродестилације при различитим хидромодулима

Са Слика 4.28 и 4.29 се види да добијене криве кинетике хидродестилације (Ponomarev, 1976) карактеришу два периода хидродестилације (Stanković et al., 1994). Први период карактерише брза хидродестилација, током које долази до испирања етарског уља са површине разорених ћелија. У овом стадијуму, етарско уље се брзо ослобађа са површине биљног материјала који је механички или термички оштећен. У другом периоду процеса одвија се спора молекулска дифузија етарског уља из унутрашњости неразорених ћелија тј. наступа спора фаза хидродестилације, која је контролисана унутрашњим транспортним отпорима и дифузионим механизмом (Stanojević et al., 2014). Највећи принос етарског уља (3,16 cm^3/100 g б.м.) а самим тим и највећи степен хидродестилације етарског уља остварује се након 240 минута при хидромодулу 1:10 m/V и износи 96,93% од максималног садржаја етарског уља (3,26 cm^3/100 g б.м.) у полазном биљном материјалу (Слика 4.26, Табела 4.27, из дела *4.5.1.1 Утицај хиромодула на принос етарског уља*).

У Табели 4.28 приказани су период брзе хидродестилације (ПБХ), степен хидродестилације (СХ) у периоду брзе хидродестилације, као и вредности коефицијената *b* и *k* у једначинама кинетике хидродестилације, добијене применом модела Пономарјева (модел А) и модела нестационарне дифузије (модел Б), за различите хидромодуле при хидродестилацији самлевених плодова бибера техником I у трајању од 240 минута.

Табела 4.28 Период брзе хидродестилације (ПБХ), степен хидродестилације (СХ) у периоду брзе хидродестилације и вредности коефицијенета *b* и *k* у једначинама кинетике хидродестилације (модел А – модел Пономарјева; модел Б – модел нестационарне дифузије) за различите хидромодуле (Техника I, самлевени плод бибера, време хидродестилације: 240 минута)

Техника I	**ПБХ, min**	**СХ, %**	**Модел А**		**Модел Б**	
Хидромодул m/V			***b***	***k*×10³, min⁻¹**	***b***	***k*×10³, min⁻¹**
1:5	120	80,67	0,729	0,72	0,660	3,53
1:10	90	89,57	0,859	0,48	0,788	8,07
1:15	90	92,64	0,833	0,60	0,820	6,73
1:20	90	88,34	0,846	0,50	0,788	6,92
1:25	90	81,29	0,754	0,79	0,659	6,99
1:30	120	78,73	0,719	0,62	0,680	3,59

На основу добијених резултата може се закључити да хидромодул значајно утиче на кинетику процеса класичне хидродестилације плода црног бибера у трајању од 240 минута. Повећање хидромодула, у опсегу од 1:5 m/V до 1:30 m/V, довело је до промена у трајању периода брзе хидродестилације, степену хидродестилације етарског уља, као и вредностима кинетичких параметара одређених применом модела А и Б. Краћи период брзе хидродестилације (ПБХ) постигнут је код хидромодула 1:10 m/V, 1:15 m/V, 1:20 m/V и 1:25 m/V, где је ПБХ износио 90 минута, у поређењу са периодом од 120 минута код хидромодула 1:5 m/V и 1:30 m/V.

Што се тиче степена хидродестилације (СХ) у периоду брзе дестилације, највише вредности постигнуте су при хидромодулу 1:15 m/V (92,64%) и 1:10 m/V (89,57%), док су при осталим хидромодулима, посебно 1:5 m/V и 1:30 m/V, постигнути знатно нижи степени хидродестилације (80,67% и 78,73%, редом).

Анализом вредности кинетичких коефицијената у Моделу А уочава се да је вредност коефицијента *b* за хидромодул 1:10 m/V (0,859) највећа, док је вредност

коефицијента *k* за исти хидромодул најнижа међу свим анализираним хидромодулима. У оквиру Модела Б, повишене вредности коефицијента *b* забележене су при хидромодулима 1:10 m/V, 1:15 m/V и 1:20 m/V, док је највећа вредност коефицијента *k* такође добијена при хидромодулу 1:10 m/V. То указује да се у опсегу хидромодула 1:10–1:20 m/V хидродестилација одвијала интензивније него при нижим и вишим вредностима хидромодула, што потврђује значај односа биљни материјал/вода за ток и ефикасност процеса. Код хидродестилације при хидромодулима 1:5 m/V, 1:25 m/V и 1:30 m/V, вредности коефицијената *b* су ниже од преостала три хидромодула, а сличан тренд се уочава и код коефицијента *k*, што указује на нешто спорију кинетику процеса и ограниченији масени пренос. Иако су хидромодули 1:15 m/V и 1:20 m/V такође показали добре резултате у погледу степена хидродестилације и релативно кратког трајања периода брзе хидродестилације, анализа свих параметара у целини показује да је хидромодул 1:10 m/V најповољнији избор за хидродестилацију етарског уља из плода црног бибера. Овај однос воде и биљног материјала обезбеђује најбржи процес ослобађања етарског уља, висок укупан принос етарског уља, рационалну потрошњу воде и енергије, као и технолошку погодност за евентуалну индустријску примену. Стога је хидромодул 1:10 m/V изабран као оптимални за процес класичне хидродестилације етарског уља из плода црног бибера.

4.5.1.4 Одвајање фракција етарског уља за одређена времена хидродестилације

Имајући у виду да се хемијски састав етарског уља може значајно мењати током процеса хидродестилације, нарочито у зависности од времена издвајања, циљ овог дела истраживања био је да се проучи утицај временског фракционисања на квалитет и потенцијалну антиоксидативну ефикасност етарског уља. У ту сврху, етарско уље је прикупљано у пет сукцесивних временских фракција током хидродестилације (I: 0–15 min, II: 15–30 min, III: 30–60 min, IV: 60–90 min и V: 90–120 min), како би се идентификовале промене у семи-квантитативно-квалитативном хемијском саставу фракција и потенцијално утврдио временски интервал најповољнији за добијање етарског уља са побољшаном антиоксидативном активношћу.

Расподела приноса етарског уља црног бибера по фракцијама током различитих временских интервала хидродестилације приказана је у Табели 4.29.

Табела 4.29 Принос етарског уља црног бибера у зависности од временског интервала током хидродестилације

Фракција	Временски интервал (min)	Принос (cm^3/ 100 g б.м.)
I	0–15	1,54
II	15–30	0,45
III	30–60	0,66
IV	60–90	0,27
V	90–120	0,08

Подаци из литературе бележе сличне експерименте са различитим резултатима када је реч о утицају времена хидродестилације на хемијски састав и биоактивност етарских уља (Miguel et al., 2011; Sintim et al., 2015). Оваква истраживања спроведена на врстама као што су жалфија (*Salvia officinalis* L.) (Miguel et al., 2011) и мирођија (*Anethum graveolens* L.) (Sintim et al., 2015), док овакав приступ у анализи фракција током хидродестилације црног бибера до сада није забележен у литератури.

Принос етарског уља по временским фракцијама током хидродестилације указује да је највећи део етарског уља изолован у почетним интервалима (фракције I и II), што сугерише да се лако испарљиве компоненте, попут монотерпенских угљоводоника, брзо ослобађају током раних фаза дестилације. Насупрот томе, касније фракције (IV и V) обухватају мањи удео укупног приноса, али се претпоставља да су обогаћене стабилнијим, мање испарљивим једињењима, попут сесквитерпена и кисеоничних деривата. Ова временска расподела има практичан значај јер омогућава селективно прикупљање фракција са потенцијално различитим хемијским и биолошким профилима.

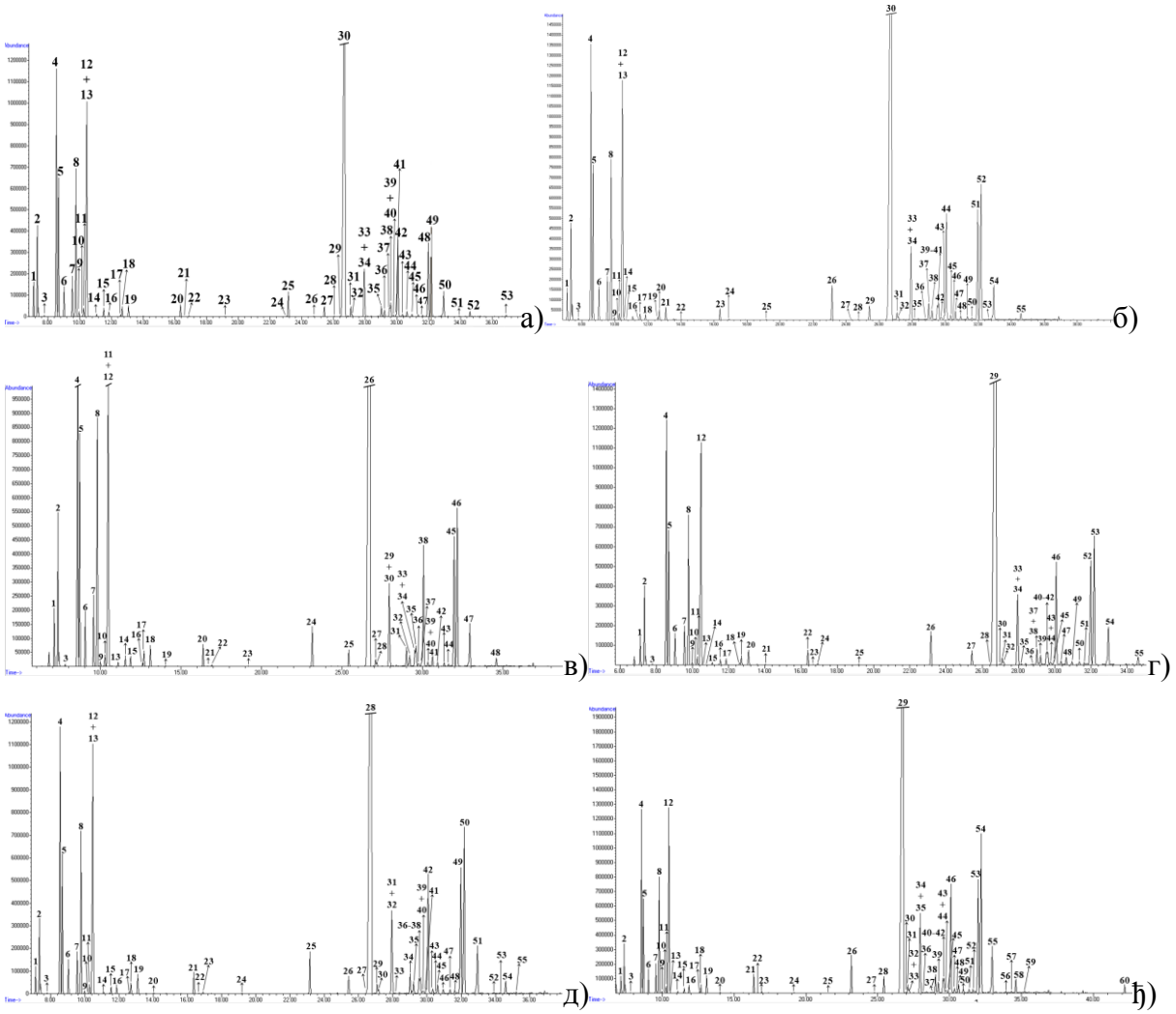
4.5.1.5 Хемијски састав етарских уља и хидролата изолованих техником хидродестилације I

4.5.1.5.1 GC/MS и GC/FID анализа етарских уља

4.5.1.5.1.1 Утицај хидромодула на састав етарског уља

На основу резултата приказаних на **Слици 4.30** и у **Табели 4.30** може се уочити да се хемијски састав етарског уља црног бибера мења у зависности од примењеног хидромодула, како у квалитативном тако и у семи-квантитативном погледу. Укупно је

идентификовано између 53 и 59 компоненти, што представља 99–99,5% укупног садржаја етарског уља.



Слика 4.30 TIC хроматограми етарског уља плода црног бибера при различитим хидромодулима (1:5-1:30 m/V)

Табела 4.30 Хемијски састав етарског уља плода црног бибера при различитим хидромодулима (1:5 m/V-1:30 m/V)

Бр.	$t_{ret.}$, min	**Једињење**	Молекулска формула	RI^{exp}	RI^{lit}	Метод идентификације	*c*, %					
							1:5 m/V	1:10 m/V	1:15 m/V	1:20 m/V	1:25 m/V	1:30 m/V
1.	7,10	*α*-тујен [МУ]	$C_{10}H_{16}$	927	924	RI, MS	1,1	0,7	1,1	0,8	0,7	0,5
2.	7,33	*α*-пинен [МУ]	$C_{10}H_{16}$	935	932	RI, MS, Co-I	3,2	2,4	3,2	2,3	2,0	1,4
3.	7,78	камфен [МУ]	$C_{10}H_{16}$	950	946	RI, MS, Co-I	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr
4.	**8,55**	сабинен [МУ]	**$C_{10}H_{16}$**	**975**	**969**	**RI, MS**	**11,1**	**8,6**	**11,7**	**9,1**	**8,3**	**6,2**

Наставак Табеле 4.30

5.	8,67	*β*-пинен МУ	$C_{10}H_{16}$	979	974	RI, MS, Co-I	5,5	4,4	5,6	4,4	4,0	2,9
6.	9,02	мирцен МУ	$C_{10}H_{16}$	991	988	RI, MS	1,3	1,0	1,4	1,1	1,0	0,8
7.	9,54	*α*-феландрен МУ	$C_{10}H_{16}$	1006	1002	RI, MS	1,4	1,1	1,5	1,2	1,1	0,8
8.	9,77	*δ*-3-карен МУ	$C_{10}H_{16}$	1013	1008	RI, MS	6,3	4,9	6,4	5,3	4,9	3,9
9.	9,97	*α*-терпинен МУ	$C_{10}H_{16}$	1018	1014	RI, MS	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10.	10,16	*p*-цимен МУ	$C_{10}H_{14}$	1023	1020	RI, MS	tr	0,2	-	tr	tr	tr
11.	10,25	*o*-цимен МУ	$C_{10}H_{14}$	1025	1022	RI, MS	0,4	tr	0,3	0,3	0,3	0,2
12.	**10,45**	лимонен* МУ	**$C_{10}H_{16}$**	**1030**	**1024**	**RI, MS, Co-I**	**12,4**	**9,7**	**12,6**	**10,8**	**10,3**	**8,4**
13.	10,46	*β*-феландрен* МУ	$C_{10}H_{16}$	1031	1025	RI, MS		-	-	-		-
14.	10,54	1,8-цинеол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1033	1026	RI, MS, Co-I	-	tr	-	tr	-	tr
15.	10,69	(*Z*)-*β*-оцимен МУ	$C_{10}H_{16}$	1037	1032	RI, MS	-	tr	-	tr	-	-
16.	11,07	(*E*)-*β*-оцимен МУ	$C_{10}H_{16}$	1047	1044	RI, MS	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1
17.	11,52	*γ*-терпинен МУ	$C_{10}H_{16}$	1059	1054	RI, MS, Co-I	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
18.	11,84	*cis*-сабинен хидрат ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1067	1065	RI, MS	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
19.	12,59	*p*-мента-2,4(8)-диен МУ	$C_{10}H_{16}$	1087	1085	RI, MS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20.	12,68	терпинолен МУ	$C_{10}H_{16}$	1089	1086	RI, MS	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
21.	13,08	линалол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1100	1095	RI, MS, Co-I	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7
22.	14,02	дехидро-сабина кетон ОМ	$C_9H_{12}O$	1123	1117	RI, MS	-	tr	tr	tr	tr	tr
23.	16,35	терпинен-4-ол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1178	1174	RI, MS	0,5	0,4	0,6	0,5	0,7	0,7
24.	16,64	*p*-цимен-8-ол ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1185	1179	RI, MS	tr	-	tr	tr	tr	tr
25.	16,90	*α*-терпинеол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1191	1186	RI, MS, Co-I	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,1
26.	19,15	карвон ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1245	1239	RI, MS	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27.	21,58	карвакрол ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1302	1298	RI, MS	-	-	-	-	-	tr
28.	23,04	*cis*-пиперитол ацетат ОМ	$C_{12}H_{20}O_2$	1337	1332	RI, MS	tr	-	-	-	-	-
29.	23,15	*δ*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1340	1335	RI, MS	1,1	1,2	1,0	1,2	1,2	1,3
30.	24,33	лонгициклен СУ	$C_{15}H_{24}$	1369	1371	RI, MS	-	tr	-	-	-	-
31.	24,75	*α*-копаен СУ	$C_{15}H_{24}$	1379	1374	RI, MS	tr	tr	-	-	-	tr
32.	25,41	*β*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1394	1389	RI, MS	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7
33.	26,04	*β*-фунебрен СУ	$C_{15}H_{24}$	1410	1413	RI, MS	tr	-	-	-	-	-

Наставак Табеле 4.30

34.	26,43	*α-cis*-бергамотен СУ	$C_{15}H_{24}$	1420	1411	RI, MS	tr	-	-	-	-	-
35.	26,46	*α*-цедрен СУ	$C_{15}H_{24}$	1420	1410	RI, MS	-	-	-	tr	tr	-
36.	**26,70**	(*E*)-кариофилен СУ	**$C_{15}H_{24}$**	**1427**	**1417**	**RI, MS**	**35,5**	**41,6**	**34,6**	**40,2**	**41,1**	**44,6**
37.	26,95	*β*-копаен СУ	$C_{15}H_{24}$	1433		RI, MS	-	-	-	**tr**	-	**tr**
38.	27,08	*γ*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1436	1434	RI, MS	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
39.	27,17	*α-trans*-бергамотен СУ	$C_{15}H_{24}$	1438	1432	RI, MS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
40.	27,18	(*Z*)-*β*-фарнезен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1439	1440	RI, MS	-	-	-	-	-	
41.	27,93	*α*-хумулен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1457	1452	RI, MS	2,4	2,9	2,4	2,8	2,8	3,1
42.	27,96	(*E*)-*β*-фарнезен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1458	1454	RI, MS		-				
43.	28,15	*β*-сантален СУ	$C_{15}H_{24}$	1463	1457	RI, MS	-	tr	-	tr	tr	tr
44.	28,80	*γ*-муролен СУ	$C_{15}H_{24}$	1479	1478	RI, MS	-	-	-	-	-	tr
45.	28,81	*β*-чамигрен СУ	$C_{15}H_{24}$	1479	1476	RI, MS	-	-	-	tr	-	-
46.	28,80	*trans*-кадина-1(6),4-диен СУ	$C_{15}H_{24}$	1479	1475	RI, MS	-	tr	-	-	-	-
47.	29,00	гермакрен D СУ	$C_{15}H_{24}$	1484	1484	RI, MS	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7
48.	29,01	ar-куркумен* СУ	$C_{15}H_{22}$	1485	1479	RI, MS	-	-	-		-	-
49.	29,20	*β*-селинен СУ	$C_{15}H_{24}$	1489	1489	RI, MS	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
50.	29,53	*α*-зингиберен СУ	$C_{15}H_{24}$	1497	1493	RI, MS	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6
51.	29,55	*α*-селинен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1498	1498	RI, MS	-	-	tr	tr	tr	tr
52.	29,60	курзерен ОС	$C_{15}H_{20}O$	1499	1499	RI, MS	0,6	0,7	0,5	0,4	0,5	0,5
53.	29,74	*α*-муролен СУ	$C_{15}H_{24}$	1503	1500	RI, MS	tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,2
54.	29,79	(*Z*)-*α*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1504	1506	RI, MS	tr	-	-	tr	tr	tr
55.	29,94	гермакрен A СУ	$C_{15}H_{24}$	1508	1508	RI, MS	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
56.	30,06	*β*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1511	1505	RI, MS	3,2	3,5	2,9	3,4	3,5	3,9
57.	30,33	*δ*-аморфен СУ	$C_{15}H_{24}$	1519	1511	RI, MS	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
58.	30,33	(*Z*)-*γ*-бисаболен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1519	1514	RI, MS	-	-		-	-	-
59.	30,51	миристицин ФП	$C_{11}H_{12}O_3$	1523	1517	RI, MS	-	tr	-	-	tr	tr

Наставак Табеле 4.30

60.	30,62	*δ*-кадинен СУ	$C_{15}H_{24}$	1526	1522	RI, MS	0,2	-	-	0,3	0,3	0,3
61.	30,62	(*E*)-изо-*γ*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1526	1528	RI, MS	-	0,3	0,3	-	-	0,2
62.	30,94	(*E*)-*γ*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1534	1529	RI, MS	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	-
63.	31,34	(*E*)-*α*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1545	1540[a]	RI, MS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
64.	31,61	елемол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1552	1548	RI, MS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
65.	31,96	гермакрен B СУ	$C_{15}H_{24}$	1561	1559	RI, MS	3,1	4,1	3,4	3,9	4,1	4,7
66.	32,15	(*E*)-неролидол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1566	1561	RI, MS	3,7	4,8	4,0	4,6	5,2	6,4
67.	32,62	химачален епоксид ОС	$C_{15}H_{22}O$	1579	1578	RI, MS	-	tr	-	-	-	-
68.	32,94	кариофилен оксид ОС	$C_{15}H_{24}O$	1587	1582	RI, MS	1,2	1,4	1,2	1,5	1,6	1,9
69.	33,90	хумулен епоксид II ОС	$C_{15}H_{24}O$	1613	1608	RI, MS	tr	-	-	-	tr	0,1
70.	34,30	*γ*-еудесмол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1624	1630	RI, MS	-	-	-	-	tr	0,1
71.	34,59	мурола-4,10(14)-диен-1-*β*-ол ОС	$C_{15}H_{24}O$	1632	1630	RI, MS	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5
72.	35,21	*α*-муролол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1650	1644	RI, MS	tr	-	-	-	0,1	0,1
73.	42,18	(2*E*,6*E*)-фарнезил ацетат ОС	$C_{17}H_{28}O_2$	1851	1845	RI, MS	-	-	-	-	-	0,3
						Укупно идентификовано	99,2	99,0	99,1	99,4	99,4	99,6
Подела по групама (%)												
Монотерпенски угљоводоници (МУ)							44,0	33,9	44,4	36,2	33,5	25,9
Оксигеновани монотерпени (ОМ)							1,3	1,1	1,6	1,5	1,8	1,8
Сесквитерпенски угљоводоници (СУ)							48,0	56,5	47,0	54,8	56,2	61,6
Оксигеновани сесквитерпени (ОС)							5,9	7,5	6,1	6,9	7,9	10,3
Фенилпропаноиди (ФП)							-	tr	-	-	tr	tr

$t_{ret.}$: ретенционо време; RI^{lit} – ретенциони индекси доступни у литератури (Adams, 2007, [a]Babushok et al., 2011)); RI^{exp} – ретенциони индекси одређени експериментално помоћу хомологе серије *n*-алкана (C_8–C_{20}) на HP-5MS колони; MS – компоненте идентификоване поређењем масених спектара; RI – компоненте идентификоване поређењем ретенционих индекса; Co-I – компоненте идентификоване ко-инјектирањем идентичног стандарда; tr – компонента присутна у траговима (<0,05%); * - једињења означена звездицом елуирала су у блиском ретенционом интервалу, уз могућност делимичног преклапања пикова.

У свим анализираним узорцима идентификован је висок проценат једињења (99,0–99,6%), што указује на добру карактеризацију анализираних етарских уља. Највећи удео у свим етарским уљима имају сесквитерпенски угљоводоници (47,0-61,6%), док је удео монотерпенских угљоводоника нешто мањи (25,9-44,4%), а оксигенованих деривата оба типа једињења знатно нижи (1,1-1,8% - оксигеновани монотерпени; 5,9-10,0% - оксигеновани сесквитерпени). Без обзира на примењени

хидромодул, доминантна компонента у свим узорцима био је (*E*)-кариофилен, чији се садржај кретао од 34,6% до 44,6%, при чему је највећи удео забележен при хидромодулу 1:30 m/V. Поред њега, међу најзаступљенијим компонентама били су лимонен (8,4–12,6%), сабинен (6,2–11,7%), *δ*-3-карен (3,9–6,4%), *β*-пинен (2,9–5,6%), *α*-хумулен (2,4–3,1%), *β*-бисаболен (2,9–3,9%), гермакрен B (3,1–4,7%) и (*E*)-неролидол (3,7–6,4%).

Са повећањем количине растварача (већи хидромодул) уочава се благо смањење удела монотерпенских угљоводоника и релативни пораст сесквитерпена, што указује на селективнију екстракцију тежих, мање поларних компонената. Може се закључити да хидромодул, односно однос биљног материјала и растварача, утиче на равнотежу између испарљивих и мање испарљивих компонената у етарском уљу црног бибера, што је у складу са резултатима других аутора за ову врсту биљног материјала (Dinh et al., 2020; Wang et al., 2009). Такође се може сматрати да избор хидромодула представља важан фактор у усмеравању хемијског састава етарског уља, у зависности од жељеног састава и потенцијалне намене добијеног производа.

Сличан тренд описали су Dinh и сарадници (2020), који су показали да повећање хидромодула са 1:10 m/V на 1:20 m/V доводи до смањења удела лакше испарљивих монотерпена (*α*-пинен, сабинен, D-лимонен) и повећања удела сесквитерпена као што су (*E*)-кариофилен и *α*-хумулен (Dinh et al., 2020). Резултате који потврђују сличне промене са променом хидромодула добили су и Wang и сарадници (2009), који су при хидромоодулу 1:10 m/V у класичној хидродестилацији идентификовали 3-карен (31,9%), лимонен (19,3%) и (*E*)-кариофилен (18,4%) као доминантне компоненте, док се микроталасном дестилацијом при истом односу добија етарско уље са повећаним уделом тежих сесквитерпена ((*E*)-кариофилен 20,2% и *α*-хумулен 9,6%) (Wang et al., 2009).

Посматрано у целини, резултати у овој дисертацији се слажу са подацима других истраживача и потврђују да повећање хидромодула узрокује смањење удела монотерпенских, а повећање удела сесквитерпенских угљоводоника у етарском уљу црног бибера. Овај ефекат може се објаснити променом фазне равнотеже паре и течности**:** при већој запремини воде смањује се парцијални притисак лакших компонената и успорава њихово испаравање, док тежа једињења са нижим коефицијентом испарљивости постају релативно заступљенија. Према томе, избор хидромодула представља важан параметар за контролу селективности дестилације,

односно за прилагођавање арома профила и биолошке активности добијеног етарског уља.

4.5.1.5.1.2 Хемијски састав фракција етарског уља

GC/MS и GC/FID анализом издвојених фракција етарског уља је идентификовано 33–36 компоненти (фракција I: 33 компоненти, фракција II: 35 компоненти, фракција III: 33 компоненти, фракција IV: 36 компоненти и фракција V: 35 компоненти), што представља 100,0%, 100,0%, 99,8%, 99,7% и 99,8% укупног састава појединачних фракција етарског уља црног бибера, редом. Највећи број једињења (36) идентификован је у четвртој фракцији, док је најмањи број идентификован у првој (33). Једињења су наведена према редоследу елуирања са HP-5MS колоне. Сва идентификована једињења и њихов садржај (изражен у %) су приказани у Табели 4.31, хроматограми (TIC) су приказани на Слици 4.31 (а–ђ), док Слика 4.32 приказује преклопљене хроматограме (упоредни приказ) приказане на претходној слици.

Табела 4.31 Хемијски састав фракција етарског уља плода црног бибера издвојених током пет временских периода хидродестилације (Milenković et al., 2024)

Бр.	$t_{ret.}$, min	Једињење	RI^{exp}	RI^{lit}	Метод идентификације	Садржај (%)				
						15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
1.	6,61	*α*-тујен	915	924	RI, MS	2,1	1,7	1,5	1,4	1,3
2.	6,83	*α*-пинен	922	932	RI, MS	6,3	4,9	4,2	3,8	3,6
3.	7,28	камфен	936	946	RI, MS, Co-I	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4.	**8,07**	**сабинен**	**959**	**969**	**RI, MS**	**17,0**	**13,5**	**10,8**	**8,8**	**7,5**
5.	8,19	*β*-пинен	964	974	RI, MS, Co-I	10,9	8,0	6,5	5,5	4,8
6.	8,56	мирцен	978	988	RI, MS	1,8	1,3	1,1	1,0	0,9
7.	9,09	*α*-феландрен	993	1002	RI, MS	1,4	1,2	1,0	0,9	0,9
8.	9,27	*δ*-3-карен	999	1008	RI, MS	7,4	6,3	5,5	5,1	4,8
9.	9,52	*α*-терпинен	1006	1014	RI, MS	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
10	9,87	о-цимен	1015	1022	RI, MS	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
11	**10,01**	**лимонен**	**1019**	**1024**	**RI, MS, Co-I**	**16,5**	**13,3**	**11,2**	**9,6**	**8,5**

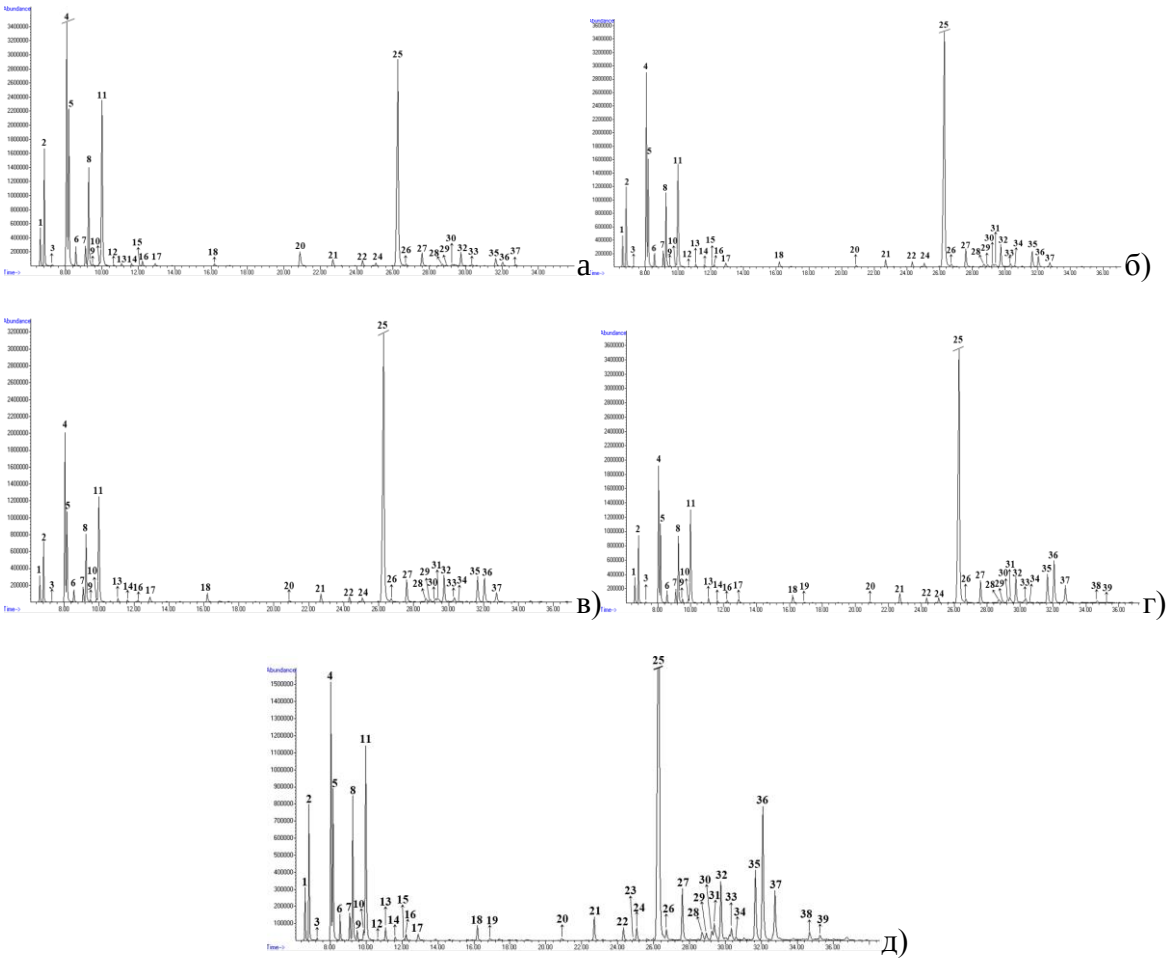
Наставак Табеле 4.31

12	10,64	(*Z*)-*β*-оцимен	1036	1032	RI, MS	0,1	0,1	-	-	-
13	11,09	*γ*-терпинен	1047	1054	RI, MS, Co-I	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5
14	11,63	*cis*-сабинен хидрат	1062	1065	RI, MS	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
15	12,12	*p*-мента-2,4(8)-диен	1075	1085	RI, MS	0,1	0,1	-	-	-
16	12,22	терпинолен	1077	1086	RI, MS	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
17	12,93	линалол	1096	1095	RI, MS, Co-I	0,4	0,6	0,7	0,6	0,4
18	16,20	терпинен-4-ол	1175	1174	RI, MS	0,3	0,6	0,9	0,9	0,8
19	16,89	*α*-терпинеол	1192	1186	RI, MS, Co-I	-	-	-	0,2	0,1
20	20,88	(*E*)-анетол	1286	1282	RI, MS	1,9	0,2	0,2	0,2	-
21	22,69	*δ*-елемен	1329	1335	RI, MS	0,7	0,8	0,9	1,1	1,2
22	24,32	*α*-копаен	1368	1374	RI, MS	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
23	24,89	*β*-кубебен	1382	1387	RI, MS	-	-	-	-	-
24	25,06	*β*-елемен	1386	1389	RI, MS	0,3	0,5	0,5	0,6	0,7
25	**26,27**	**(*E*)-кариофилен**	**1416**	**1417**	**RI, MS**	**24,9**	**33,3**	**36,1**	**36,5**	**36,6**
26	26,71	*γ*-елемен	1427	1434	RI, MS	0,3	0,4	0,5	0,6	0,6
27	27,60	*α*-хумулен	1449	1452	RI, MS	1,5	2,3	2,6	2,7	2,7
28	28,68	*γ*-муролен	1476	1478	RI, MS	0,3	0,5	0,5	0,6	0,6
29	28,94	*γ*-химачален	1483	1481	RI, MS	0,1	0,3	0,3	0,4	0,4
30	29,21	*α*-зингиберен	1490	1493	RI, MS	0,1	0,4	0,4	0,4	0,5
31	29,37	курзерен	1494	1499	RI, MS	-	0,5	0,7	0,9	1,1
32	29,74	*β*-бисаболен	1503	1505	RI, MS	1,4	2,4	2,9	3,0	3,1
33	30,35	*γ*-кадинен	1519	1513	RI, MS	0,3	0,5	0,7	0,7	0,7
34	30,58	(*E*)-*γ*-бисаболен	1525	1529	RI, MS	-	0,1	0,2	0,2	0,2
35	31,66	гермацен B	1553	1559	RI, MS	1,0	2,3	3,3	4,0	4,4
36	**32,04**	(*E*)-неролидол	**1563**	**1561**	**RI, MS**	**0,5**	**1,4**	**3,0**	**5,1**	**7,3**
37	32,72	кариофилен оксид	1582	1582	RI, MS	0,2	0,7	1,5	2,2	2,9
38	34,67	гуаиа-6,10(14)-диен-4-*β*-ол	1634	1631	RI, MS	-	-	-	0,3	0,5
39	35,28	*α*-муролол	1651	1644	RI, MS	-	-	-	0,2	0,3

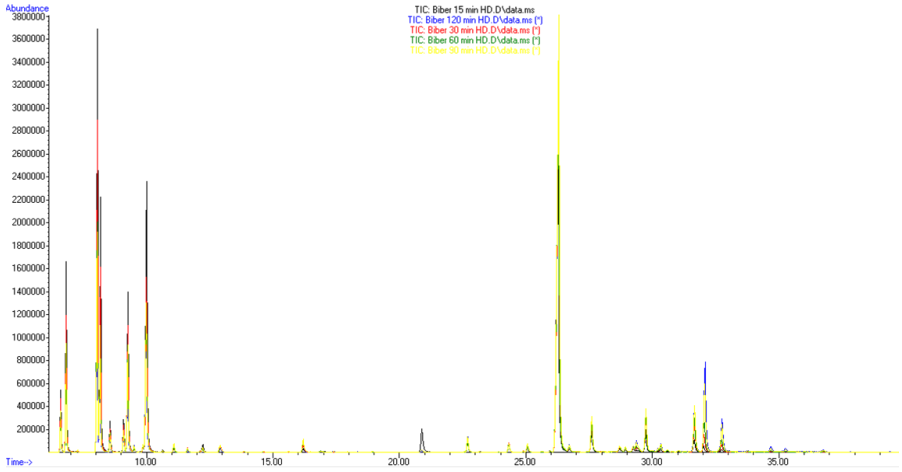
Наставак Табеле 4.31

Укупно идентификовано (%)	100,0	100,0	99,8	99,7	99,8
Подела по групама (%)					
Монотерпенски угљоводоници (1-13, 15, 16)	65,0	51,6	43,0	37,5	33,9
Оксигеновани монотерпени (14, 17-19)	0,9	1,5	1,9	1,9	1,5
Сесквитерпенски угљоводоници (21-30, 32-35)	31,5	44,4	49,5	51,4	52,3
Оксигеновани сесквитерпени (31, 36-39)	0,7	2,6	5,2	8,7	12,1
Фенилпропаноиди (20)	1,9	0,2	0,2	0,2	-

$t_{ret.}$: ретенционо време; RI^{lit} – ретенциони индекси доступни у литератури (Adams, 2007); RI^{exp} – ретенциони индекси одређени експериментално помоћу хомологе серије *n*-алкана (C_8–C_{20}) на HP-5MS колони; MS – компоненте идентификоване поређењем масених спектара; RI – компоненте идентификоване поређењем ретенционих индекса; Co-I – компоненте идентификоване ко-инјектирањем идентичног стандарда; tr – компонента присутна у траговима (<0,05%).



Слика 4.31 TIC хроматограми фракција етарског уља црног бибера током пет временских периода хидродестилације (I: 0–15 min, II: 15–30 min, III: 30–60 min, IV: 60–90 min и V: 90–120 min)



Слика 4.32 Упоредни приказ TIC хроматограма фракција етарског уља црног бибера за пет временских интервала хидродестилације

Број и садржај компоненти етарског уља плода црног бибера су варирали у зависности од трајања хидродестилације. Све идентификоване компоненте у фракцијама етарског уља сврстане су у следеће групе: монотерпенски угљоводоници, сесквитерпенски угљоводоници, ароматична једињења, оксигеновани монотерпени и оксигеновани сесквитерпени. Најзаступљеније компоненте у фракцијама етарског уља биле су (*E*)-кариофилен, лимонен, сабинен и (*E*)-неролидол.

Садржај монотерпенских угљоводоника (I–V: 65,0–33,9%) и фенилпропаноида (I–V: 1,9–0,2%) је опадао са продуженим временом хидродестилације, док се садржај оксигенованих монотерпена (I–V: 0,9–1,9%), сесквитерпенских угљоводоника (I–V: 31,5–52,3%) и оксигенованих сесквитерпена (I–V: 0,7–12,1%) повећавао током процеса.

(*E*)-Кариофилен, који припада групи сесквитерпена и представља најзаступљенију компоненту у свим фракцијама, је показивао пораст садржаја са продуженим временом хидродестилације (I–V: 24,9–36,6%). Садржај (*E*)-неролидола (I–V: 0,5–7,3%) у фракцијама етарског уља такође се повећавао, док су се садржаји сабинена (I–V: 17,0–7,5%) и лимонена (I–V: 16,5–8,5%) смањивали са трајањем хидродестилације. Утврђено је да су се једињења етарског уља са нижом молекулском масом појављивала у ранијим фазама хидродестилације, при чему је њихов садржај био висок на почетку процеса, али се постепено смањивао у каснијим интервалима. Насупрот томе, једињења са већом молекулском масом су се издвајала у каснијим фазама, при чему је њихов садржај био нижи на почетку, али је постепено растао са временом хидродестилације. Друга значајна једињења идентификована у фракцијама

етарског уља у овом истраживању била су *β*-пинен, *δ*-3-карен, *α*-пинен, гермакрен B, *β*-бисаболен и кариофилен оксид.

У литератури до сада нису објављене студије које се баве саставом фракција етарског уља црног бибера, па самим тим није било могуће директно поређење добијених резултата. Због недостатка истраживања на ову тему, ово истраживање има посебан научни значај, јер омогућава праћење промене хемијског састава током времена хидродестилације, као и потенцијал за одређивање фракције најбољег квалитета (Milenković et al., 2024). Слична истраживања спроведена на другим биљним врстама су показала да време хидродестилације може значајно утицати на хемијски састав етарских уља, али и на њихове биолошке активности (Miguel et al., 2011, Zheljazkov et al., 2014).

Хемијски састав етарског уља бибера варира у зависности од више фактора попут географског порекла, времена дестилације, температуре, као и примењене методе изолације. Током процеса хидродестилације може доћи и до убрзане хидролизе естара, као и до појава као што су изомеризација, рацемизација, оксидација и друге сличне реакције које доводе до измена у хемијском саставу добијеног етарског уља (Turek and Stintzing, 2013, Tran et al., 2019, Ciesla et al., 2016, Cannon et al., 2013).

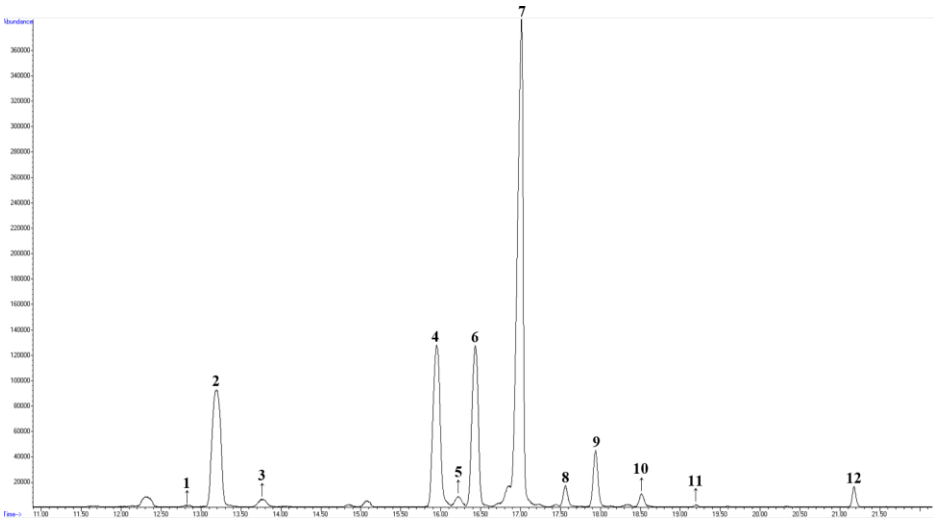
Истраживање које су спровели Wang и сарадници показало је да најмање два етарска уља црног бибера из четири главне земље произвођача (Индије, Бразила, Шри Ланке и Кине) садрже *β*-кариофилен. Бразилски узорци имали су релативно висок садржај *β*-кариофилена, док су кинески и малезијски узорци били богати 3-кареном, али са мањим садржајем сабинена у односу на остале земље. На основу прикупљених података, није уочен јасан образац у хемијском саставу етарског уља из различитих региона (Wang et al., 2019).

Уопштено посматрано, хемијски састав фракција етарског уља црног бибера добијен у овој дисертацији био је сличан резултатима које су објавили Sruthi и сар. и Kapoor и сар. (Kapoor et al., 2009, Sruthi et al., 2013). Слично томе, плод бибера из Бангладеша садржао је етарско уље чије су главне компоненте: *β*-кариофилен (18,39%), *α*-пинен (16,68%), лимонен (16,16%), *β*-пинен (13,61%), *δ*-3-карен (9,23%), *β*-феландрен (3,16%) и копаен (3,13%) (Aziz et al., 2012). Врло сличан састав добијен је и у претходном истраживању које је део ове дисертације, где је коришћен плод црног бибера са српског тржишта. Главне компоненте етарског уља биле су: (*E*)-кариофилен (41,6%), лимонен (9,7%), сабинен (8,6%) и (*E*)-неролидол (4,8%) (Milenković et al., 2022). Претходне студије су потврдиле да ова једињења поседују антиоксидативна и

антимикробна својства, због чега се етарска уља црног бибера све чешће сматрају природном алтернативом синтетичким конзервансима и користе се у формулацијама безбеднијих производа са позитивним ефектом на здравље потрошача (Wang et al., 2021, Johari and Khan., 2022).

4.5.1.5.2 HS-SPME анализа испарљивих једињења у хидролату добијеном техником хидродестилације I

Резултати идентификације испарљивих једињења у хидролату из технике and приказани су у Табели 4.32, док је одговарајући GC/MS хроматограм представљен на Слици 4.33. На основу ретенционих времена (RT) и масених спектара, детектована су и идентификована испарљива једињења присутна у анализираном хидролату. Структурне формуле најзаступљенијих једињења у хидролату технике I дате су на Слици 4.34.

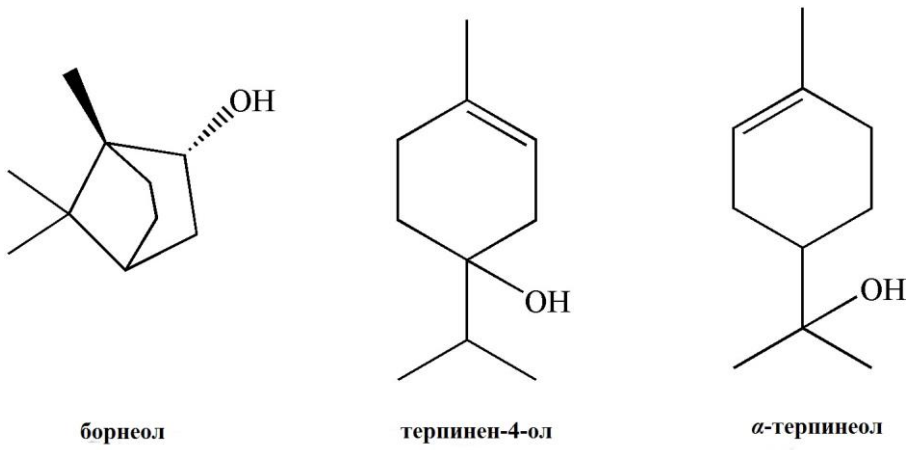


Слика 4.33 TIC хроматограм хидролата плода црног бибера (Техника I)

Табела 4.32 Хемијски састав испарљивих једињења присутних у хидролату плода црног бибера (Техника I)

Бр.	$t_{ret.}$, min	Једињење	Молекулска формула	RI^{exp}	RI^{lit}	Метод идентификације	Садржај,%
1.	12,82	*p*-цименен	$C_{10}H_{12}$	1093	1089	RI, MS	tr
2.	13,17	линалол	$C_{10}H_{18}O$	1102	1095	RI, MS	16,3
3.	13,75	фенилетил-алкохол	$C_8H_{10}O$	1106	1116	RI, MS	2,4
4.	**15,94**	**борнеол**	**$C_{10}H_{18}O$**	**1169**	**1165**	**RI, MS**	**17,3**
5.	16,22	сантолинил-ацетат	$C_{12}H_{20}O_2$	1175	1171	RI, MS	1,8
6.	**16,45**	**терпинен-4-ол**	**$C_{10}H_{18}O$**	**1181**	**1174**	**RI, MS**	**13,9**
7.	**17,01**	***α*-терпинеол**	**$C_{10}H_{18}O$**	**1194**	**1186**	**RI, MS**	**34,7**
8.	17,56	*trans*-дихидрокарвон	$C_{10}H_{16}O$	1208	1200	RI, MS	2,6
9.	17,95	линалол-формијат	$C_{11}H_{18}O_2$	1217	1214	RI, MS	4,5
10.	18,52	неоизо-дихидрокарвеол	$C_{10}H_{18}O$	1230	1226	RI, MS	2,1
11.	19,21	карвон	$C_{10}H_{14}O$	1246	1239	RI, MS	tr
12.	21,17	тимол	$C_{10}H_{14}O$	1293	1289	RI, MS	2,1
					Укупно идентификовано		97,7
Подела по групама (%)							
Монотерпенски угљоводоници (1)						tr	
Оксигеновани монотерпени (2, 4, 5-12)						95,3	
Остала једињења (3)						2,4	

$t_{ret.}$: ретенционо време; RI^{lit} – ретенциони индекси доступни у литератури (Adams, 2007); RI^{exp} – ретенциони индекси одређени експериментално помоћу хомологе серије *n*-алкана (C_8–C_{20}) на HP-5MS колони; MS – компоненте идентификоване поређењем масених спектара; RI – компоненте идентификоване поређењем ретенционих индекса; Co-I – компоненте идентификоване ко-инјектирањем идентичног стандарда; tr – компонента присутна у траговима (<0,05%).



борнеол **терпинен-4-ол** ***α*-терпинеол**

Слика 4.34 Структуре најзаступљенијих компоненти у хидолатима плода црног бибера (Техника I)

4.5.1.5.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа хидролата добијеног техником хидродестилације I

Једињења идентификована UHPLC-DAD-MS/MS методом за анализу ***пиперина и осталих алкалоида*** у хидролату добијеном техником I, плода црног бибера, приказана су у Табели 4.33, док је одговарајући хроматограм дат на Слици 4.35.

Квалитативна UHPLC-DAD-MS/MS анализа хидролата из технике I плода црног бибера показала је присуство више пиперамидних деривата типичних за ову биљну врсту. Ови резултати су у складу са претходним истраживањима хемијског састава етарског уља и екстраката црног бибера (Liang et al., 2021; Dawid et al., 2012; Kozukue et al., 2007; Sun et al., 2007).

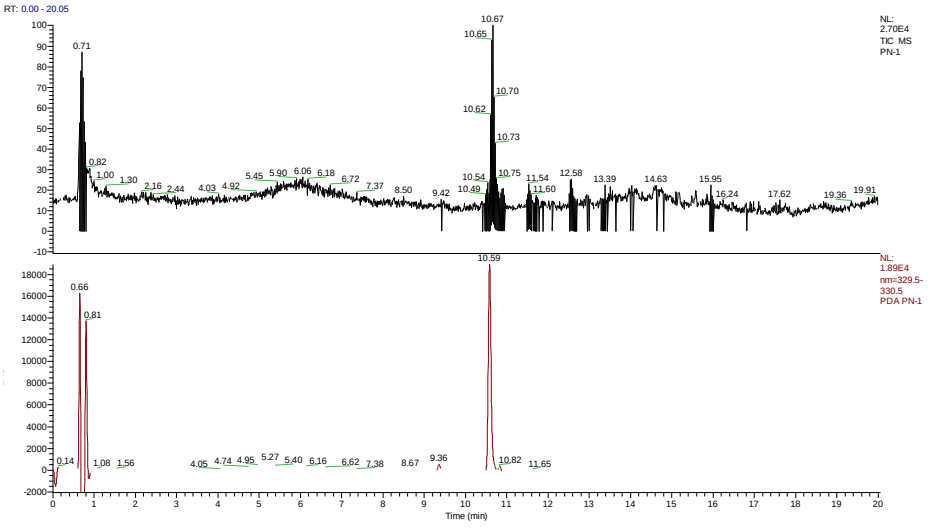
Табела 4.33 Хемијски састав хидролата добијеног техником хидродестилације I плода црног бибера одређен применом UHPLC-DAD-MS/MS анализе

Пик, бр.	**t_R, min MS**	**λ_{max}, nm**	**Молекулски јон $[M+H]^+$ $^a[M+Na]^+$ $^b[2M+H]^+$ $^c[2M+Na]^+$ *m/z***	**MS/MS фрагментациони јони**	**Идентификовано једињење/Литература**	**I**
1	6,77	294 319	314 (336^b)	-	н.и.	+
2	8,61	341	288	203(100%),152,137,115	*cis/trans*-пипераниин (Liang et al., 2021)	±
3	9,53	344 312 sh	272	-	пиперилин (Dawid et al., 2012)	±
4	10,26	340 310 sh	274	-	*cis/trans*-пиперлонгуминин (Liang et al., 2021)	±
5	10,64	-	274	256(100%),102,88	н.и.	-
6	10,70	-	288	288,201/202(100%)/203,175,161,135,86	*cis/trans*-пипераниин (Liang et al., 2021)	+
7	10,78	344 312 sh	286 (308^a, 571^b,593^c)	201(100%),161,171,135	пиперин (*E*,*E*-(*trans*-*trans*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+
8	11,49	344 312 sh	286	201(100%),171,135	изохавицин (*E*,*Z*-(*trans*-*cis*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+
9	11,72	258	314	228(100%)/229,201,171,161,131,112	пипердардин (Liang et al., 2021)	+
10	11,74	359	312 (334^a,645^c)	-	пиперетин – изомер 1 (Liang et al., 2021)	±
11	12,01	353	312	-	пиперетин – изомер 2 (Liang et al., 2021)	±

Наставак Табеле 4.33

12	12,02	263 306	326	-	1-[(2*E*,4*E*,8*E*)-9-(3,4-метилендиоксифенил)-2,4,8-нонатиеноил] пиролидин (Liang et al., 2021)	±
13	12,03	262 308	316	231,213(100%),194,135	пиперолеин А (Liang et al., 2021)	±
14	12,27	276	328	255,227(100%)/229,197,187,173,161,131	ретрофрактамид (Liang et al., 2021)	±
15	12,35	264	224	168,151,133,123,109,95,81,69	пелиторин (Liang et al., 2021)	±
16	12,55	263	340	322,255,227(100%),197,179,112	дехидропиперноналин (Liang et al., 2021)	±
17	12,99	263 306	356	283,265,255,234,215,135(100%)	пиперцид (Liang et al., 2021)	-
18	13,02	362 307	344	241,222,211,185,175,145,135(100%),112	пиперолеин В (Liang et al., 2021)	+
19	13,26		332	240(100%)	н.и.	±
	13,32		286	201(100%)	пиперин – изомер	+
21	15,51	260	334	306,292,149,135,121(100%),109	н.и.	±
23	16,62	260	336	294,280	н.и.	±
24	16,78	259	362	289(100%),261,163,159,137,121	*N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид (Dawid et al., 2012; Sun et al., 2007)	±

± – слабије присуство детектоване компоненте; MS/MS спектар није, али је детектован пик молекулског јона;
н.и. – није идентификован;
sh – таласна дужина апсорпције у облику рамена за пик у UV-Vis спектру;
_ – подвучени фрагментациони јони са веома израженим интезитетима, који су по вредностима блиски главном, најинтензивнијем јону, код кога је интензитет постављен на 100% (у MS/MS спектрима)
*I – хидролат из технике I



Слика 4.35 UHPLC-MS (горе) и UHPLC-DAD (на 330 nm, доле) хроматограм хидролата плода црног бибера (Техника I)

У хидролату је идентификовано више главних једињења карактеристичних за род *Piper*, међу којима су пиперин, пиперанин, пиперетин, пиперлонгуминин, пиперолеини

A и B, као и ретрофрактамид, пелиторин и *N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид. Најзаступљеније једињење, на основу интензитета сигнала у UHPLC-MS хроматограму, био је пиперин (*E*,*E*-изомер), што је у складу са познатом доминацијом овог алкалоида у плодовима црног бибера (Kozukue et al., 2007). Поред њега, детектован је и изокавицин (*E*,*Z*-изомер пиперина), што указује на могућу изомеризацију током процеса дестилације.

Квантитативна UHPLC-DAD-MS/MS анализа спроведена је са циљем да се одреди концентрација пиперина у хидролату добијеним након хидродестилације техником I . У хидролату из технике I пиперин је квантификован у концентрацији од 0,0781 mg/cm^3, што одговара садржају од 7,44 mg/g сувог хидролата. Добијени резултати указују да је пиперин у хидролату присутан у релативно ниској количини, што је у складу са његовом ограниченом растворљивошћу у води (Alshehri et al., 2018; Ren et al., 2019).

Међутим, присуство пиперина у овом хидролату указује да и у почетним фазама процеса, упркос доминацији испарљивих терпенских компоненти, долази до делимичног преласка амида у водену фазу, што се може објаснити колоидном природом хидролата, односно присуством дисперговних липофилних компоненти у воденој фази (Alshehri et al., 2018; Ren et al., 2019; Tavares et al., 2022).

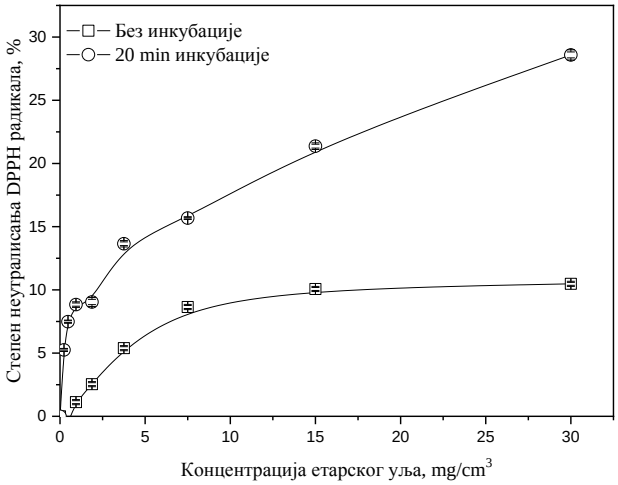
4.5.1.6 Биолошке активности етарских уља и хидролата изолованих техником хидродестилације I

4.5.1.6.1 Антиоксидативна активност етарских уља и хидролата

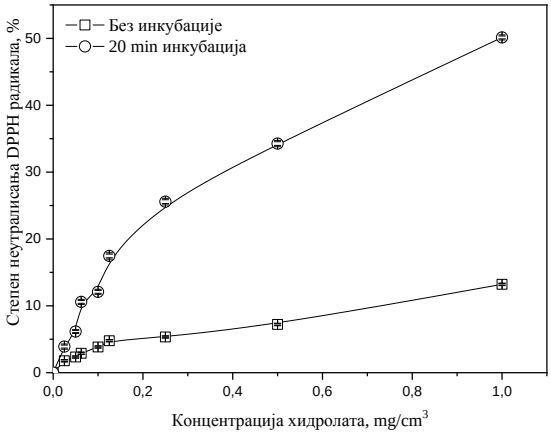
Одређена је антиоксидативна активност етарског уља добијеног техником I (при оптималном хидромодулу) (1:10 m/V), одговарајућег хидролата, као и фракција уља током хидродестилације (I: 0–15 min, II: 15–30 min, III: 30–60 min, IV: 60–90 min и V: 90–120 min). За свеобухватну процену антиоксидативне активности примењено је више *in vitro* тестова који се заснивају на различитим механизмима дејства антиоксиданата (DPPH, ABTS, FRAP, FIC тест, ферицијанидна метода).

4.5.1.6.1.1 DPPH тест

Антиоксидативна активност етарског уља и хидролата плода црног бибера изолованог техником I приказана је на Сликама 4.36 и 4.37, редом док су EC_{50} вредности дате у Табели 4.34.



Слика 4.36 Степен неутралисања DPPH радикала етарским уљем плода црног бибера изолованог техником I



Слика 4.37 Степен неутралисања DPPH радикала хидролатом плода црног бибера изолованог техником I

Степен неутралисања DPPH радикала зависи од концентрације узорка и од времена инкубације. Са повећањем концентрације и времена инкубације расте степен неутралисања радикала(Слике 4.36 и 4.37). Хидролат црног бибера показао је бољу антиоксидативну активност (степен неутралисања DPPH радикала око 50%) у поређењу са етарским уљем (око 29%) након 20 минута инкубације, при

концентрацијама од 1 mg/cm³ и 30 mg/cm³, редом. Узорци етарског уља и хидролата који нису били подвргнути инкубацији показали су знатно ниже вредности степена неутралисања DPPH радикала, око 10,5% и 13% при истим концентрацијама, редом (Слике 4.36 и 4.37).

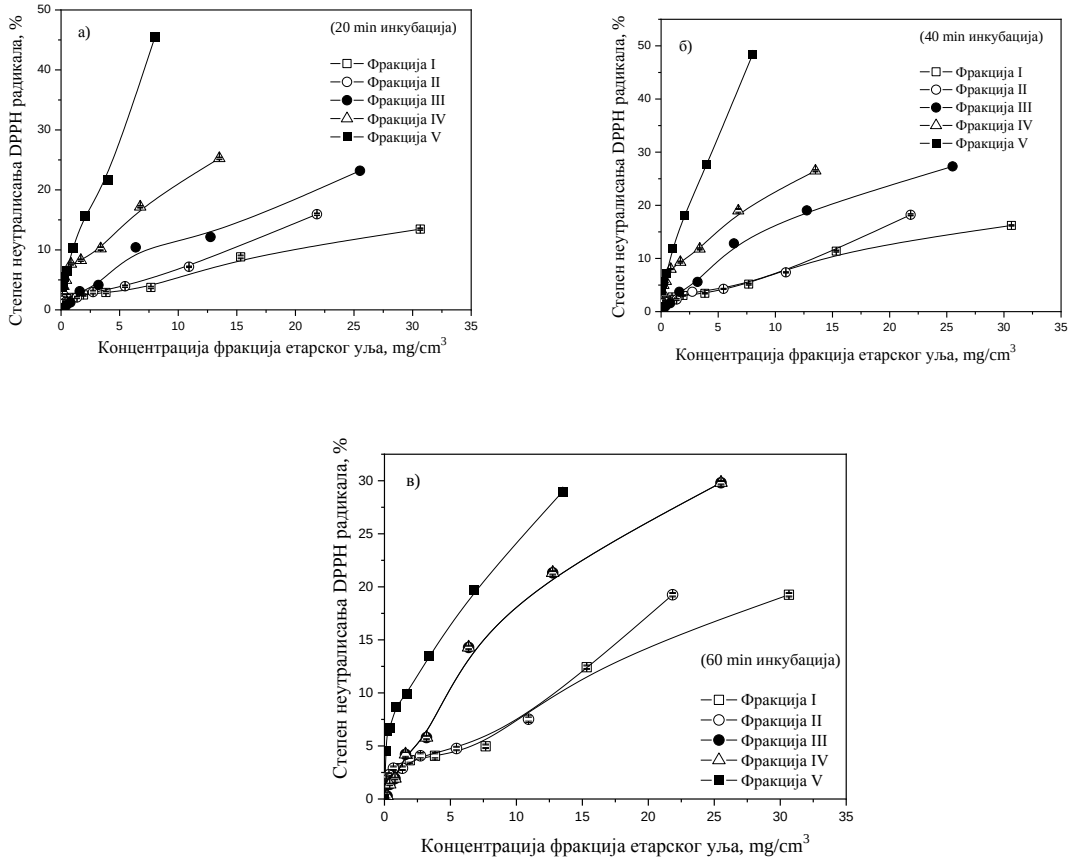
EC_{50} вредности етарског уља без инкубације и након 20 минута инкубације су износиле 582,01 ± 131,83 mg/cm^3 и 67,72 ± 1,871 mg/cm^3, редом, док су EC_{50} вредности хидролата без инкубације и након 20 минута инкубације биле 4,450 ± 0,018 mg/cm^3 и 0,993 ± 0,011 mg/cm^3, редом. На основу добијених резултата, хидролат је показао бољу антиоксидативну активност у односу на етарско уље; међутим, и етарско уље и хидролат су слабији антиоксиданси у поређењу са синтетским антиоксидансима BHT (EC_{50} = 0,045 ± 0,0001) и BHA (EC_{50} = 0,0076 ± 0,00001 mg/cm^3), након 20 минута инкубације.

Активне компоненте етарских уља одговорне су за њихово антиоксидативно дејство. Оне могу бити присутне у већим количинама, као главне компоненте, или у мањим количинама, ањихов ефекат је често резултат синергизма између различитих једињења. Етарско уље црног бибера показало је умерену активност услед свог хемијског састава, у коме доминирају сесквитерпенски угљоводоници који, као и њихови оксигеновани деривати, имају врло ниску антиоксидативну активност. Поред тога, иако монотерпенски угљоводоници могу деловати као антиоксиданси, оксигеновани монотерпени су много ефикаснији (Milenković et al., 2024; Ruberto and Baratta, 2000).

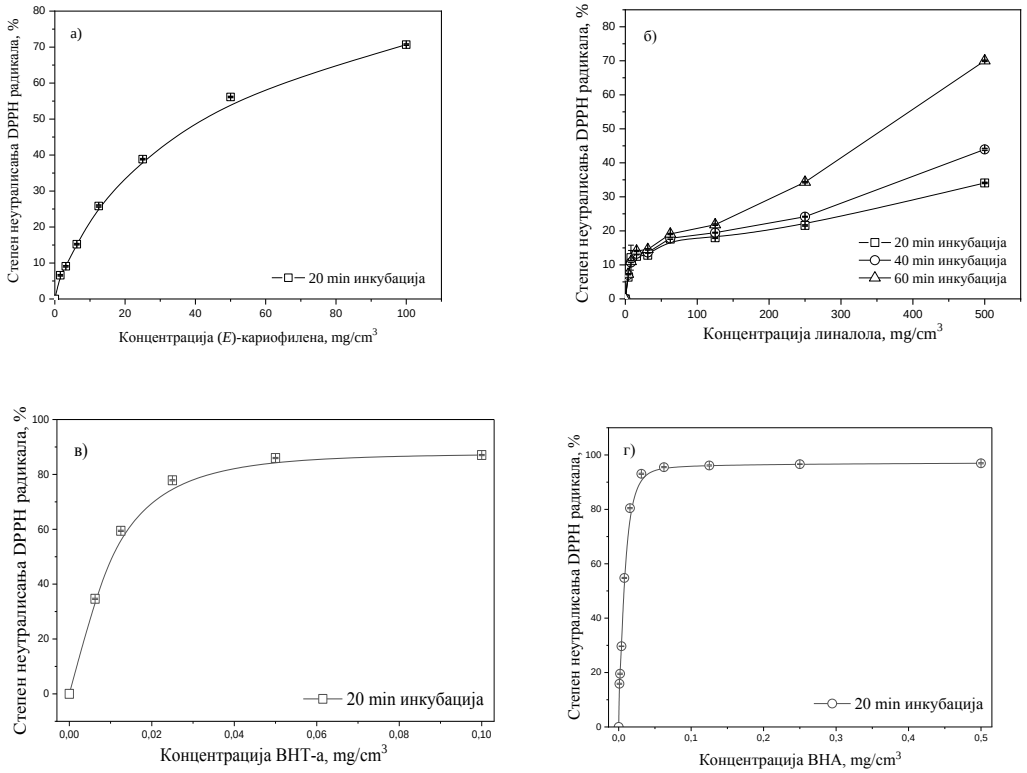
Оксигеновани монотерпени који су најзаступљенији у хидролату (*α*-терпинеол, борнеол и терпинен-4-ол) вероватно су, захваљујући међусобном синергистичком дејству, одговорни за већу антиоксидативну активност хидролата у односу на етарско уље. Иако појединачно *α*-терпинеол, линалол и борнеол испољавају слабу до умерену активност, њихов комбиновани ефекат са тимолом највероватније доприноси укупној ефикасности (Milenković et al., 2022). Пошто у литератури нема података о антиоксидативној активности хидролата црног бибера, резултати овог истраживања представљају значајан допринос.

У циљу процене „квалитета“ етарског уља црног бибера, односно утицаја времена хидродестилације на антиоксидативну активност, анализирана је активност свих фракција добијених током дестилације. Степен неутралисања DPPH радикала за све фракције етарског уља, стандардне компоненте (*E*)-кариофилен и линалол и

синтетске антиоксидансе BHT и BHA приказан је на Сликама 4.38 и 4.39, док су вредности EC_{50} дате у Табели 4.34.



Слика 4.38 Степен неутралисања DPPH радикала фракцијама етарског уља плода црног бибера изолованог техником I након: а) 20 минута инкубације, б) 40 минута инкубације, в) 60 минута инкубације



Слика 4.39 Степен неутралисања DPPH радикала стандардима а) (*E*)-кариофилена, б) линалола, и синтетских антиоксиданаса в) BHT-а, г) BHA

Табела 4.34 EC_{50} вредности етарског уља, хидролата и фракција етарског уља плода црног бибера изолованих техником I и референтних једињења добијене применом DPPH теста

Узорак	**DPPH (EC_{50}, mg/cm$^{3)}$)**			
	Без инкубације	**20 min инкубација**	**40 min инкубација**	**60 min инкубација**
Етарско уље (Техника I)	582,01±131,83	67,72±1,871	46,85±0,454	35,57±0,315
Хидролат (Техника I)	4,450±0,018	0,993±0,011	/	/
Етарско уље (Фракција I)	/	119,73 ± 1,088	103,40 ± 1,589	81,27 ± 0,327
Етарско уље (Фракција II)	/	67,95 ± 1,828	58,70 ± 0,605	56,05 ± 0,618
Етарско уље (Фракција III)	/	64,83 ± 0,458	55,66 ± 0,294	50,54 ± 0,528
Етарско уље (Фракција IV)	/	30,36 ± 0,078	29,92 ± 0,525	27,27 ± 0,151
Етарско уље (Фракција V)	/	9,06 ± 0,055	8,35 ± 0,041	8,02 ± 0,044
(*E*)-кариофилен	/	45,43 ± 0,310	/	/

Наставак Табеле 4.34

Линалол	/	869,97 ± 5,309	601,30 ± 6,882	352,61 ± 1,623
BHT	/	0,045±0,0001	/	/
BHA	0,624±0,0013	0,0079±0,00001	/	/

Степен неутралисања DPPH радикала се повећавао са порастом концентрације фракција етарских уља. Такође, промене у хемијском саставу фракција (Табела 4.32) утицале су на антиоксидативну активност (Табела 4.34). Ипак, треба нагласити да се ове фракције понашају као засебна етарска уља, иако потичу од истог биљног материјала. Ово омогућава избор „најбоље“ фракције односно оне која поседује најбољу антиоксидативну активност.

Прва фракција показала је најмању антиоксидативну активност (EC_{50} = 119,73 ± 1,09; 103,40 ± 1,59; 81,27 ± 0,33 mg/cm^3 након 20, 40 и 60 минута инкубације, редом), док је пета фракција показала најбољу антиоксидативну активност (EC_{50} = 9,06 ± 0,06; 8,35 ± 0,04; 8,02 ± 0,04 mg/cm^3 након 20, 40 и 60 минута инкубације, редом) за сва времена инкубације. Фракције етарских уља показале су степен неутрализације DPPH радикала од приближно 19%, 19%, 29%, 29% и 50% редом, након 60 минута инкубације при концентрацијама ≈ 30 mg/cm^3, 20 mg/cm^3, 25 mg/cm^3, 14 mg/cm^3 и 8 mg/cm^3 (за I–V фракцију, редом). Стандардно једињење (*E*)-кариофилен показало је степен неутралисања DPPH радикала од 70% након 20 минута инкубације при концентрацији 100 mg/cm^3 (EC_{50} = 45,43 ± 0,31 mg/cm^3). У поређењу са синтетским антиоксидансима BHT и BHA, све анализиране фракције су показале слабију активност. Ипак, треба имати у виду да BHT, иако се често користи, може бити штетан по организам при вишим дозама (према Ito et al., дуготрајна изложеност изазива оштећења јетре, бубрега и штитне жлезде) (Ito et al., 1986).

Поређењем EC_{50} вредности прве и пете фракције уочава се да је антиоксидативна активност пете фракције чак десет пута већа. Хемијски састав ових уља знатно се разликује: у првој фракцији садржај монотерпена је скоро двоструко већи, а ароматичних једињења чак осам пута већи него у петој; напротив, садржај оксигенованих моно- и сесквитерпена у првој фракцији је скоро двоструко мањи, док је количина оксигенованих сесквитерпена осамнаест пута мања. Садржај неролидола и

кариофилен оксида у петој фракцији је око петнаест пута већи него у првој, што вероватно доприноси већој активности. Иако нема директних података о антиоксидативној активности ових појединачних једињења, етарска уља у којима су она доминантна показала су изражен антиоксидативни ефекат. Антиоксидативна активност фракција резултат је деловања активних компонената, најчешће синергистичког. Поређење хемијског састава и активности показује да су сесквитерпени, као и оксигеновани моно- и сесквитерпени, највероватније најзаслужнији за антиоксидативно дејство, с обзиром на то да њихов садржај расте са продужавањем времена хидродестилације (Milenković et al., 2024).

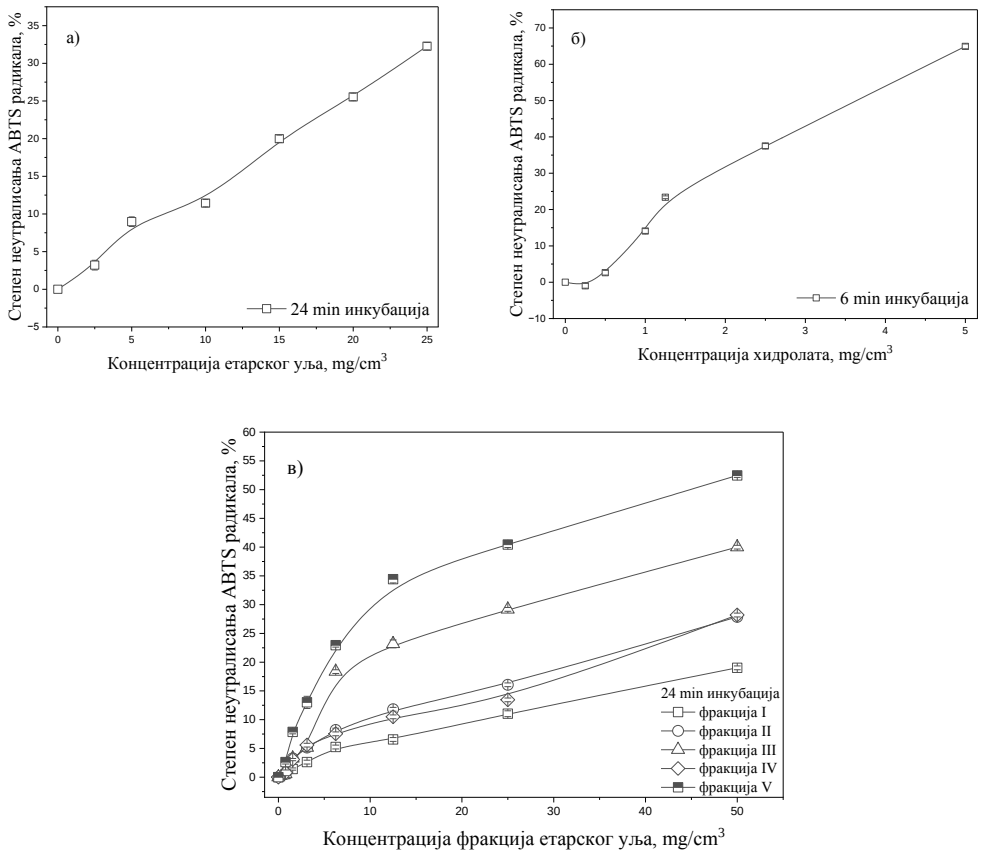
Добијени резултати су у складу са ранијим истраживањима, посебно када је реч о нефракционисаном етарском уљу изолованом техником I. У студији Politeo и сарадника, етарско уље црног бибера добијено под сличним условима показало је степен неутралисања DPPH радикала од 60% и 37% након 60 минута инкубације при концентрацијама од 50 mg/cm³ и 20 mg/cm³, док су најзаступљеније компоненте биле кариофилен (57,6%), сабинен (9,5%) и лимонен (8,8%) (Politeo et al., 2006). Misharina и сарадници су утврдили вредност EC_{50} од 20 mg/cm^3 и навели да су главне компоненте *α*-пинен, *β*-пинен, лимонен, сабинен, карен и кариофилен, уз закључак да су терпенски угљоводоници слаби донори водоника (Misharina et al., 2016). Wang и сарадници су добили EC_{50} вредност од 6,35 mg/cm^3 при чему је 3-карен показивао већу антиоксидативну активност од кариофилена (Wang et al., 2021).

Значајно ниже EC_{50} вредности етанолних екстраката (0,112–0,152 mg/cm^3) и олеорезина (0,29 mg/cm^3) у поређењу са етарским уљима, код којих су вредности после 20 минута инкубације углавном у опсегу 30–120 mg/cm^3, а без инкубације и више стотина mg/cm³, јасно показују да су етанолни екстракти далеко ефикаснији у неутралисању DPPH радикала. Разлика од једног до два реда величине у EC_{50} вредностима потврђује да етанол као растварач омогућава екстракцију поларнијих и реактивнијих антиоксидативних једињења, док етарска уља, доминантно терпенске природе, показују знатно слабију активност.

4.5.1.6.1.2 ABTS тест

Резултати ABTS теста (Слика 4.40 и Табела 4.35) показују јасну зависност степена неутралисања радикала код свих анализираних узорака од концентрације

етарског уља/хидролата/фракција етарског уља, али са значајним разликама у интензитету активности у зависности од хемијског састава и начина добијања.



Слика 4.40 Степен неутралисања ABTS радикала узорцима плода црног бибера добијеним техником I: а) етарско уље; б) хидролат; в) фракције етарског уља

Табела 4.35 EC_{50} вредности етарског уља, хидролата и фракција етарског уља плода црног бибера изолованих техником I и BHT добијене применом ABTS теста

Узорак	**ABTS (EC_{50}, mg/cm^3)**	
	6 min инкубација	**24 min инкубација**
Етарско уље (Техника I)	/	39,64 ± 1,209
Хидролат (Техника I)	3,65 ± 0,036	/
Етарско уље (Фракција I)	/	143,65 ± 3,526
Етарско уље (Фракција II)	/	101,51 ± 2,461
Етарско уље (Фракција III)	/	72,21 ± 0,373
Етарско уље (Фракција IV)	/	95,91 ± 2,001
Етарско уље (Фракција V)	/	44,88 ± 0,695
BHT	0,081 ± 0.001*	/

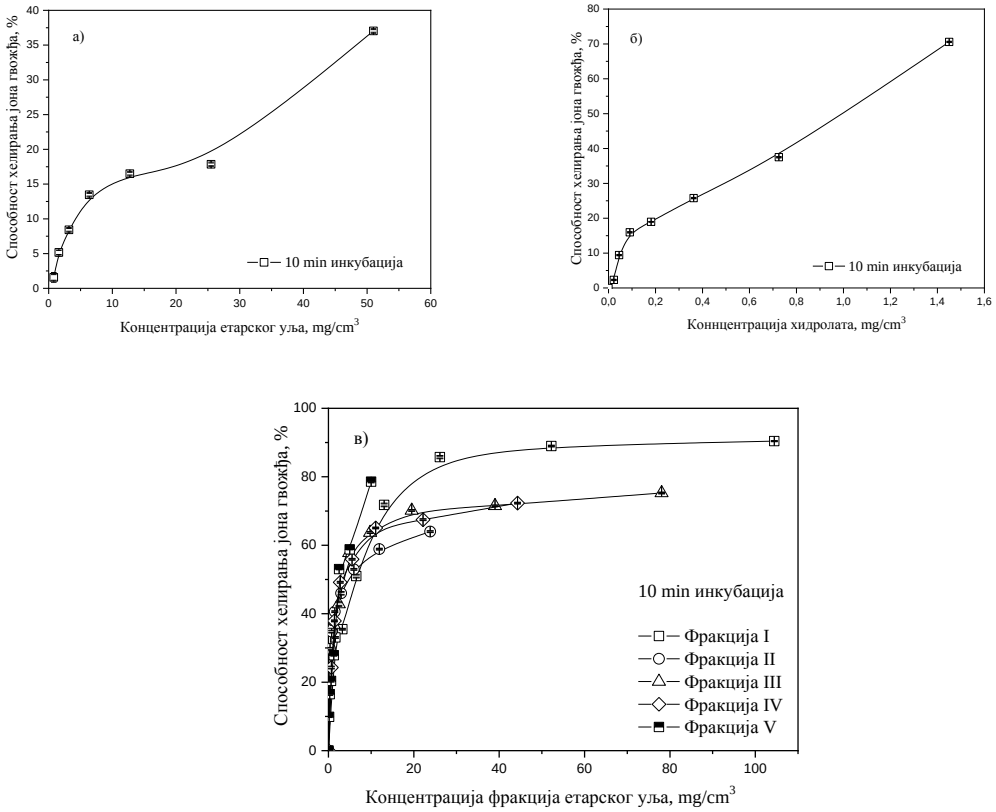
* (Stanojević et al., 2015; Stanojević et al., 2018)

Етарско уље добијено техником I испољило је умерену антиоксидативну активност (EC_{50}=39,64 mg/cm^3), што се слаже са релативно високим уделом сесквитерпенских угљоводоника, познатих као слабих донора водоника. Хидролат је показао изразито јаку активност (EC_{50}=3,65 mg/cm^3), што указује на високу концентрацију растворљивих оксигенованих монотерпена и ароматичних компонената у воденој фази. Анализа фракција етарског уља показује да антиоксидативни потенцијал расте са продужавањем времена хидродестилације. Фракције I и II показале су најслабију активност (EC_{50}=143,65 и 101,51 mg/cm^3), што је у складу са већим садржајем монотерпенских угљоводоника, док је фракција V показала најбољи ефекат (EC_{50} = 44,88 mg/cm^3), што се може повезати са значајно већим уделом оксигенованих моно- и сесквитерпена, укључујући неролидол и кариофилен-оксид. Иако су сви природни производи показали слабији ефекат од синтетског антиоксиданса BHT, добијени резултати јасно показују да фракције етарског уља и хидролат представљају ефикасан начин за добијање узорака побољшаног антиоксидативног потенцијала, што их чини значајним природним алтернативама у биљним формулацијама нутрацеутика, функционалне хране и козметике.

Иако у литератури постоје појединачни подаци о ABTS тесту примењеном на етарско уље црног бибера, резултати су ограничени искључиво на укупно етарско уље, док за појединачне фракције добијене током хидродестилације до сада не постоје објављени подаци, нити је у доступним изворима наведена било каква EC_{50} вредност за ABTS радикал. Стога резултати овог истраживања представљају први систематски приказ антиоксидативне активности фракција етарског уља црног бибера добијених контролисаним фракционисањем, као и прве објављене EC_{50} вредности за ABTS тест, чиме се значајно допуњују досадашња сазнања о антиоксидативном потенцијалу црног бибера.

4.5.1.6.1.3 FIC тест

Хелирајућа способност анализираних етарских уља и хидролата, процењена FIC тестом, приказана је на Слици 4.41, а EC_{50} вредности су дате у Табели 4.36.



Слика 4.41 Зависност промене степена хелирања јона гвожђа од концентрација узорака плода црног бибера добијених техником I: а) етарског уља, б), хидролата, и в) фракција етарског уља

Табела 4.36 EC_{50} вредности етарског уља, хидролата и фракција етарског уља плода црног бибера изолованих техником I и EDTA добијене применом FIC теста

Узорак	**FIC (EC_{50}, mg/cm^3)**
	10 min инкубација
Етарско уље (Техника I)	75,94 ± 1,425
Хидролат (Техника I)	0,97 ± 0,003
Етарско уље (Фракција I)	6,86 ± 0,111
Етарско уље (Фракција II)	5,07 ± 0,267
Етарско уље (Фракција III)	3,86 ± 0,174
Етарско уље (Фракција IV)	3,80 ± 0,033
Етарско уље (Фракција V)	3,38 ± 0,024
EDTA	0,0517 ± 0,0006*

*(Milenković et al., 2025)

Све три приказане криве јасно илуструју зависност хелирајуће активности од концентрације узорака у FIC тесту, али и изразите разлике у њиховој ефикасности. Етарско уље добијено техником I при оптималном хидромодулу испољило је релативно ниску способност хелирања Fe^{2+} јона (EC_{50} = 75,94 mg/cm^3), а насупрот томе, хидролат, богат оксигенованим монотерпенима (Табела 4.32), је показао вишеструко бољу активност (EC_{50} = 0,97 mg/cm^3), што је у складу са познатом способношћу хидроксилних, карбонилних и других оксигенованих функционалних група да формирају стабилне комплексе са Fe^{2+} јонима (Ouamnina et al., 2024, Oboh et al., 2013).

Фракција I етарског уља, богата монотерпенским угљоводоницима и фенилпропаноидима (Слика 4.31 и Табела 4.31), показала је најнижу активност (EC_{50} = 6,86 mg/cm^3), док је фракција V етарског уља, са значајно већим садржајем оксигенованих моно- и сесквитерпена (неролидол, кариофилен-оксид, Слика 4.31 и Табела 4.31), испољила најбољу хелирајућу способност (EC_{50} = 3,38 mg/cm^3). Поређењем активности етарског уља и фракција уља са олеорезином уочава се да је олеорезин (EC_{50} = 0,94 mg/cm^3) показао бољу активност у односу на све узорке добијене хидродестилацијом. Насупрот добијеним резултатима у овој дисертацији, Singh и сарадници су показали да етарско уље бибера има високу способност хелирања Fe^{2+} јона, достижући 73–78% при концентрацији од 200 μg/cm^3, док је стандардни хелатор EDTA очекивано показао још већу ефикасност (~91%) (Singh et al., 2013). Са друге стране, проценат хелирајуће способности јона гвожђа воденим екстрактом црног бибера при концентрацији од 75 mg/cm^3 је био 84% (Gülçin, 2005).

На основу добијених резултата, FIC анализа показује да је хелирајућа активност изолата плода црног бибера различита у зависности од анализирног узорка. Тако хидролат и касне фракције етарског уља представљају најбоље изворе природних агенаса за комплексирање јона гвожђа.

4.5.1.6.1.4 FRAP тест

Резултати FRAP теста приказани су у облику FRAP вредности у Табели 4.37, и јасно показују сличан тренд као код осталих антиоксидативних тестова. Хидролат је испољио највишу редукциону способност (40,39 mg EFe^{2+}/g). Етарско уље добијено техником I показало је умерену редукциону активност (8,70 mg EFe^{2+}/g), док су фракције етарског уља показале постепено повећање FRAP вредности са

продужавањем времена хидродестилације. Најнижу активност имале су фракције I и II (4,29 и 2,99 mg EFe^{2+}/g), што је у складу са њиховим високим уделом терпенских угљоводоника, познатих по слабом редукционом потенцијалу. Супротно томе, фракције IV и V (6,83 и 8,11 mg EFe^{2+}/g) показале су највећу активност међу фракцијама, што указује на већу концентрацију оксигенованих сесквитерпена (нпр. неролидол, кариофилен-оксид). Ови налази потврђују да управо поларније, оксигеноване компоненте доприносе већој FRAP активности, док угљоводонични терпенски профил доводи до значајно нижих вредности. Због овога су етанолни екстракти бибера показали већу активност од свих етарских уља, па и хидролата из технике I.

Табела 4.37 FRAP вредности етарског уља, хидролата и фракција етарског уља изолованих техником I

Узорак	**FRAP вредност, mgEFe^{2+}/ g етарског уља/хидролата 30 min инкубација**
Етарско уље (Техника I)	8,70 ± 0,47
Хидролат (Техника I)	40,39 ± 0,05
Етарско уље (Фракција I)	4,29 ± 0,31
Етарско уље (Фракција II)	2,99 ± 0,44
Етарско уље (Фракција III)	5,85 ± 0,21
Етарско уље (Фракција IV)	6,83 ± 0,23
Етарско уље (Фракција V)	8,11 ± 0,86

Поређење са литературом додатно потврђује умерен редукциони потенцијал етарског уља црног бибера. У раду Jeena и сарадника (2014) показано је да 50 μg етарског уља развија редукциону активност од 1,3 mM Fe^{2+}, што указује на ограничену, али присутну способност услед доминације моно- и сесквитерпенских угљоводоника. Овакви резултати су у сагласности са резултатима ове дисертације, где етарско уље добијено техником 1 показује ниску FRAP активност, док хидролат и задња фракција етарског уља, обогаћене оксигенованим моно- и сесквитерпенима, испољавају већи редукујући потенцијал (Jeena et al., 2014). У студији Politeo и сарадника (2006) етарско уље црног бибера показало је веома низак редукциони потенцијал у FRAP тесту. У концентрацијама од 50 g/dm^3 и 20 g/dm^3, FRAP вредности су износиле само 6 mmol/dm^3 и 7 mmol/dm^3, док су на нижим концентрацијама 10 g/dm^3 и 5 g/dm^3 FRAP вредности биле испод 1 mmol/dm^3. У поређењу са етарским уљима богатим фенолним

једињењима, као што је каранфилић (740–131 mmol/dm^3), јасно је да етарско уље црног бибера испољава значајно слабију редукцону активност (Politeo et al., 2006).

4.5.1.6.1.5 Ферицијанидна метода

Редукујућа способност анализираних узорака одређена је ферицијанидном методом и изражена као милиграми галне киселине по граму етарског уља/хидролата (mg GKE/g етарског уља/хидролата) у Табели 4.38.

Табела 4.38 Редукциона способност (RP вредност) етарског уља, хидролата и фракција уља изолованих техником I

Узорак	RP (Fe^{3+} - Fe^{2+}) mg GKE/g етарског уља/хидролата 20+30 min инкубација
Етарско уље (Техника I)	7,26 ± 0,109
Хидролат (Техника I)	29,66 ± 0,120
Етарско уље (Фракција I)	2,36 ± 0,000
Етарско уље (Фракција II)	4,64 ± 0,056
Етарско уље (Фракција III)	7,71 ± 0,097
Етарско уље (Фракција IV)	8,64 ± 0,041
Етарско уље (Фракција V)	9,63 ± 0,198

Добијени резултати јасно показују исту тенденцију као и остали антиоксидативни тестови. Хидролат црног бибера (RP: 29,66 mg GKE/g) испољава редукујући капацитет који је упоредив са вредностима добијеним за етанолне екстракте (RP: 22,27–31,20 mg GKE/g, Табела 4.17), што је очекивано с обзиром да оба типа узорака (Табеле 4.10, 4.11, 4.32, 4.33) садрже значајан удео поларних, оксигенованих и фенолних једињења способних за ефикасан пренос електрона. Ово јасно разликује хидролат од етарских уља, чији је редукциони потенцијал знатно нижи (2,36–9,63 mg GKE/g), јер етарско уље садржи углавном неполарне и слабо редукујуће терпенске угљоводонике. Етарско уље добијено техником I показало је умерену активност (RP: 7,26 mg GKE/g), док су фракције етарског уља показале јасан раст редукционог потенцијала од раних ка каснијим фракцијама: од 2,36 mg GKE/g (фракција I) до 9,63 mg GKE/g (фракција V). Овај тренд је у складу са повећањем удела оксигенованих моно- и сесквитерпена у касним фракцијама и потврђује да управо ове компоненте доминантно доприносе редукујућем (антиоксидативном) потенцијалу етарског уља плода црног бибера.

Ферицијанидна метода је ретко примењена на етарска уља, а у литератури не постоје резултати који су изражени као у овој дисертацији, тако да значајно проширују постојећа сазнања, јер већина доступних студија за етарско уље црног бибера приказује редукујућу моћ искључиво као промену апсорбанце у зависности од концентрације, без стандардизације у mg галне киселине по граму узорка. Резултати добијени ферицијанидном методом показују да етарско уље црног бибера има умерен редукујући потенцијал, што је у складу са доступном литературом. Наиме, Kapoor и сарадници (2009) су показали да етарско уље црног бибера испољава редукујућу способност, која је виша од активности синтетичких антиоксиданаса BHA и BHT, али нижа у односу на пропил галат (Kapoor et al., 2009). Међутим, у наведеном раду активности су приказане искључиво преко апсорбанце на 700 nm, док је у овој дисертацији редукујућа моћ квантификована као mg галне киселине по граму узорка (mg GKE/g), што представља значајну методолошку предност јер омогућава директно поређење између екстраката, хидролата и фракција.

4.5.1.6.2 Антимикробна активност етарског уља и хидролата

Добијени резултати показују да етарско уље изоловано класичном Clevenger хидродестилацијом (техника I) поседује антимикробну активност, нарочито против *Bacillus cereus* (МИК = 1,56 mg/cm³) и гљиве *Candida albicans* (МИК = 3,125–6,25 mg/cm^3), док су *Salmonella* и *Escherichia coli* показале слабију осетљивост (МИК = 25 mg/cm^3, Табела 4.39), што је у складу са ранијим истраживањима о етарском уљу црног бибера.

Табела 4.39 Минималне инхибиторне (МИК) и микробицидне (ММК), концентрације етарског уља и хидролата црног бибера изолованих техником I у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама

Бактерија/ гљива	*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја	Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
МИК, mg/cm^3								
Етарско уље техника I	25	25	1,56	1,56	25	25	6,25	3,125
Хидролат техника I	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
Антибиотик/ антимикотик, mg/cm^3	хлорамфеникол		ципрофлоксацин				нистатин	
	0,006	0,003	0,00003125	0,0000625	0,0000078125	0,0000078125	0,004	0,004
ММК, mg/cm^3								
Етарско уље техника I	>25	>25	25	25	>25	>25	12,5	12,5
Хидролат техника I	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15

Студије су потврдиле да је црни бибер ефикаснији против Грам-позитивних бактерија, док Грам-негативне бактерије показују већу отпорност због структуре ћелијског зида (Nikolić et al., 2015). Истраживања су такође показала да етарско уље црног бибера делује на оштећење ћелијске мембране код *Escherichia coli* (Zhang et al., 2017), а његова активност може бити побољшана наноемулзионим формулацијама (Hien and Dao, 2022). Ови резултати указују да етарско уље црног бибера има потенцијал као природни антимикробни агенс, посебно против Грам-позитивних бактерија и квасаца, док је за ефикаснију примену против Грам-негативних бактерија потребно даље оптимизовати његову формулацију и концентрацију.

Антимикробна активност није анализирана за фракције етарског уља, јер раздвајање етарског уља у овој дисертацији није имало за циљ унапређење антимикробног потенцијала, већ је било усмерено искључиво на проучавање промена у антиоксидативној активности у зависности од времена хидродестилације. Сходно томе, антимикробна анализа фракција није била планирана у оквиру овог истраживања, али представља логичан наставак рада и предмет будућих истраживања, посебно у

контексту селективне активности појединих фракција према специфичним микроорганизмима.

У поређењу са литературом, ове вредности су нешто више, што указује на умерену активност у односу на резултате других истраживача. На пример, Nikolić и сарадници (2015) су утврдили МИК вредности етарског уља црног бибера у опсегу од 0,07 mg/cm^3 до 3,75 mg/cm^3 и МБК до 10 mg/cm^3, при чему су Грам-позитивне бактерије попут *Bacillus cereus* биле осетљивије од Грам-негативних (Nikolić et al., 2015). Слично томе, Zhang и сарадници (2017) су одредили МИК од 1,0 μL/cm^3 за *Escherichia coli*, што је упоредиво са резултатима ове дисертације када се узме у обзир различита јединица мере и концентрација (Zhang et al., 2017). Додатно, Hien и Dao (2022) су показали да наноемулзија етарског уља црног бибера може снизити МИК вредности на 137–273 μg/cm^3 против *Escherichia coli* и *Salmonella*, што је значајно боља активност у односу на „слободно“ тј. чисто етарско уље (Hien and Dao, 2022). Такође, Teneva и сарадници (2015) су навели да је МИК етарског уља црног бибера против тестираних сојева била изнад 600 ppm, што је приближно слично или нешто веће од вредности добијених у овој дисертацији (Teneva et al., 2015). У целини, резултати показују да је антимикробна активност добијеног етарскког уља упоредива са вредностима из литературе, с тим да варијације могу проистицати из разлика у хемијском саставу етарског уља, методама изолације и концентрацијама коришћеним у тестовима.

Лимонен и сабинен испољавају антимикробно дејство путем нарушавања интегритета липидне мембране и ометања транспорта нутријената, при чему је лимонен посебно ефикасан против квасних гљива *Candida albicans* (Pop et al., 2024). Додатно, *β*-пинен показује синергистички ефекат са другим терпенима, појачавајући њихово дејство на ћелијске зидове бактерија (Ismail et al., 2017), док *β*-кариофилен у комбинацији са лимоненом и *δ*-3-кареном показује значајно повећање антимикробне ефикасности, што указује на постојање синергистичког ефекта унутар саме смеше (Rakmai et al., 2017).

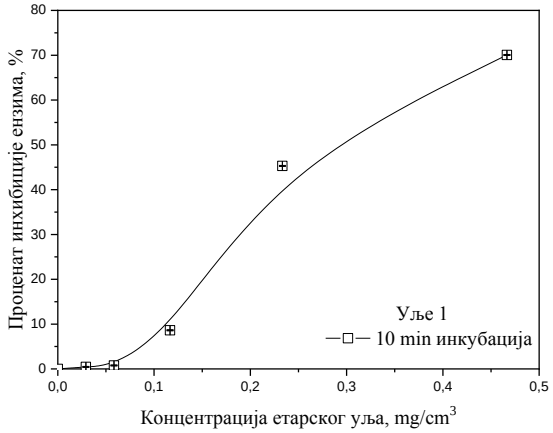
За разлику од етарских уља, за хидролате црног бибера не постоје подаци у литератури који се односе на њихову антимикробну активност. Већина доступних истраживања фокусирана је искључиво на хемијски састав и биолошку активност етарских уља, док се хидролати, као водене фазе настале током процеса дестилације, ретко анализирају у овом контексту. Управо из тог разлога, резултати добијени у овој дисертацији имају посебан значај, јер пружају прве податке о антимикробном

потенцијалу хидролата црног бибера. Иако је у овом истраживању утврђено да хидролат није показао инхибиторну активност према анализираним сојевима микроорганизама (МИК>15 mg/cm^3), ови резултати представљају важну полазну тачку за даља истраживања.

4.5.1.6.3 Антихипергликемијска активност етарског уља и хидролата

У оквиру проучавања антихипергликемијске активности примењена је модификована метода инхибиције ензима *α*-глукозидазе, уз додавање DMSO-а ради побољшања растворљивости липофилних компоненти етарских уља и омогућавања стабилности узорака у реакционом систему.

Резултати су показали да је етарско уље изоловано техником I показало мерљиву инхибиторну активност (Слика 4.42), што указује на присуство једињења која могу утицати на ензиме метаболизма угљених хидрата и потенцијално допринети антихипергликемијском ефекту. Ова активност је потврђена EC_{50} вредношћу од 0,32 ± 0,00001 mg/cm^3.



Слика 4.42 Степен инхибиције ензима *α*-глукозидазе у зависности од концентрације етарског уља плода црног бибера изолованог техником I

Насупрот томе, хидролат добијен истом техником није показао активност у анализираном концентрационом опсегу, што је у складу са његовим хемијским саставом, будући да су у воденој фази у веома малом уделу присутне липофилне компоненте које се доводе у везу са везивањем за активне центре ензима (Табела 4.33 и 4.34).

Према HS-SPME анализи, у хидролатима доминирају оксигеновани монотерпени као што су *α*-терпинеол, борнеол, линалол и терпинен-4-ол (Табела 4.32), док су липофилна једињења попут *β*-кариофилена, сабинена и лимонена, за која је доказано да могу инхибирати *α*-глукозидазу (El-Nashar et al., 2024), у потпуности одсутна. Према подацима из литературе, *α*-терпинеол, борнеол и линалол показују умерен антиоксидативни и антиинфламаторни потенцијал, али нема доказа о њиховој способности да блокирају *α*-глукозидазу или *α*-амилазу (Sarma et al., 2024). Све наведено указује да одсуство антихипергликемијске активности хидролата произилази из њиховог хемијског састава, у коме доминирају хидрофилне компоненте без значајног афинитета за ензим *α*-глукозидазу. Насупрот томе, липофилне компоненте које носе биолошку активност налазе се у етарском уљу.

4.5.1.6.4 Антиинфламаторна активност

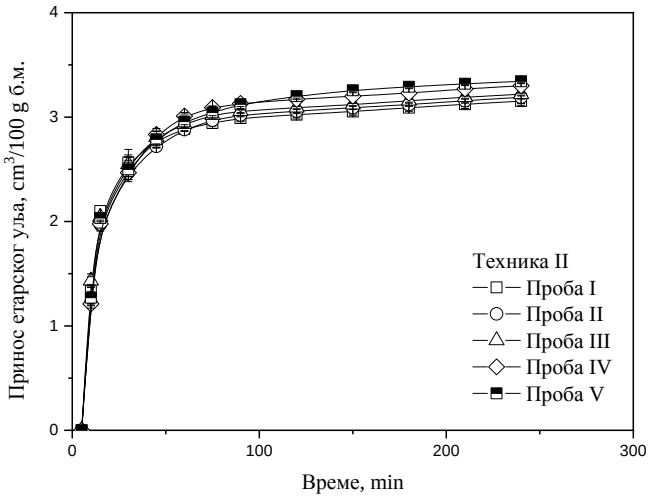
Метод BSA денатурације представља један од најчешће коришћених *in vitro* модела за процену антиинфламаторне активности, али има ограничења када се примењује на етарска уља и друге липофилне супстанце, јер је изворно развијен за водорастворне, поларне екстракте (Nirmala et al., 2023). Етарска уља су смеша терпенских и сесквитерпенских једињења, која су углавном неполарна и слабо растворљива у BSA воденим системима, што ограничава њихову способност да уђу у хомогену интеракцију са протеином па може довести до лажно позитивних или негативних резултата (Otunola i Afolayan, 2018). Поред тога, бројна истраживања истичу да етарска уља испољавају антиинфламаторне ефекте преко других механизама, укључујући инхибицију ензима као што су COX-2 и LOX, као и модулацију цитокина и оксидативног стреса, које BSA модел не може адекватно да симулира (Belahcene et al., 2023). Из ових разлога, BSA тест није примењен за процену антиинфламаторне активности етарских уља у овој дисертацији, јер би добијени резултати били методолошки ограничени и не би пружили валидне податке о стварним биолошким ефектима ових липофилних супстанци.

4.5.2 Техника хидродестилације II

Модификована техника класичне Clevenger хидродестилације, техника II, првобитно је примењена у циљу повећања приноса етарског уља из плода црног

бибера. Док је класичном хидродестилацијом у трајању од 240 минута остварен принос од 3,16 cm^3/100 g б.м., модификовани поступак Clevenger хидродестилације (техника II) подразумева коришћење водене фазе суспензије (хидролата) из претходне хидродестилације за потапање биљног материјала у наредној хидродестилацији уз допуну водом до хидромодула 1:10 m/V. Овај приступ омогућава потенцијално искоришћавање биоактивних компоненти растворених у хидролату, који се иначе одбацује као нуспроизвод. Истовремено, метода доприноси смањењу укупне потрошње воде и отвара могућност примене одрживијег технолошког решења у процесу изолације етарских уља (Stanojević, 2004).

Праћењем приноса током пет узастопних проба хидродестилације, при хидромодулу 1:10 m/V, омогућена је процена ефеката рециклаже хидролата на ефикасност процеса. Добијени резултати пружају основу за боље разумевање улоге хидролата као функционалне компоненте у овом поступку, и представљају важан корак ка широј примени еколошки прихватљивих технологија у преради биљног материјала. Резултати су приказани на Слици 4.43 и у Табели 4.40.



Слика 4.43 Зависност приноса етарског уља из плода црног бибера од времена хидродестилације применом технике хидродестилације II у серији од пет хидродестилација

Табела 4.40 Принос етарског уља у серији од пет хидродестилација (Техника II, време хидродестилације 240 min, хидромодул 1:10 m/V)

	Проба хидродестилације	**Принос етарског уља, cm^3/100 g б.м.**
Техника II	Проба I	3,16
	Проба II	3,19
	Проба III	3,22
	Проба IV	3,30
	Проба V	3,34

Примена модификоване технике класичне Clevenger хидродестилације уз рециклажу водене фазе суспензије (хидролата) резултирала је већим приносом етарског уља у односу на класичну Clevenger хидродестилацију. Максимални принос уља од 3,34 cm^3/100 g биљног материјала остварује се за време од 240 min у петој проби хидродестилације. Принос етарског уља се повећава од прве до пете хидродестилације у серији, као последица повећања садржаја растворених хидрофилних компоненти и емулгованих капи хидрофобних компоненти етарског уља у воденој фази суспензије из претходне хидродестилације, која се користи за потапање биљног материјала у наредној хидродестилацији, допуњена водом до хидромодула 1:10 m/V.

Ови резултати указују да коришћење (рециклирање) хидролата може довести до акумулације биоактивних и потенцијално ко-екстрахујућих једињења која подстичу или убрзавају ослобађање уљаних компонената, чиме се побољшава укупна ефикасност процеса. Иако је уочен позитиван утицај на принос, за потпуну процену ефеката технике II неопходно је размотрити и њен утицај на састав и квалитет етарског уља, што ће бити детаљније анализирано у поглављу које се бави карактеризацијом добијених етарских уља.

С обзиром на променљивост услова у свакој наредној проби хидродестилације (услед акумулације растворених компонената), у овој дисертацији није спроведено кинетичко моделовање модификоване технике хидродестилације. Промене у хемијском саставу водене фазе утичу на пренос масе, због чега систем не испуњава претпоставке класичних кинетичких модела, као што су стабилност процесних параметара и постојање јасно дефинисане вредности максималног приноса (q_o). Уместо

тога, процес се понаша као динамичан систем са постепеном променом услова и потенцијалом за продужено ослобађање компонената и ван стандардних временских оквира. Овакви резултати отварају нове могућности истраживања, са циљем развоја адекватног кинетичког модела који ће узети у обзир променљиву природу система.

Примена модификоване Clevenger хидродестилације уз коришћење водене фазе суспензије (хидролата) представља нови приступ који до сада није описан у литератури за изолацију етарског уља из плода црног бибера. Иако се може рећи да је поступак ефикасан за повећање приноса етарског уља, морају се поменути и нека ограничења.

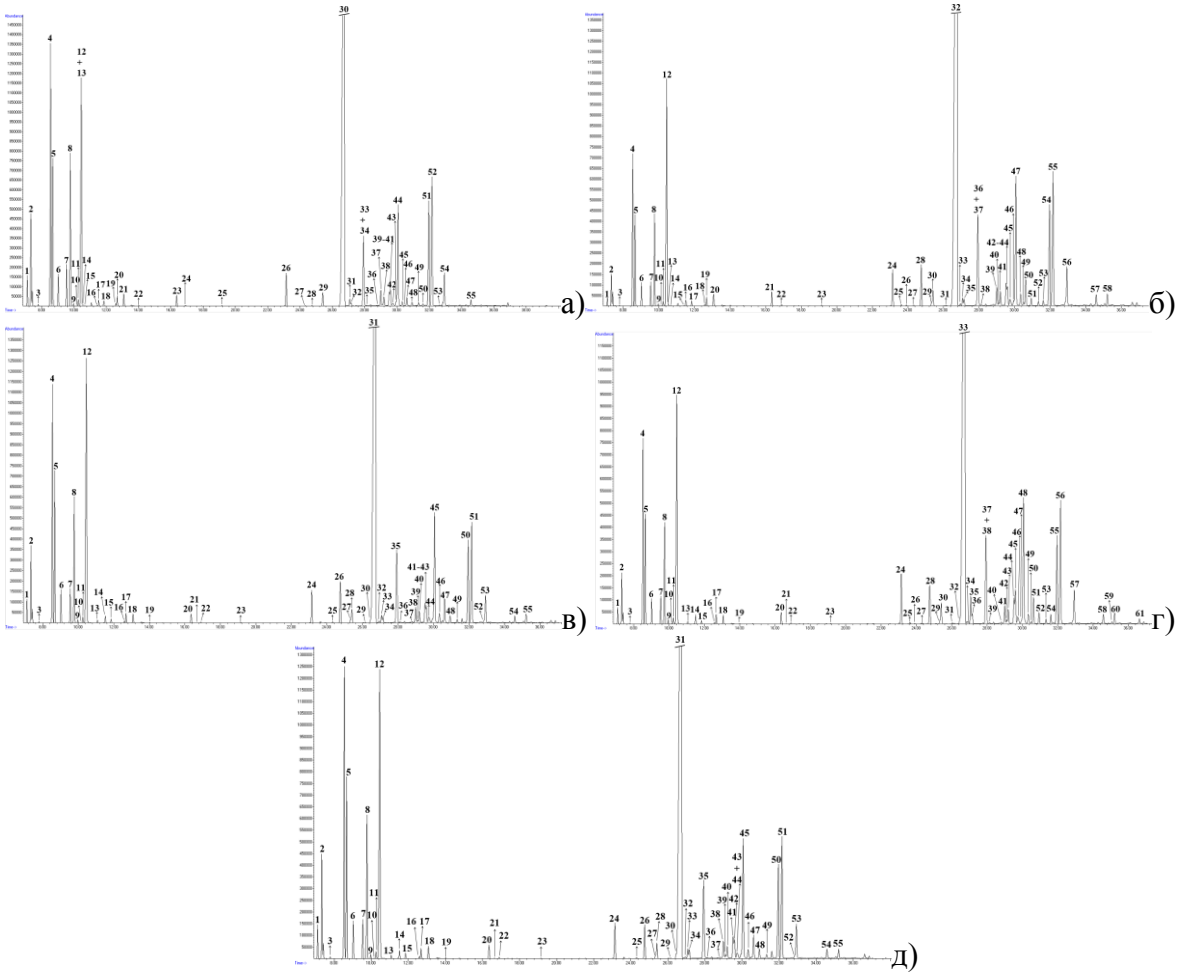
Посебан оперативни изазов уочен је током одвајања водене фазе суспензије (хидролата) из балона са биљним материјалом. Након дестилације плода црног бибера на површини водене фазе суспензије из балона се формира „скрама“ и стабилна емулзиона фаза, услед присуства смоластих, липидних и колоидних материја карактеристичних за овај биљни материјал. Ове супстанце делују као природни емулгатори и стабилизатори, што значајно отежава одвајање (декантовање и филтрирање) водене фазе суспензије од биљног материјала. Са сваком наредном пробом хидродестилације интензитет овог ефекта расте, јер се у хидролату акумулирају растворене и дисперговане материје, што доводи до повећања мутноће и вискозитета. Ови оперативни проблеми су ублажени применом неколико поступака: првенствено гравитационог таложења и хлађења хидролата (на собној температури током 12–24 h) пре декантовања, након тога филтрирање кроз газу и центрифугирање брзином од 4000 rpm током 4 минута. Иако се наведене потешкоће могу сматрати карактеристичним за плод црног бибера, вероватно је да би у случају других биљних материјала, који не садрже значајан удео смола и липидних фракција, интензитет ових појава био знатно мањи или занемарљив. Због тога ова запажања имају посебан значај за разумевање ограничења технике II код биљних делова попут плода црног бибера.

Наведене појаве указују на потребу за даљом оптимизацијом технике II и дефинисањем граница броја проба хидродестилације, како би се очувала ефикасност процеса и репрезентативност састава етарског уља добијеног из плода црног бибера.

4.5.2.1 Хемијски састав етарских уља изолованих техником хидродестилације II

4.5.2.1.1 GC/MS и GC/FID анализа етарских уља

У етарским уљима плода црног бибера изолованих техником II, у серији од пет проба хидродестилације, GC/MS анализом је идентификовано 55–61 једињења (проба I–55, проба II–58, проба III–55, проба IV–61 и проба V–55), што представља 99,0%, 98,7%, 99,8%, 99,8% и 99,8% укупно идентификованих једињења, редом. Резултати су приказани на Слици 4.44 и у Табели 4.41.



Слика 4.44 TIC хроматограми етарског уља плода црног бибера (техника II, проба I-V)

Табела 4.41 Хемијски састав етарског уља плода црног бибера добијеног техником II (техника II, проба I-V)

Бр.	$t_{ret.}$, min	Једињење	Молекулска формула	RI^{exp}	RI^{lit}	Метода идентификације	*Проба I*, %	*Проба II, %*	*Проба III, %*	*Проба IV, %*	*Проба V, %*
1.	7,11	*α*-тујен МУ	$C_{10}H_{16}$	927	924	RI, MS	0,7	0,2	0,7	0,4	0,7
2.	7,34	*α*-пинен МУ	$C_{10}H_{16}$	935	932	RI, MS, Co-I	2,4	0,8	3,1	1,9	3,1
3.	7,78	камфен МУ	$C_{10}H_{16}$	950	946	RI, MS, Co-I	0,1	tr	0,1	tr	0,1
4.	**8,55**	**сабинен** МУ	**$C_{10}H_{16}$**	**975**	**969**	**RI, MS**	**8,6**	**4,2**	**8,4**	**5,7**	**8,4**
5.	8,68	*β*-пинен МУ	$C_{10}H_{16}$	979	974	RI, MS, Co-I	4,4	2,5	4,9	3,3	4,9
6.	9,03	мирцен МУ	$C_{10}H_{16}$	991	988	RI, MS	1,0	0,7	1,1	0,8	1,1
7.	9,55	*α*-феландрен МУ	$C_{10}H_{16}$	1007	1002	RI, MS	1,1	0,6	0,9	0,8	0,9
8.	9,78	*δ*-3-карен МУ	$C_{10}H_{16}$	1013	1008	RI, MS	4,9	2,6	4,0	3,1	4,0
9.	9,98	*α*-терпинен МУ	$C_{10}H_{16}$	1018	1014	RI, MS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10.	10,15	*o*-цимен МУ	$C_{10}H_{14}$	1023	1020	RI, MS	tr	tr	0,2	0,2	0,2
11.	10,25	*p*-цимен МУ	$C_{10}H_{14}$	1025	1022	RI, MS	0,2	0,2	tr	tr	tr
12.	**10,45**	**лимонен* МУ**	**$C_{10}H_{16}$**	**1031**	**1024**	**RI, MS, Co-I**	**9,7**	**8,4**	**11,1**	**9,4**	**11,1**
13.	10,46	*β*-феландрен* МУ	$C_{10}H_{16}$	1031	1025	RI, MS	-	-	-	-	-
14.	10,54	1,8-цинеол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1033	1026	RI, MS, Co-I	tr	tr	-	-	-
15.	10,69	(*Z*)-*β*-оцимен МУ	$C_{10}H_{16}$	1037	1032	RI, MS	tr	tr	-	-	-
16.	11,43	(*E*)-*β*-оцимен МУ	$C_{10}H_{16}$	1056	1044	RI, MS	tr	tr	0,1	0,1	0,1
17.	11,52	*γ*-терпинен МУ	$C_{10}H_{16}$	1059	1054	RI, MS, Co-I	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
18.	11,85	*cis*-сабинен хидрат ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1068	1065	RI, MS	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2
19.	12,59	*p*-мента-2,4(8)-диен МУ	$C_{10}H_{16}$	1087	1085	RI, MS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20.	12,68	терпинолен МУ	$C_{10}H_{16}$	1090	1086	RI, MS	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
21.	13,08	линалол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1100	1095	RI, MS, Co-I	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4
22.	14,02	дехидро-сабина кетон ОМ	$C_9H_{12}O$	1123	1117	RI, MS	tr	-	tr	tr	tr
23.	16,36	терпинен-4-ол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1179	1174	RI, MS	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
24.	16,65	*p*-цимен-8-ол ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1186	1179	RI, MS	-	-	tr	tr	tr
25.	16,90	*α*-терпинеол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1192	1186	RI, MS, Co-I	tr	tr	tr	tr	tr
26.	19,16	карвон ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1245	1239	RI, MS	tr	tr	tr	tr	tr
27.	23,14	*δ*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1340	1335	RI, MS	1,2	1,2	1,1	1,6	1,1
28.	23,64	*α*-кубебен СУ	$C_{15}H_{24}$	1352	1345	RI, MS	-	-	-	0,1	-
29.	23,90	еугенол ФП	$C_{10}H_{12}O_2$	1358	1356	RI, MS, Co-I	-	0,1	-	tr	-
30.	24,32	циклосативен СУ	$C_{15}H_{24}$	1368	1369	RI, MS	-	-	tr	tr	tr

Наставак Табеле 4.41

31.	24,33	лонгициклен СУ	$C_{15}H_{24}$	1369	1371	RI, MS	tr	tr	-	-	-
32.	24,75	*α*-копаен СУ	$C_{15}H_{24}$	1379	1374	RI, MS	tr	1,3	1,0	1,2	1,0
33.	25,33	*β*-кубебен СУ	$C_{15}H_{24}$	1393	1387	RI, MS	-	0,2	tr	tr	tr
34.	25,41	*β*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1395	1389	RI, MS	0,6	0,6	0,7	0,9	0,7
35.	26,16	*α*-гурјунен СУ	$C_{15}H_{24}$	1413	1409	RI, MS	-	-	tr	tr	tr
36.	26,45	*α-cis*-бергамотен СУ	$C_{15}H_{24}$	1420	1411	RI, MS	-	-	tr	tr	tr
37.	**26,76**	**(*E*)-кариофилен СУ**	**$C_{15}H_{24}$**	**1427**	**1417**	**RI, MS**	**41,6**	**48,6**	**39,8**	**44,4**	**39,8**
38.	26,94	*β*-копаен СУ	$C_{15}H_{24}$	1433	1430	RI, MS	-	0,1	tr	tr	tr
39.	27,08	*γ*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1436	1434	RI, MS	0,3	0,3	0,3	1,2	0,3
40.	27,16	*α-trans*-бергамотен СУ	$C_{15}H_{24}$	1438	1432	RI, MS	0,1	0,2	0,3	tr	0,3
41.	27,93	*α*-хумулен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1458	1452	RI, MS	2,9	3,3	2,8	3,1	2,8
42.	27,96	(*E*)-*β*-фарнезен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1458	1454	RI, MS	-		-		-
43.	28,15	*β*-сантален СУ	$C_{15}H_{24}$	1463	1457	RI, MS	tr	tr	tr	tr	tr
44.	28,80	*γ*-муролен СУ	$C_{15}H_{24}$	1479	1478	RI, MS	-	-	tr	tr	tr
45.	28,80	*trans*-кадина-1(6),4-диен СУ	$C_{15}H_{24}$	1479	1475	RI, MS	tr	-	-	-	-
46.	29,00	гермакрен D СУ	$C_{15}H_{24}$	1484	1484	RI, MS	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6
47.	29,11	нерил изобутоаноат ОМ	$C_{14}H_{24}O_2$	1487	1490	RI, MS	-	0,1	0,1	tr	0,1
48.	29,20	*β*-селинен СУ	$C_{15}H_{24}$	1489	1489	RI, MS	0,3	0,5	0,4	0,6	0,4
49.	29,52	*α*-зингиберен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1497	1493	RI, MS	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8
50.	29,55	*α*-селинен* СУ	$C_{15}H_{24}$	1498	1498	RI, MS	-		0,3	0,4	0,3
51.	29,61	курзерен* ОС	$C_{15}H_{20}O$	1500	1499	RI, MS	0,7	0,7	0,6	1,2	0,6
52.	29,74	*α*-муролен СУ	$C_{15}H_{24}$	1503	1500	RI, MS	0,1	0,4	-	-	-
53.	29,79	(*Z*)-*α*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1504	1506	RI, MS	-	-	0,6	-	0,6
54.	29,95	гермакрен A СУ	$C_{15}H_{24}$	1509	1508	RI, MS	0,1	0,2	-	tr	-
55.	30,07	*β*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1512	1505	RI, MS	3,5	4,3	3,7	4,2	3,7
56.	30,32	*δ*-аморфен СУ	$C_{15}H_{24}$	1519	1511	RI, MS	0,2	0,5	0,3	0,4	0,3
57.	30,51	миристицин ФП	$C_{11}H_{12}O_3$	1523	1517	RI, MS	tr	0,1	-	tr	-
58.	30,62	*δ*-кадинен СУ	$C_{15}H_{24}$	1526	1522	RI, MS	-	1,0	0,8	0,9	0,8
59.	30,62	(*E*)-изо-*γ*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1526	1528	RI, MS	0,3	-	-	-	-
60.	30,94	(*E*)-*γ*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1534	1529	RI, MS	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3

Наставак Табеле 4.41

61.	31,34	(*E*)-*α*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1545	1540[a]	RI, MS	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
62.	31,61	елемол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1552	1548	RI, MS	0,1	0,2	-	0,4	-
63.	31,97	гермакрен B СУ	$C_{15}H_{24}$	1561	1559	RI, MS	4,1	3,7	3,1	3,2	3,1
64.	32,17	(*E*)-неролидол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1566	1561	RI, MS	4,8	4,6	3,7	4,2	3,7
65.	32,62	химачален епоксид ОС	$C_{15}H_{22}O$	1579	1578	RI, MS	tr	-	-	-	-
66.	32,84	спатуленол ОС	$C_{15}H_{24}O$	1584	1577	RI, MS	-	-	tr	-	tr
67.	32,94	кариофилен оксид ОС	$C_{15}H_{24}O$	1587	1582	RI, MS	1,4	1,6	1,3	1,3	1,3
68.	34,57	мурола-4,10(14)-диен-1-*β*-ол ОС	$C_{15}H_{24}O$	1633	1630	RI, MS	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
69.	35,22	*α*-муролол (торејол) ОС	$C_{15}H_{26}O$	1649	1644	RI, MS	-	0,4	0,3	0,4	0,3
70.	36,61	*α*-бисаболол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1688	1685	RI, MS	-	-	-	0,2	-
					Укупно идентификовано		99,0	98,7	99,8	99,8	99,8
Подела по групама (%)											
Монотерпенски угљоводоници (МУ)							33,9	20,9	35,3	26,5	35,3
Оксигеновани монотерпени (ОМ)							1,1	1,2	1,1	0,8	1,1
Сесквитерпенски угљоводоници (СУ)							56,5	68,5	57,1	64,7	57,1
Оксигеновани сесквитерпени (ОС)							7,5	7,9	6,3	7,8	6,3
Фенилпропаноиди (ФП)							tr	0,2	-	tr	-

$t_{ret.}$: ретенционо време; RI^{lit} – ретенциони индекси доступни у литератури (Adams, 2007 [a]Babushok et al., 2011); RI^{exp} – ретенциони индекси одређени експериментално помоћу хомологе серије n-алкана (C_8–C_{20}) на HP-5MS колони; MS – компоненте идентификоване поређењем масених спектара; RI – компоненте идентификоване поређењем ретенционих индекса; Co-I – компоненте идентификоване ко-инјектирањем идентичног стандарда; tr – компонента присутна у траговима (<0,05%); * - једињења означена звездицом елуирала су у блиском ретенционом интервалу, уз могућност делимичног преклапања пикова.

У етарским уљима плода црног бибера изолованим техником II у току пет узастопних проба хидродестилације утврђено је да доминира (*E*)-кариофилен као главна компонента, чији се садржај креће од 39,8 до 48,6%, што уједно потврђује сесквитерпенски тип уља карактеристичан за врсту *Piper nigrum* L. Највећи удео ове компоненте утврђен је у другој проби хидродестилације, што указује на интензивније ослобађање тежих, мање испарљивих једињења у том узорку. Поред њега, значајан удео имају и лимонен (8,4–11,1%) и сабинен (4,2–8,6%), као најзаступљенији монотерпени који дају свеж, цитрусно-зачински мирис уљу. *β*-пинен (2,5–4,9%) и *α*-пинен (0,8–3,1%) заступљени су у умереним количинама, а њихове вредности, као и вредности сабинена, најниже су у етарском уљу из друге пробе хидродестилације, што указује на делимично испаравање лако испарљивих фракција током процеса. Од сесквитерпена, поред (*E*)-кариофилена, уочава се присуство *α*-хумулена (2,8–3,3%), *β*-бисаболена (3,5–4,3%) и гемакрена B (3,1–4,1%), који доприносе топлом, дрвенастом

мирису етарског уља. Међу оксигенованим компонентама, најзначајнији су (*E*)-неролидол (3,7–4,8%) и кариофилен оксид (1,3–1,6%), чија заступљеност у константном опсегу указује на благу оксидацију сесквитерпена током хидродестилације. У целини, удео монотерпенских угљоводоника варира од 20,7 до 35,1%, док сесквитерпени чине 56–68%, што јасно потврђује прелаз са лакших ка тежим фракцијама услед продуженог процеса дестилације и акумулације растворених компонената у воденој фази. Ови резултати показују да, иако је укупни састав стабилан, равнотежа између монотерпена и сесквитерпена зависи од специфичних услова процеса, што је од значаја за контролу фенилпропаноидног профила и потенцијалне биолошке активности добијених етарских уља.

Међутим, иако се очекује да се садржај неких од главних компоненти повећава током узастопних проба хидродестилације, то заправо није случај. Поставља се питање: „Зашто је то тако“? Постоји више разлога и неки од њих не могу бити објашњени до краја у потпуности. У изведеном поступку свака наредна хидродестилација је подразумевала употребу новог биљног материјала, али и водене фазе суспензије из балона за дестилацију (делимично рециклираног хидролата) из претходне пробе хидродестилације за квашење биљног материјала. На тај начин, уместо да се у свакој проби хидродестилације користи чиста дестилована вода, коришћена је водена фаза суспензије допуњена водом до хидромодула 1:10 m/V, односно водени раствор чији се састав постепено мења током процеса. Са становишта преноса масе, ова промена значајно утиче на градијент концентрације, дифузионе отпоре и равнотежне односе између биљног материјала, течне и гасовите фазе. Хидролат након прве пробе хидродестилације више не представља чисту воду, већ мешавину воде и растворених терпенских и оксигенованих једињења, као и мањих количина органских киселина и површински активних супстанци. Ове компоненте мењају физичко-хемијске особине екстрагенса, пре свега поларност, pH вредност и површински напон, чиме се мења и начин интеракције са ћелијским зидовима и липофилним компонентама етарског уља. У појединим пробама хидродестилације тај ефекат доводи до побољшане солубилизације и испарљивости сесквитерпена, посебно (*E*)-кариофилена, док у каснијим пробама, због засићења и промене равнотежних услова, долази до његовог делимичног задржавања у биљној маси или хидролату. Свако наредно изоловано етарско уље представља у суштини нови, дифузионо и термодинамички модификован систем, у коме је ефикасност изолације одређена не само структуром биљног ткива, већ и променом хемијског састава екстрагенса. Тако,

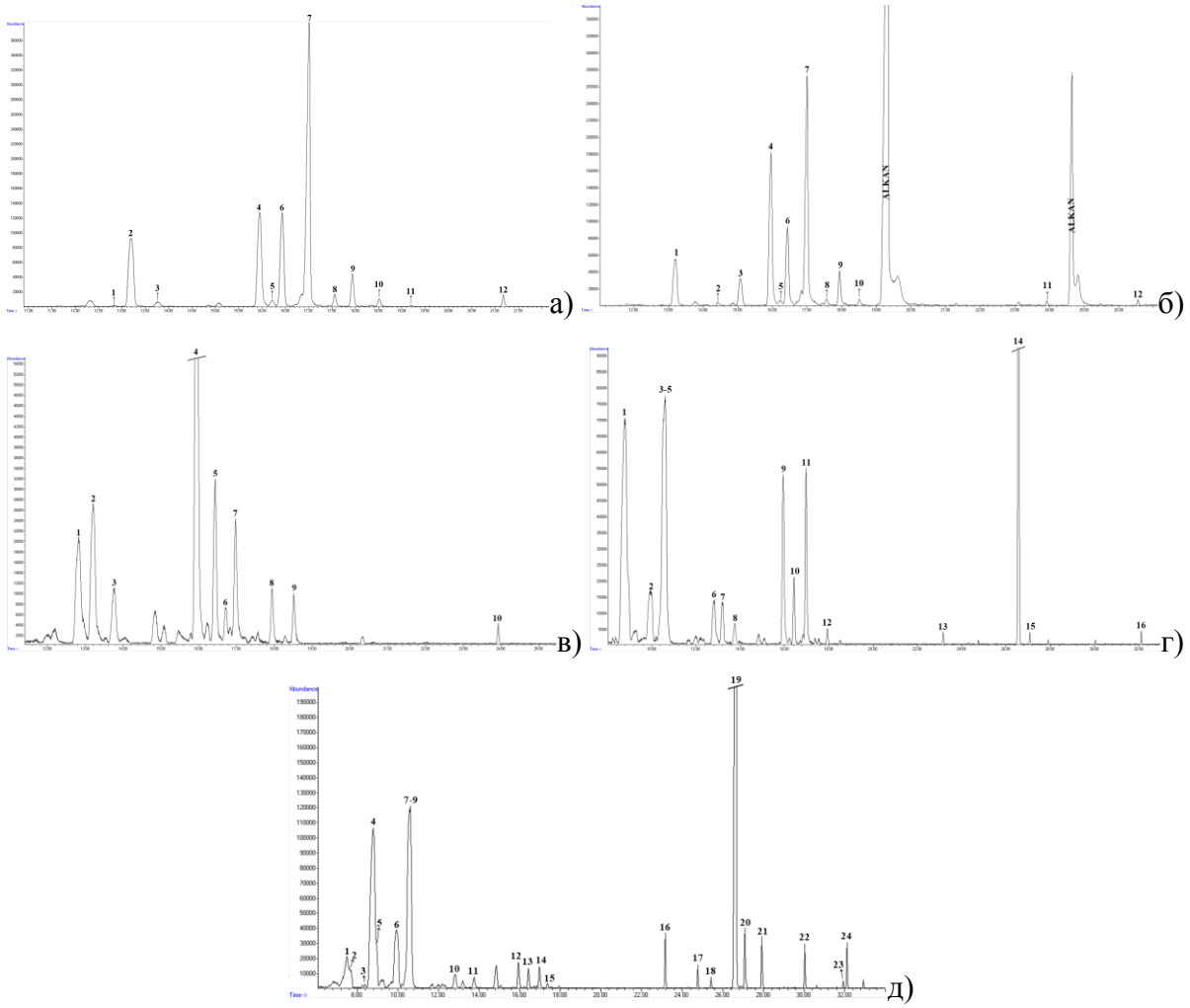
хидролати не делују само као средства за рационализацију поступка и смањење потрошње воде, већ и као фактор који утиче на селективност и квалитативни састав добијеног етарског уља, што указује на потенцијал примене ове технике у контролисаној модификацији састава етарских уља.

4.5.2.2 Хемијски састав хидролата изолованих техником хидродестилације II

С обзиром на то да је хидролат коришћен као део водене фазе у свакој наредној хидродестилацији, било је неопходно детаљно анализирати/проучити његов хемијски састав. Пошто хидролат садржи испарљиве терпенске компоненте, али и поларна биоактивна једињења, примењене су комплементарне аналитичке технике. HS-SPME у комбинацији са GC/MS и GC/FID анализом омогућила је карактеризацију испарљивих компоненти, док је UHPLC-DAD-MS/MS анализа коришћена за идентификацију поларних, и неиспарљивих једињења растворених у хидролатима. Овај комбиновани приступ пружа свеобухватан увид у састав хидролата током пет узастопних проба хидродестилације.

4.5.2.2.1 HS-SPME анализа хидролата

Резултати идентификације испарљивих једињења приказани су у Табели 4.42, док су одговарајући GC/MS хроматограми представљени на Слици 4.45. На основу ретенционих времена (RT) и масених спектара, детектована су и идентификована главна испарљива једињења присутна у анализираним хидролатима, што омогућава поређење њиховог квалитативног и семи-квантитативног састава. Структурне формуле главних испарљивих једињења у анализираним хидролатима дате су на Слици 4.46.



Слике 4.45 TIC хроматограми хидролата плода црног бибера (Техника II, проба I-V)

Табела 4.42 Хемијски састав испарљивих једињења присутних у хидролатима плода црног бибера (техника II, проба I-V)

Бр.	$T_{ret.}$, min	Једињење	Молекулска формула	RI^{exp}	RI^{lit}	Метод идентификације	*Проба I, %*	*Проба II, %*	*Проба III, %*	*Проба IV, %*	*Проба V, %*
1.	7,50	*α*-пинен МУ	$C_{10}H_{16}$	940	932	RI, MS	-	-	-	-	1,5
2.	7,73	камфен МУ	$C_{10}H_{16}$	948	945	RI, MS	-	-	-	-	tr
3.	8,37	сабинен МУ	$C_{10}H_{16}$	969	969	RI, MS	-	-	-	-	tr
4.	**8,75**	***β*-пинен МУ**	**$C_{10}H_{16}$**	**982**	**974**	**RI, MS, Co-I**	-	-	-	**23,2**	17,6
5.	8,99	мирцен МУ	$C_{10}H_{16}$	990	988	RI, MS	-	-	-	-	tr
6.	10,02	*α*-терпинен МУ	$C_{10}H_{16}$	1019	1014	RI, MS	-	-	-	5,2	4,8
7.	**10,51**	***o*-цимен* МУ**	**$C_{10}H_{14}$**	**1032**	**1022**	**RI, MS**	-	-	-		
8.	**10,61**	***β*-феландрен* МУ**	**$C_{10}H_{16}$**	**1032**	**1025**	**RI, MS**	-	-	-	22,3	16,0
9.	**10,65**	**лимонен* МУ**	**$C_{10}H_{16}$**	**1034**	**1024**	**RI, MS, Co-I**	-	-	-		

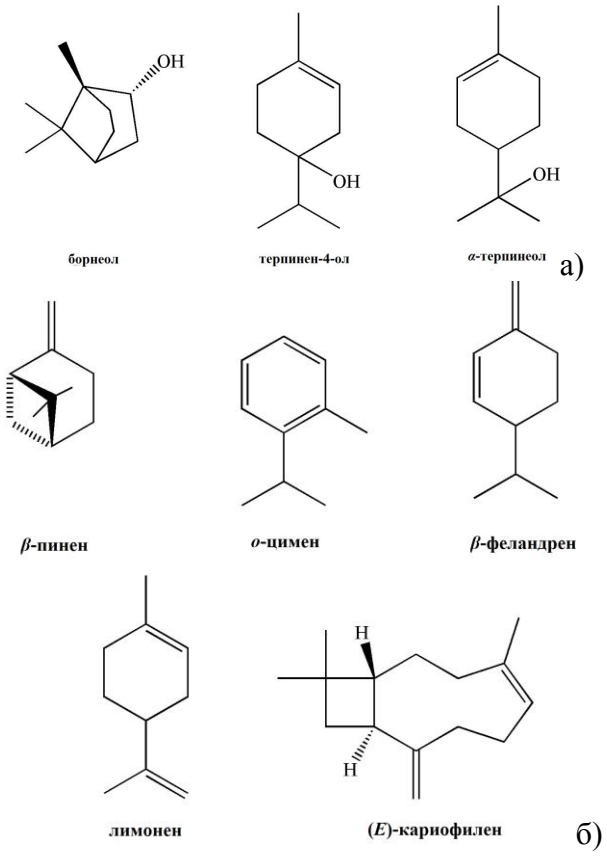
Наставак Табеле 4.42

10.	12,82	*p*-цименен МУ	$C_{10}H_{12}$	1093	1089	RI, MS	tr	-	-	-	-
11.	**12,83**	***o*-гвајакол ДФ**	**$C_7H_8O_2$**	**1093**	**1087**	**RI, MS**	-	-	12,6	4,0	1,0
12.	13,17	линалол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1102	1095	RI, MS	16,3	12,7	13,4	3,2	-
13.	13,75	фенилетил-алкохол О	$C_8H_{10}O$	1106	1116	RI, MS	2,4	-	5,4	1,5	0,8
14.	14,43	*trans*-пинокарвеол ОМ	$C_{10}H_{16}O$	1133	1135	RI, MS	-	1,2	-	-	-
15.	15,07	камфор ОМ	$C_{10}H_{16}O$	1148	1141	RI, MS	-	6,4	-	-	-
16.	**15,94**	**борнеол ОМ**	**$C_{10}H_{18}O$**	**1169**	**1165**	**RI, MS**	**17,3**	**24,4**	**31,4**	**7,2**	**1,3**
17.	16,22	сантолинил-ацетат ОМ	$C_{12}H_{20}O_2$	1175	1171	RI, MS	1,8	tr	-	-	-
18.	**16,45**	**терпинен-4-ол ОМ**	**$C_{10}H_{18}O$**	**1181**	**1174**	**RI, MS**	**13,9**	**11,9**	**9,9**	**2,9**	**0,9**
19.	16,71	*p*-цимен-8-ол ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1187	1179	RI, MS	-	-	3,4	-	-
20.	**17,01**	***α*-терпинеол ОМ**	**$C_{10}H_{18}O$**	**1194**	**1186**	**RI, MS**	**34,7**	**28,3**	**8,6**	**5,9**	**1,1**
21.	17,35	*cis*-пиперитол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1203	1195	RI, MS	-	-	-	-	tr
22.	17,56	*trans*-дихидрокарвон ОМ	$C_{10}H_{16}O$	1208	1200	RI, MS	2,6	1,6	-	-	-
23.	17,95	линалол-формијат ОМ	$C_{11}H_{18}O_2$	1217	1214	RI, MS	4,5	4,1	4,0	tr	-
24.	18,51	*cis*-сабинен-хидрат-ацетат ОМ	$C_{12}H_{20}O_2$	1229	1219	RI, MS	-	-	3,7	-	-
25.	18,52	неоизо-дихидрокарвеол ОМ	$C_{10}H_{18}O$	1230	1226	RI, MS	2,1	1,5	-	-	-
26.	19.21	карвон ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1246	1239	RI, MS	tr	-	-	-	-
	19,32	АЛКАН									
27.	21,17	тимол ОМ	$C_{10}H_{14}O$	1293	1289	RI, MS	2,1	-	-	-	-
28.	23,16	*δ*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1341	1335	RI, MS	-	-	-	1,2	2,1
29.	23,93	еугенол ФП	$C_{10}H_{12}O_2$	1359	1356	RI, MS	-	tr	3,7	-	-
	24,64	АЛКАН									
30.	24,77	*α*-копаен СУ	$C_{15}H_{24}$	1379	1374	RI, MS	-	-	-	-	1,1
31.	25,42	*β*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1395	1389	RI, MS	-	-	-	-	1,0
32.	26,55	(*E*)-кариофилен СУ	$C_{15}H_{24}$	1423	1417	RI, MS	-	1,3	-	19,0	40,1
33.	27,06	*γ*-елемен СУ	$C_{15}H_{24}$	1436	1437	RI, MS	-	-	-	1,2	2,2

Наставак Табеле 4.42

34.	27,91	*α*-хумулен СУ	$C_{15}H_{24}$	1457	1452	RI, MS	-	-	-	-	1,9
35.	30,04	*β*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1506	1505	RI, MS	-	-	-	-	1,7
36.	32,11	(*E*)-изо-*γ*-бисаболен СУ	$C_{15}H_{24}$	1533	1528	RI, MS	-	-	-	1,3	0,7
37.	32,12	(*Z*)-неролидол ОС	$C_{15}H_{26}O$	1534	1531	RI, MS	-	-	-	-	1,7
				Укупно идентификовано			97,7	93,4	96,1	98,1	97,5
Подела по групама (%)											
Монотерпенски угљоводоници (МУ)							-	-	-	50,7	39,9
Оксигеновани монотерпени (ОМ)							95,3	92,1	74,4	19,2	3,3
Сесквитерпенски угљоводоници (СУ)							-	1,3	-	22,7	50,8
Оксигеновани сесквитерпени (ОС)							-	-	-	-	1,7
Фенилпропаноиди (ФП)							-	tr	3,7	-	-
Деривати фенола (ДФ)							-	-	12,6	4,0	1,0
Остала једињења (О)							2,4	-	5,4	1,5	0,8

$t_{ret.}$: ретенционо време; RI^{lit} – ретенциони индекси доступни у литератури (Adams, 2007); RI^{exp} – ретенциони индекси одређени експериментално помоћу хомологе серије *n*-алкана (C_8–C_{20}) на HP-5MS колони; MS – компоненте идентификоване поређењем масених спектара; RI – компоненте идентификоване поређењем ретенционих индекса; Co-I – компоненте идентификоване ко-инјектирањем идентичног стандарда; tr – компонента присутна у траговима (<0,05%); * - једињења означена звездицом елуирала су у блиском ретенционом интервалу, уз могућност делимичног преклапања пикова.



Слика 4.46 Структуре најзаступљенијих компоненти у хидолатима плода црног бибера изолованих техником II а) пробе I и II б) пробе III-V

Хемијски састав хидролата плода црног бибера значајно је варирао током пет узастопних проба хидродестилације применом технике II. У првим пробама доминирају оксигеновани монотерпени (преко 90%), међу којима су најзаступљенији *α*-терпинеол (28–35%), борнеол (17–31%), терпинен-4-ол (≈12–14%) и линалол (12–16%), док су ароматична једињења (попут фенилетил-алкохола, *o*-гвајакола и еугенола) присутна у мањем проценту (2–5%). Са сваком наредном дестилацијом, остаје сличан број (10–24) идентификованих компоненти, али се њихов међусобни однос и групни проценат знатно мења, што указује на постепену промену у хемијској равнотежи између водене и гасовите фазе. У каснијим пробама хидродестилације јавља се пораст удела монотерпенских (до 50,7%) и сесквитерпенских угљоводоника (до 50,8%) попут *β*-пинена, (*E*)-кариофилена, и *γ*-елемена, што указује да обогаћени хидролати омогућавају кумулативну коекстракцију мање поларних, али ароматично значајних компонената.

Истовремено, уочен је постепен пад садржаја оксигенованих монотерпена у хидролатима (93,2→3,3%), што се може приписати њиховој већој растворљивости у воденој фази и постепеном исцрпљивању током наредних проба дестилације. Ови резултати су у складу са саставом етарских уља добијених у истим пробама, где је такође примећено смањење удела оксигенованих једињења и релативни пораст удела мање поларних, угљоводоничних компонената, пре свега (*E*)-кариофилена, *α*-хумулена и *δ*-елемена. На основу свих приказаних резултата може се закључити да коришћење водене фазе суспензије из претходне дестилације доводи до динамичне прерасподеле испарљивих и поларних компоненти, при чему сваки наредни хидролат и добијено етарско уље представљају нову хемијску равнотежу система са специфичним екстракционим потенцијалом и ароматичним профилом.

4.5.2.2.2 UHPLC-DAD-MS/MS анализа хидролата

Једињења идентификована UHPLC-DAD-MS/MS анализом хидролата плода црног бибера (техника II), приказана су у Табели 4.43, а њихови хроматограми су дати на Слици 4.47.

Квалитативна UHPLC-DAD-MS/MS анализа хидролата црног бибера показала је присуство више пиперамидних деривата типичних за ову биљну врсту, као што је

претходно описано за хидролат I изолован техником хидродестилације I (*4.5.1.5.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа хидролата добијеног техником I*).

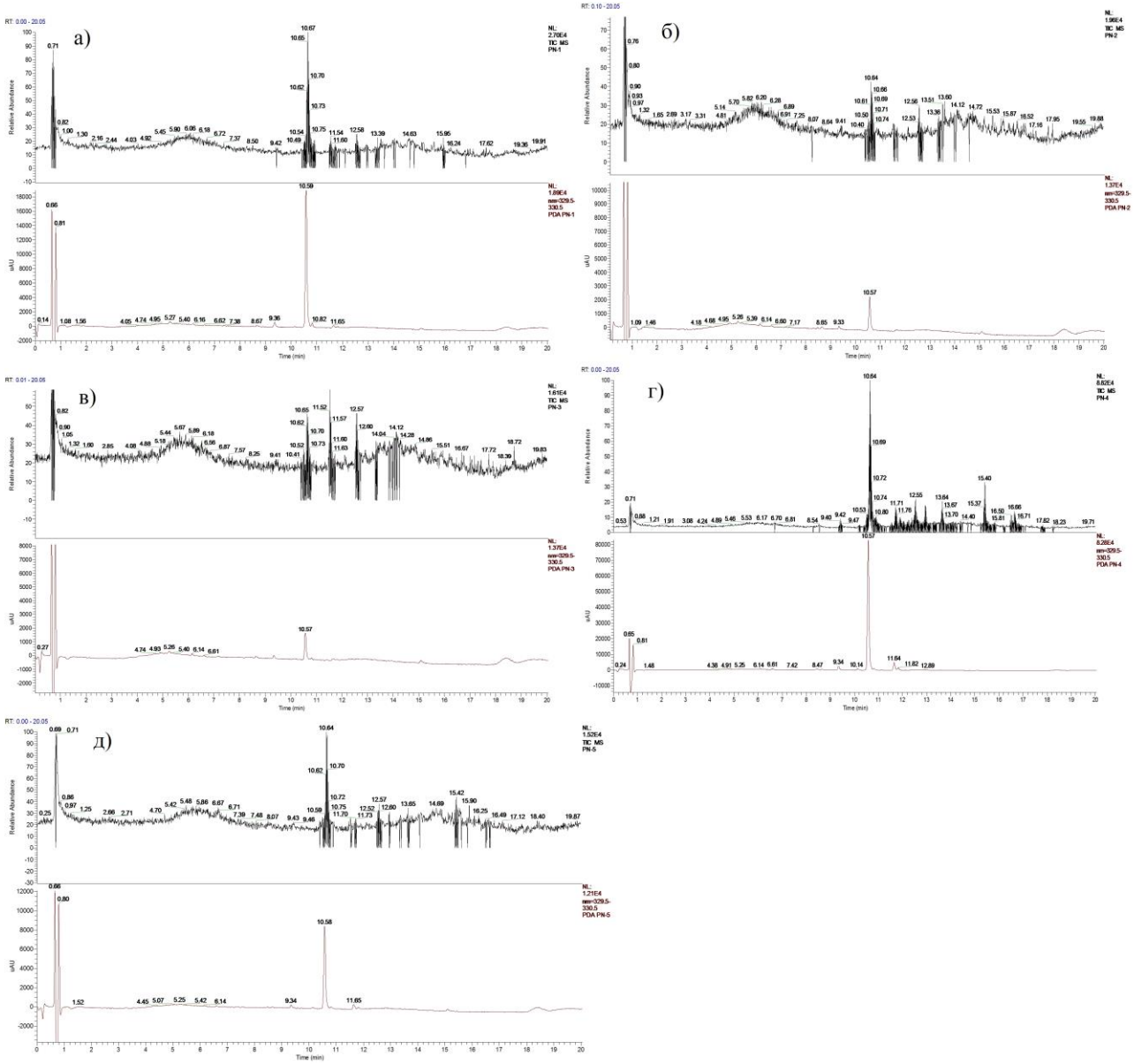
Табела 4.43 Хемијски састав хидролата плода црног бибера добијених техником хидродестилације II, одређен применом UHPLC-DAD-MS/MS анализе

Пик, бр.	**t_R, min MS**	**λ_{max}, nm**	**Молекулски јон $[M+H]^+$ $^a[M+Na]^+$ $^b[2M+H]^+$ $^c[2M+Na]^+$ *m/z***	**MS/MS фрагментациони јони**	**Идентификовано једињење/Литература**	**Хидролати, Техника II**				
						I	**II**	**III**	**IV**	**V**
1	6,77	294 319	314 (336^b)	-	н.и.	+	+	+	+	+
2	8,61	341	288	203(100%),152,137,115	*cis/trans* пиперанин (Liang et al., 2021)	±	±	+	±	±
3	9,53	344 312sh	272	-	пиперилин (Dawid et al., 2012)	±	±	±	±	±
4	10,26	340 310sh	274	-	*cis/trans* пиперлонгуминин (Liang et al., 2021)	±	±	±	±	±
5	10,64	-	274	256(100%),102,88	н.и.	-	+	+	-	-
6	10,70	-	288	288,201/202(100%)/203,175,161,135,86	*cis/trans* пиперанин (Liang et al., 2021)	+	+	+	+	+
7	10,78	344 312sh	286 (308^a, 571^b,593^c)	201(100%),161,171,135	пиперин (*E*,*E*-(*trans-trans*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+	+	+	+	+
8	11,49	344 312sh	286	201(100%),171,135	изохавицин (*E*,*Z*-(*trans-cis*)-пиперин) (Kozukue et al., 2007)	+	-	-	+	-
9	11,72	258	314	228(100%)/229,201,171,161,131,112	пипердардин (Liang et al., 2021)	+	±	+	+	+
10	11,74	359	312 (334^a,645^c)	-	пиперетин – изомер 1 (Liang et al., 2021)	±	±	±	±	±
11	12,01	353	312	-	пиперетин – изомер 2 (Liang et al., 2021)	±	±	±	±	±
12	12,02	263 306	326	-	1-[(2*E*,4*E*,8*E*)-9-(3,4-метилендиоксифенил)-2,4,8-нонатиеноил] пиролидин (Liang et al., 2021)	±	±	±	±	±
13	12,03	262 308	316	231,213(100%),194,135	пиперолеин А (Liang et al., 2021)	±	±	±	+	±
14	12,27	276	328	255,227(100%)/229,197,187,173,161,131	ретрофрактамид (Liang et al., 2021)	±	±	±	+	±
15	12,35	264	224	168,151,133,123,109,95,81,69	пелиторин (Liang et al., 2021)	±	±	±	+	±

16	12,55	263	340	322,255,227(100%), 197,179,112	дехидропиперноналин (Liang et al., 2021)	±	±	±	+	±
17	12,99	263 306	356	283,265,255,234,215,135(100%)	пиперцид (Liang et al., 2021)	-	-	-	+	+
18	13,02	362 307	344	241,222,211,185,175,145,135(100%),112	пиперолеин B (Liang et al., 2021)	+	±	±	+	±
19	13,26		332	240(100%)	н.и.	±	+	+	+	+
20	13,32		286	201(100%)	пиперин – изомер	+	+	+	+	±
21	15,51	260	334	306,292,149,135,121(100%),109	н.и.	±	±	±	+	+
23	16,62	260	336	294,280	н.и.	±	±	±	+	+
24	16,78	259	362	289(100%),261,163, 159,137,121	*N*-изобутил-2*E*,4*E*,8*Z*-еикозатриенамид (Dawid et al., 2012; Sun et al., 2007)	±	±	±	+	+

*± – присутна је нижа количина дате компоненте; детектован је пик молекулског јона, док MS/MS спектар није регистрован.

У свим анализираним хидролатима детектована су једињења идентификована као *cis/trans* пиперанин, пиперин и пипердардин, што указује да ова једињења представљају заједничке компоненте анализираних фракција. Поред њих, уочени су и изомери пиперина и пиперетина, као и друга сродна амидна једињења, укључујући пиперолеин A и B, ретрофрактамид, пелиторин, дехидропиперноналин и пиперцид. Истовремено, уочене су и разлике у квалитативном профилу појединих хидролата, јер су хидролати IV и V показали сложенији састав и већи број јасно детектованих компоненти у односу на хидролате I–III, код којих је већи број једињења био присутан само у траговима или је слабије детектован. Посебно је значајно да је пиперцид забележен искључиво у хидролатима IV и V, што указује на неравномерну расподелу појединих амидних деривата током процеса издвајања. Добијени резултати, потврђени карактеристичним UV максимумима и MS/MS фрагментима, у сагласности су са литературним подацима о хемијском саставу црног бибера (Kozukue et al., 2007; Dawid et al., 2012; Liang et al., 2021; Sun et al., 2007).



Слика 4.47 UHPLC-MS (горе) и UHPLC-DAD (на 330 nm, доле) хроматограми хидролата плода црног бибера технике II (проба I-V)

На основу резултата приказаних на Слици 4.47 и Табели 4.43 види се да уочене разлике у саставу различитих хидролата јесу последица кумулативних физичко-хемијских промена у систему дестилације, укључујући постепену акумулацију мање испарљивих једињења, њихову делимичну изомеризацију и термичку модификацију, као и континуирано разблаживање додавањем дестиловане воде. Овакве промене доводе до постепеног обогаћивања хидролата биолошки активним компонентама, нарочито у каснијим пробама хидродестилације.

Квантитативна UHPLC-DAD-MS/MS анализа спроведена је са циљем да се одреди концентрација пиперина у појединачним хидролатима добијеним након хидродестилације техником II (Табела 4.44).

Табела 4.44 Садржај пиперина у хидролатима одређен применом UHPLC-DAD-MS/MS анализе

	Узорак	**Концентрација пиперина (mg/ cm^3)**	**mg пиперина/g сувог екстракта**
Техника II	Хидролат I	0,0781	7,44
	Хидролат II	<0,00625	/
	Хидролат III	<0,00625	/
	Хидролат IV	0,7777	43,94
	Хидролат V	<0,00625	/

Овај резултат потврђује да се током поновљене употребе хидролата јавља кумулативни ефекат екстракције пиперина у водену фазу, што доводи до његовог постепеног акумулирања.

У првом хидролату садржај пиперина износио је 7,44 mg/g сувог хидролата, што указује да и у почетној фази процеса долази до његовог преласка у водену фазу. У другом, трећем и петом хидролату концентрације пиперина биле су испод границе квантификације (LOQ < 0,00625 mg/cm^3). Ово указује да након почетног пораста (у првој проби хидродестилације) и јасно израженог максимума (у четвртом хидролату), систем достиже стање равнотеже између екстракције, разблажења и термичке разградње пиперина.

Добијени резултати показују да се током процеса хидродестилације не одвија линеарна екстракција пиперина, већ да његов пренос у хидролат зависи од више фактора, поларности водене фазе, кумулативне концентрације органских материја, температуре, времена дестилације и физичко-хемијске стабилности саме компоненте. Високе вредности концентрације пиперина у четвртом хидролату могу се тумачити и као последица синергетског ефекта повећане органске фракције у хидролату која делује као солубилизатор. Познато је да пиперин, упркос својој слабој растворљивости у води, може бити стабилизован у воденим системима који садрже мање количине липофилних компоненти (као нпр. пиперанин, пелиторин, пиперетин), што омогућава његов прелазак у хидролат током каснијих дестилација (Alshehri et al., 2018; Ren et al., 2019).

Концентрације пиперина у хидролатима плода црног бибера су ниске у поређењу са концентрацијама у етанолним екстрактима. Међутим, идентификација пиперина у хидролатима указује на то да они представљају водену фракцију која, поред фенолних једињења утврђених GC/MS анализом, може садржати и значајне мање растворљиве компоненте као што је пиперин. Ово је посебно важно имајући у виду да већина доступних студија о саставу хидролата *Piper nigrum* описује присуство углавном кисеоничаних монотерпена (Milenković et al., 2022), терпеноида и других у води растворљивих једињења. До сада нису често објављивани подаци о присуству алкалоида попут пиперина у овим фракцијама, тј. хидролатима, у литератури, што ове резултате чини оригиналним и значајним за даље истраживање хемијског састава и потенцијалних биолошких активности хидролата црног бибера.

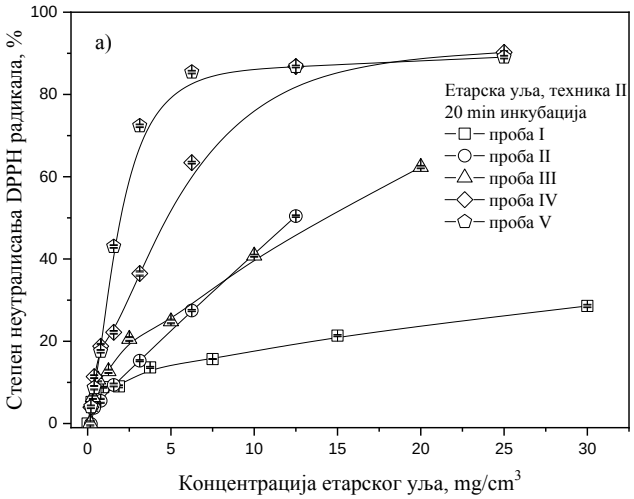
4.5.2.3 Биолошке активности етарских уља и хидролата изолованих техником II

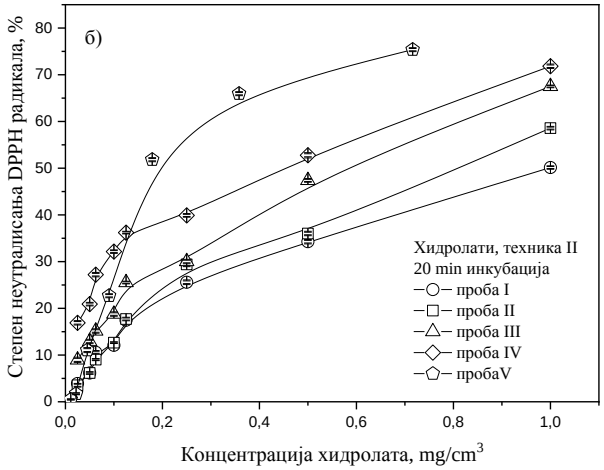
4.5.2.3.1 Антиоксидативна активност етарских уља и хидролата

4.5.2.3.1.1 DPPH тест

Резултати DPPH теста свих етарских уља и одговарајућих хидролата изолованих применом технике II приказани су на Слици 4.48, док су EC_{50} вредности свих узорака дате у Табели 4.45.

У Табели 4.45 су приказани резултати за етарско уље и хидролат изоловане техником хидродестилације I као представнике за прву пробу технике II, из разлога што су то исти узорци, а овде су означени као проба I како би лакше поредили етарска уља и хидролате из наредних проба хидродестилације.





Слика 4.48 Степен неутралисања DPPH радикала а) етарским уљима и б) хидролатима плода црног бибера изолованих техником II

Табела 4.45 EC_{50} вредности етарског уља и хидролата плода црног бибера технике II добијене применом DPPH теста

Узорак	**DPPH (EC_{50}, mg/cm^3)**	
	Без инкубације	**20 min инкубација**
Етарско уље (проба I)	582,01±131,83	67,72±1,871
Етарско уље (проба II)	83,01 ± 0,574	12,36 ± 0,083
Етарско уље (проба III)	101,22 ± 5,758	14,66 ± 0,072
Етарско уље (проба IV)	81,83 ± 0,470	4,91 ± 0,047
Етарско уље (проба V)	9,562 ± 0,047	1,61 ± 0,058
Хидролат (проба I)	4,450±0,018	0,993±0,011
Хидролат (проба II)	4,636 ± 0,054	0,801 ± 0,008
Хидролат (проба III)	3,969 ± 0,020	0,618 ± 0,002
Хидролат (проба IV)	3,512 ± 0,155	0,468 ± 0,010
Хидролат (проба V)	0,741 ± 0,095	0,212 ± 0,000

На Слици 4.48 се уочава јасан пораст степена неутралисања DPPH радикала од пробе I до V и то етарским уљима и хидролатима. Етарско уље и хидролат из пробе I показују најслабији степен неутралисања радикала, док етарско уље и хидролат из пробе V показују највећи степен неутралисања. Овакви резултати су у складу са повећаним садржајем оксигенованих компонената у каснијим пробама хидродестилације (Табела 4.41 и 4.42). Битно је нагласити да резултати попут ових нису пронађени у литератури када је у питању црни бибер, па су од великог значаја за даља истраживања.

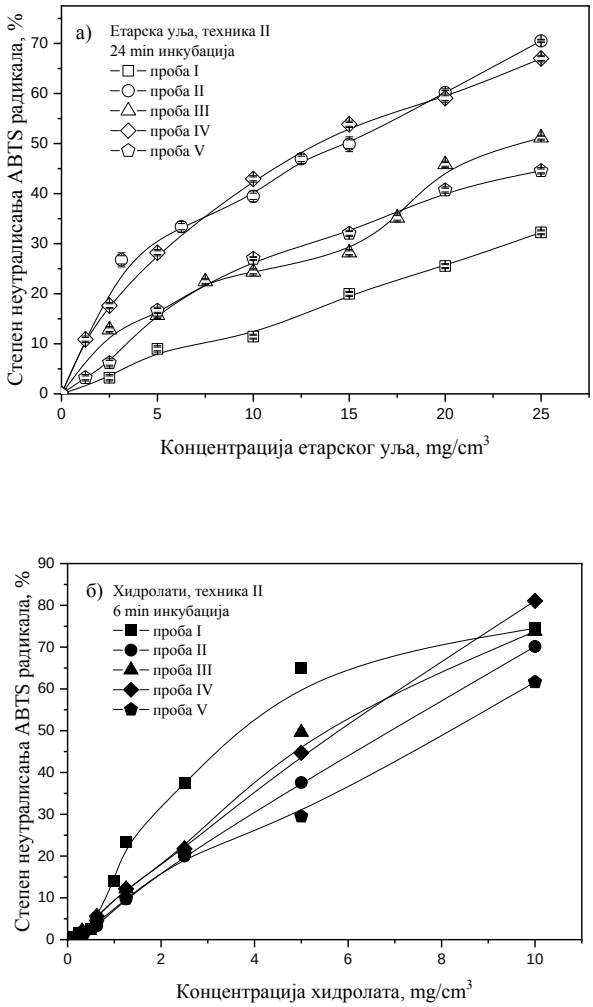
Резултати DPPH теста (Табела 4.45) показују да етарска уља каснијих проба генерално испољавају већу антиоксидативну активност у односу на пробе I и II, што се огледа у нижим EC_{50} вредностима. При томе, проба III благо одступа од уоченог тренда, јер показује више EC_{50} вредности у односу на пробу II. У свим узорцима, након 20 min инкубације забележене су ниже EC_{50} вредности него без инкубације, што указује на ефикаснију неутрализацију DPPH радикала са продужетком времена реакције. Најслабију активност показало је етарско уље из пробе I ($EC_{50} \approx 582$ mg/cm^3) (идентично етарском уљу технике I), док су код етарског уља из проба II-V (Техника II) значајно ниже EC_{50} вредности. Најнижа EC_{50} вредност одређена је за етарско уље из пете пробе хидродестилације (1,61 mg/cm^3 после инкубације). Хидролати су, у складу са очекивањима, показали много бољу антиоксидативну активност у односу на одговарајућа етарска уља. EC_{50} вредности опадају од 0,993 mg/cm^3 (хидролат из пробе I) до 0,212 mg/cm^3 (хидролат из пробе V).

Промене у антиоксидативној активности узорака добијених техником хидродестилације II директна су последица структурних и групних промена у хемијском саставу етарских уља и хидролата које настају током пет узастопних проба модификоване хидродестилације. У почетним пробама, хидролати садрже високе концентрације оксигенованих монотерпена (*α*-терпинеол, борнеол, линалол, терпинен-4-ол), чије хидроксилне и етарске функционалне групе омогућавају ефикасан пренос водоника и електрона на DPPH радикал, што је у потпуности у складу са ниским EC_{50} вредностима добијеним за хидролате I и II. Код етарских уља изолованих техником II се у каснијим пробама дестилације повећава удео оксигенованих сесквитерпена (неролидол, кариофилен-оксид, Табела 4.42), као и антиоксидативна активност етарских уља. Активност етарског уља добијеног из пете пробе је највећа (EC_{50} = 1,61 mg/cm^3 након 20 min инкубације). Овај резултат потврђује да су, упркос доминацији (*E*)-кариофилена, који има само умерен антиоксидативни потенцијал, управо

оксигеновани деривати главни носиоци DPPH активности. Чињеница да се у каснијим пробама појављују и ароматични и слабо поларни сесквитерпени додатно указује на комплексни синергистички ефекат.

4.5.2.3.1.2 ABTS тест

Резултати одређивања антиоксидативне активности етарских уља и одговарајућих хидролата добијених у више проба применом технике хидродестилације II за различита времена инкубације (6 min и 24 min) приказани су на Слици 4.49 и у Табели 4.46.



Слика 4.49 Зависност степена неутралисања ABTS радикала од концентрације а) етарских уља и б) хидролата плода црног бибера изолованих техником II

Табела 4.46 EC_{50} вредности етарских уља и хидролата плода црног бибера изолованих техником II добијене применом ABTS теста

Узорак	ABTS (EC_{50}, mg/cm$^{3)}$	
	6 min инкубација	**24 min инкубација**
Етарско уље (проба I)	/	39,64 ± 1,209
Етарско уље (проба II)	/	15,03 ± 0,733
Етарско уље (проба III)	/	21,36 ± 0,118
Етарско уље (проба IV)	/	13,26 ± 0,246
Етарско уље (проба V)	/	27,28 ± 0,919
Хидролат (проба I)	3,65 ± 0,036	/
Хидролат (проба II)	6,95 ± 0,059	/
Хидролат (проба III)	5,10 ± 0,060	/
Хидролат (проба IV)	5,94 ± 0,035	/
Хидролат (проба V)	8,11 ± 0,066	/

Резултати ABTS теста добијени за узорке из технике хидродестилације II показују да антиоксидативна активност етарских уља и хидролата црног бибера значајно варира током пет узастопних проба модификоване хидродестилације, што је у складу са постепеним променама у њиховом хемијском саставу.

На Слици 4.49б се уочава да хидролат из сваке наредне пробе хидродестилације показује различит степен неутрализације ABTS радикала, при чему узорак из прве пробе достиже највећи проценат неутрализације (≈75%) већ са концентрацијама испод 10 mg/cm^3, што одговара и највећем садржају оксигенованих монотерпена (*α*-терпинеол, борнеол, терпинен-4-ол, Табела 4.42). Ове компоненте, познате по доброј способности да донирају протоне и електроне, у литератури се препознају као главни носиоци неутрализације ABTS радикала (Gu et al., 2025). Са сваком наредном пробом хидродестилације уочава се постепено смањење активности, што се поклапа са падом удела оксигенованих једињења у хидролатима и порастом удела мање активних моно- и сесквитерпенских угљоводоника (Табела 4.42). Етарска уља изолована техником II показују сличан тренд: активност није линеарно зависна од редоследа дестилација, већ од доминантних хемијских група у сваком појединачном етарском уљу. Најбољу активност показало је етарско уље из пробе IV (EC_{50} = 13,26 mg/cm^3), затим из пробе II (15,03 mg/cm^3), што је у складу са њиховим повољним односом оксигенованих једињења у односу на етарска уља из осталих проба хидродестилације. Супротно томе, етарско уље из пробе V (EC_{50} = 27,28 mg/cm^3) и пробе III (EC_{50} = 21,36 mg/cm^3) показала су слабији степен неутралисања ABTS радикала, што се може довести у везу са већим уделом сесквитерпенских угљоводоника у њима, укључујући (*E*)-кариофилен

и α-хумулен. Наиме, директна активност терпена у ABTS тесту у великој мери зависи од њихових структурних карактеристика, док оксигеновани терпени често значајније доприносе неутрализацији овог радикала (Wojtunik-Kulesza et al., 2018). Интересантно је да етарско уље из технике I показује слабију активност (EC_{50} = 39,64 mg/cm^3) у односу на већину узорака из технике II, што указује на значај утицаја модификованог дестилационог процеса и утицаја водене фазе суспензије из претходних дестилација на селективност екстракције активних једињења.

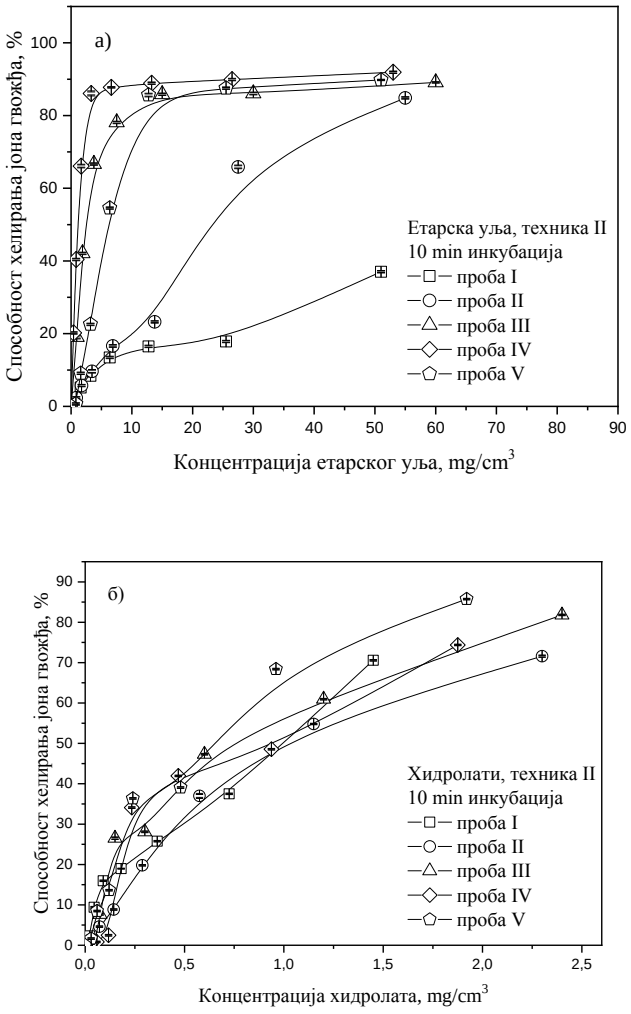
Сви хидролати показали су већи степен неутралисања ABTS радикала од етарских уља за краће време инкубације, што је у складу са већим садржајем поларних, високо реактивних компонената у њима. EC_{50} вредности хидролата крећу се од 3,65 mg/cm^3 (хидролат из пробе I) до 8,11 mg/cm^3 (хидролат из пробе V), што представља значајну активност у односу на активност етарских уља (Табела 4.46). Важно је нагласити да у доступној литератури нема података о промени ABTS активности током више узастопних проба хидродестилације етарског уља из плода црног бибера. У већини радова постоје подаци о ABTS активности само за етарско уље бибера који би могли да се упореде са активношћу етарског уља из технике I/етарског уља из пробе I технике II. Према Politeo-у и сарадницима (2006), ABTS вредности за етарско уље црног бибера указују на умерену активност (≈20–35% инхибиције), што је знатно ниже од вредности добијених у овој дисертацији за хидролате и поједине пробе етарског уља добијене техником II. Ово указује да примењена техника II представља ефикасну потенцијалну технику за повећање антиоксидативне активности етарског уља црног бибера, али и његових отпадних продуката (хидролата).

Поређењем резултата DPPH и ABTS тестова уочава се да ове две методе дају различит редослед антиоксидативне активности анализираних етарских уља и хидролата, што указује на различите механизме неутрализације радикала. Према резултатима DPPH теста уочен је јасан тренд повећања активности кроз узастопне пробе технике II, како за етарска уља тако и за хидролате, при чему су најбоље резултате показали узорци из каснијих проба (нарочито из проба IV и V). Ово највероватније прати постепено повећање садржаја компоненти које су добри донори водоника, што је кључни механизам DPPH теста (Kim et al., 2002). У целини, DPPH тест је осетљивији на промене у саставу етарских уља и хидролата које доводе до повећане способности донирања водоника, док ABTS тест боље одражава утицај поларности и електрон-донорских својстава компонената присутних у систему. Разлике у добијеним тестовима потврђују да је за потпуну процену антиоксидативног

потенцијала етарског уља и хидролата црног бибера неопходна примена више комплементарних метода, јер ниједан тест појединачно не може адекватно описати сложено понашање овако комплексних смеша.

4.5.2.3.1.3 FIC тест

Резултати FIC теста, изражени као EC_{50} вредности (mg/cm³) након 10 min инкубације, приказани су у Табели 4.47, док је концентрационо-зависна хелирајућа активност анализираних узорака представљена графички на Слици 4.50.



Слика 4.50 Зависност промене степена хелирања јона гвожђа од концентрација а) етарског уља и б) хидролата етарског уља изолованих техником II

Табела 4.47 EC_{50} вредности етарског уља и хидролата плода црног бибера изолованих техником II добијене применом FIC теста

Узорак	**FIC (EC_{50}, mg/cm^3)**
	10 min инкубација
Етарско уље (проба I)	75,94 ± 1,425
Етарско уље (проба II)	26,29 ± 0,238
Етарско уље (проба III)	2,30 ± 0,049
Етарско уље (проба IV)	1,12 ± 0,023
Етарско уље (проба V)	6,77 ± 0,060
Хидролат (проба I)	0,97 ± 0,003
Хидролат (проба II)	1,11 ± 0,009
Хидролат (проба III)	0,69 ± 0,013
Хидролат (проба IV)	0,88 ± 0,009
Хидролат (проба V)	0,65 ± 0,002

Резултати FIC теста показују да способност хелирања Fe^{2+} јона етарских уља и хидролата црног бибера добијених техником II значајно зависи од редоследа дестилационих проба и пратећих промена у хемијском саставу. Етарско уље изоловано техником I/етарско уље из пробе I технике II је показало најнижу хелирајућу способност (EC_{50} = 75,94 mg/cm^3), док су етарска уља добијена техником II у наредним пробама хидродестилације показала знатно бољу FIC активност, при чему је најизраженија активност уочена код етарског уља из пробе IV (EC_{50} = 1,12 mg/cm^3), а затим код етарског уља из пробе III (EC_{50} = 2,30 mg/cm^3). Етарско уље добијено у петој проби хидродестилације показује нешто слабију хелирајућу активност (EC_{50} = 6,77 mg/cm^3), што се може приписати релативном порасту терпенских угљоводоника и делимичном исцрпљивању најактивнијих хелирајућих компонената током узастопних проба дестилације. Хидролати добијени техником II испољили су високу способност хелирања Fe^{2+} јона, са EC_{50} вредностима у уском интервалу од 0,65 mg/cm^3 до 1,11 mg/cm^3, при чему су најбољу активност показали хидролати из треће и пете пробе хидродестилације. Овако изражена активност у потпуности је у складу са њиховим високим садржајем оксигенованих монотерпена (*α*-терпинеол, борнеол, терпинен-4-ол, линалол), као и ароматичних једињења (Табела 4.42), која садрже хидроксилне, етарске и карбонилне функционалне групе способне за стабилно комплексирање Fe^{2+} јона. Са Слике 4.50 се види јасна зависност хелирајуће активности од концентрације свих узорака, при чему хидролати достижу добру хелирајућу способност већ при ниским

концентрацијама, за разлику од етарских уља која захтевају знатно веће концентрације за постизање упоредивог ефекта.

У поређењу са DPPH и ABTS тестовима, FIC анализа показује другачији редослед активности, што указује да механизам хелирања јона гвожђа није директно повезан са способношћу донирања водоника или електрона. Добијени резултати потврђују да модификована техника хидродестилације (техника II) не само да мења антиоксидативну активност етарских уља, већ значајно повећава њихов потенцијал као природних хелатора металних јона, при чему се хидролати издвајају као посебно вредан и до сада недовољно истражен нуспроизвод.

4.5.2.3.1.4 FRAP тест

Резултати FRAP теста показују јасне разлике у редукујућој способности између етарских уља и хидролата плода црног бибера, као и изражен утицај модификоване хидродестилације и редоследа проба (Табела 4.48).

Табела 4.48 FRAP вредности етарских уља и хидролата плода црног бибера изолованих техником II

Узорак	**FRAP вредности 30 min инкубација**
	mgEFe^{2+}/g етарског уља/хидролата
Етарско уље (проба I)	8,70 ± 0,47
Етарско уље (проба II)	11,36 ± 0,272
Етарско уље (проба III)	13,25 ± 0,272
Етарско уље (проба IV)	15,75 ± 0,471
Етарско уље (проба V)	16,30 ± 0,359
Хидролат (проба I)	40,39 ± 0,05
Хидролат (проба II)	51,74 ± 0,094
Хидролат (проба III)	55,89 ± 0,094
Хидролат (проба IV)	56,45 ± 0,094
Хидролат (проба V)	58,68 ± 0,303

Етарско уље добијено у проби I техником II испољило је најнижу редукујућу активност (8,70 mg EFe^{2+}/g етарског уља), док су етарска уља добијена техником II показала постепено повећање FRAP вредности од друге до пете пробе, при чему се највише вредности достижу етарским уљима из четврте (15,75 mg EFe^{2+}/g етарског уља) и пете пробе (16,30 mg EFe^{2+}/g етарског уља).

Знатно израженија редукујућа активност уочена је код хидролата, чије су FRAP вредности знатно више од вредности етарских уља. Хидролат из технике I/хидролат из прве пробе технике II показао је високу редукујућу моћ (40,39 mg EFe^{2+}/g хидролата), док хидролати добијени техником II у узастопним пробама хидродестилације показују јасан пораст FRAP активности од друге до пете пробе, достижући максималне вредности од 58,68 mg EFe^{2+}/g хидролата (Табела 4.48). Оваква активност је у потпуности у складу са повећањем садржаја оксигенованих монотерпена и ароматичних једињења (*α*-терпинеол, борнеол, терпинен-4-ол, линалол), која су способна да ефикасно учествују у реакцијама преноса електрона (Табела 4.42). Поређење са литературом показује да су подаци о FRAP активности етарског уља црног бибера ограничени и најчешће изражени као апсорбанца или релативна редукујућа моћ, без стандардизације у mg EFe^{2+}/g. Доступне студије указују на умерену редукујућу активност етарског уља плода црног бибера, што је у сагласности са нижим FRAP вредностима добијеним у овој дисертацији за етарска уља, у поређењу са хидролатима (Trifan et al., 2021). Стога, резултати ове дисертације представљају значајан допринос јер омогућавају квантитативно поређење редукујућег потенцијала између етарских уља, хидролата и њихових варијација насталих услед модификованог процеса дестилације.

На основу добијених резултата, FRAP тест потврђује да модификована техника хидродестилације (Техника II) не само да утиче на антиоксидативни профил добијених производа, већ доводи до значајног повећања редукујућег потенцијала, при чему се хидролати издвајају као функционално највреднија фракција система.

FRAP резултати показују јасне разлике у редукујућој способности у зависности од типа узорка и примењене технике. Етанолни екстракти (70% EtOH) испољили су највећу FRAP активност (63,72–67,82 mg EFe^{2+}/g, Табела 4.16), што је очекивано услед високог садржаја поларних фенолних једињења. Хидролати показују слабију активност у односу на екстракте, при чему су хидролати добијени техником II (до 58,68 mg EFe^{2+}/g хидролата) активнији од хидролата из технике I, што указује на ефекат кумулативног обогаћивања оксигенованим компонентама током неколико проба хидродестилације. Етарска уља и њихове фракције показују најнижу FRAP активност (2,99–8,70 mg EFe^{2+}/g, Табела 4.37), уз благ пораст активности етарских уља из каснијих проба технике II, што одговара већем садржају оксигенованих сесквитерпена. Приказани резултати (Табела 4.48) показују да етарска уља и хидролати добијени

техником II имају бољу FRAP активност у односу на етарско уље и хидролат из класичне хидродестилације.

4.5.2.3.1.5 Ферицијанидна метода

Етарска уља добијена техником II показују умерену редукујућу активност, при чему је уочено да етарска уља из појединих проба хидродестилације (из друге и пете пробе) достижу веће вредности у односу на етарско уље из технике I, што указује на повољније услове за присуство компонената способних за пренос електрона у модификованом поступку хидродестилације (Табела 4.49).

Табела 4.49 Редукциона способност етарских уља и хидролата изолованих техником II

Узорак	**RP (Fe^{3+} - Fe^{2+}) mg GK/g етарског уља одн. хидролата**
	20+30 min инкубација
Етарско уље (проба I)	7,26 ± 0,109
Етарско уље (проба II)	14,67 ± 0,109
Етарско уље (проба III)	6,93 ± 0,109
Етарско уље (проба IV)	12,49 ± 0,109
Етарско уље (проба V)	16,23 ± 0,063
Хидролат (проба I)	29,66 ± 0,120
Хидролат (проба II)	37,87 ± 0,139
Хидролат (проба III)	30,63 ± 0,073
Хидролат (проба IV)	25,91 ± 0,186
Хидролат (проба V)	37,27 ± 0,076

Етарска уља показују слабију редукујућу активност од хидролата (Табела 4.49) и етанолних екстраката (Табела 4.17). Хидролати показују знатно већу редукујућу активност од етарских уља, што указује на то да су у воденој фази присутне компоненте које ефикасно учествују у Fe^{3+}–Fe^{2+} редукционом процесу. Посебно је уочљиво да се код хидролата добијених техником II постижу стабилно високе вредности кроз већи број узастопних хидродестилација, што указује на кумулативни ефекат модификоване хидродестилације и рециклаже водене фазе.

Сагледано у целини, ферицијанидна метода јасно диференцира анализиране узорке према њиховој способности преноса електрона, при чему се издвајају хидролати и екстракти као функционално најактивнији изолати, док етарска уља, без обзира на технику изолације, показују ограничен редукујући потенцијал у односу на поларније системе.

Поређењем резултата ферицијанидне методе и FRAP теста за етарска уља из плода црног бибера уочава се сагласан редослед редукујуће активности, при чему у оба теста етарска уља изолована применом технике II показују веће вредности у односу на етарско уље из технике I. Иако FRAP тест даје јаснију диференцијацију између етарских уља из појединих проба, ферицијанидна метода потврђује исти тренд постепеног повећања редукујуће способности код етарских уља из појединих узастопних проба, што указује да модификована хидродестилација доводи до функционалног побољшања редукционог потенцијала етарских уља, без обзира на примену различитих тестова антиоксидативне активности.

4.5.2.3.2 Антимикробна активност

Резултати антимикробне активности етарских уља и хидролата изолованих техником II приказани су у Табелама 4.50 и 4.51.

Табела 4.50 Минималне инхибиторне (МИК) концентрације етарских уља и хидролата црног бибера изолованих техником II у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама

Бактерија/ гљива		*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја		Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Етарска уља (техника II)	I	25	25	1,56	1,56	25	25	6,25	3,125
	II	25	25	6,25	12,5	>25	>25	12,5	12,5
	III	25	25	6,25	25	>25	>25	12,5	6,25
	IV	25	25	6,25	12,5	>25	>25	12,5	6,25
	V	25	25	3,125	3,125	>25	>25	25	6,25
Хидролати (техника II)	I	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	II	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	III	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	IV	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	V	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
Антибиотик/ антимикотик, mg/cm^3		Хлорамфеникол		Ципрофлоксацин				Нистатин	
		0,006	0,003	0,00003125	0,0000625	0,0000078125	0,0000078125	0,004	0,004

Табела 4.51 Минималне микробицидне (ММК) концентрације етарских уља и хидролата плода црног бибера изолованих техником II у односу на референтне и изоловане сојеве микроорганизама

Бактерија/ гљива		*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја		Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Етарска уља (техника II)	I	>25	>25	25	25	>25	>25	1255	12,5
	II	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	25
	III	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	12,5
	IV	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	12,5
	V	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12,5
Хидролати (техника II)	I	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	II	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	III	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	IV	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15
	V	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15	>15

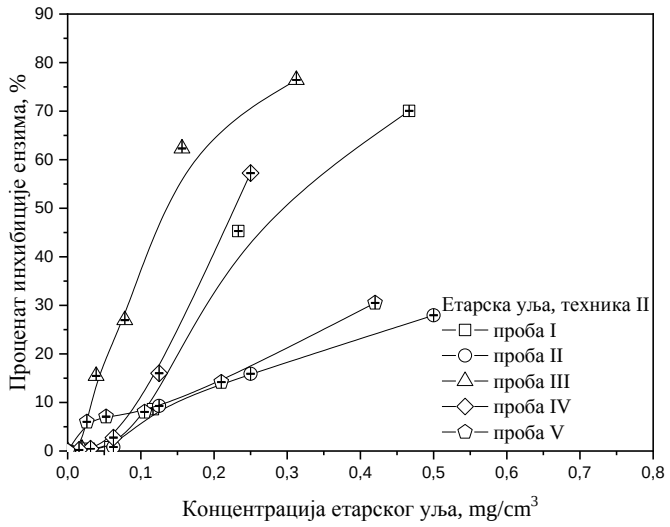
Добијени резултати показују да су етарска уља изолована техником II задржала активност у сличном спектру као и етарско уље изоловано техником I, али са нешто вишим МИК и ММК вредностима, што указује на благо смањење активности. Најниже МИК вредности су уочене према *Bacillus cereus* (1,56–6,25 mg/cm^3), док су Грам-негативни сојеви (*Escherichia coli, Salmonella*) били осетљивији тек при вишим концентрацијама етарских уља (12,5–>25 mg/cm^3). Етарска уља су показала јасну активност према *Candida albicans*, што се приписује деловању *β*-кариофилена, лимонена и сабинена, компонената које су у претходним студијама идентификоване као главни носиоци антимикробног дејства (Hien i Dao, 2022). Благо смањење активности етарских уља изолованих техником II у односу на технику I може се приписати разликама у условима дестилације које су вероватно довеле до делимичног губитка лакоиспарљивих монотерпена (попут сабинена и лимонена), чије је синергистичко дејство са сесквитерпенима познато као кључни фактор антимикробне активности (Rakmai et al., 2017).

Хидролати добијени техником II нису испољили антимикробну активност у анализираном опсегу концентрација (МИК >15 mg/cm^3), што је у потпуности у складу са резултатима добијеним за хидролат изолован техником I. Добијени резултати потврђују да тип и услови хидродестилације директно утичу на састав и антимикробни потенцијал етарских уља, док хидролати, иако садрже ароматичне и оксигеноване компоненте, немају значајну биолошку активност.

У поређењу са стандардним антибиотицима и антимикотицима (Табела 4.50), етарска уља добијена техником II показала су слабију, али и даље значајну биолошку активност. Иако не достижу ефикасност ципрофлоксацина, хлорамфеникола и нистатина, етарска уља су показала изражено дејство према *Bacillus cereus* и умерено фунгицидно деловање према *Candida albicans*, што је у складу са литературом за природна етарска уља богата *β*-кариофиленом и лимоненом (Nikolic et al., 2015; Hien i Dao, 2022).

4.5.2.3.3 Антихипергликемијска активност

На Слици 4.51 је представљена зависност процента инхибиције ензима *α*-глукозидазе од концентрације етарских уља црног бибера добијених техником II. Са Слике 4.51 се види да етарска уља из свих проба хидродестилације показују повећање инхибиторне активности са порастом концентрације узорака.



Слика 4.51 Степен инхибиције ензима *α*-глукозидазе у зависности од концентрације етарског уља плода црног бибера изолованог техником II

Највећу активност показује етарско уље добијено из треће пробе хидродестилације, са вредностима инхибиције које достижу око 80% при највишој концентрацији, док су етарска уља добијена из друге и четврте пробе умерено активна, а етарска уља добијена из прве и пете пробе испољавају најслабији ефекат. Ови резултати указују на варијације у антихипергликемијском потенцијалу етарских уља у зависности од њиховог састава, што се може довести у везу са различитим уделом

терпенских компоненти као што су *β*-кариофилен, лимонен и сабинен, који су познати инхибитори *α*-глукозидазе (El Omari et al., 2023; Güneş et al., 2026; Basak and Candan, 2013) .

EC_{50} вредности свих анализираних узорака приказане су у Табели 4.52.

Табела 4.52 EC_{50} вредности инхибиције ензима *α*-глукозидазе етарских уља и хидролата плода црног бибера (Техника II)

Узорци	**EC_{50}, mg/cm^3**
Етарско уље (проба I)	0,32 ± 0,00001
Етарско уље (проба II)	0,94 ± 0,0076
Етарско уље (проба III)	0,16 ± 0,0005
Етарско уље (проба IV)	0,23 ± 0,0003
Етарско уље (проба V)	0,69 ± 0,0014
Хидролат (проба I)	/
Хидролат (проба II)	/
Хидролат (проба III)	/
Хидролат (проба IV)	/
Хидролат (проба V)	/

На основу добијених резултата види се да етарска уља плода црног бибера добијена техником II инхибирају ензим *α*-глукозидазу при чему EC_{50} вредности варирају за узорке добијене различитим пробама хидродестилације (најнижа ~0,16 mg/cm^3 и највиша ~0,94 mg/cm^3).

Ове вредности показују да етарска уља добијена техником II показују антихипергликемијски потенцијал сличан оном из технике I (EC_{50}~0,32 mg/cm^3), што указује на утицај састава и концентрације терпенских компоненти на инхибицију ензима. У прилог значају антихипергликемијских анализа код црног бибера, етанолни екстракти плода црног бибера су такође показали способност *in vitro* инхибирања *α*-глукозидазе, са EC_{50} вредностима у опсегу ~5–6 mg/cm^3 зависно од методе екстракције, што се приписује присуству алкалоида као што је пиперин (Milenković et al., 2023).

4.5.2.3.4 Антиинфламаторна активност

С обзиром на то да се и код етарских уља добијених техником II ради о липофилним смешама сличног састава као у техници I, метод BSA денатурације није примењен ни у овом случају.

4.6 Изолација и карактеризација пиперина из плода црног бибера

Након анализе етанолних екстраката, олеорезина, „масног уља" и етарских уља, посебан део ове докторске дисертације био је посвећен изолацији пиперина, главног алкалоида црног бибера, који представља кључну биоактивну компоненту биљке. Пиперин је једињење амидне структуре, неполарно и слабо растворљиво у води, али добро растворљиво у органским растварачима, посебно у концентрованом етанолу и етанолним смешама. Из тог разлога, за његову изолацију је примењен 96% етанол као ефикасан растварач који омогућава добру екстракцију уз минималну коекстракцију поларних примеса. Циљ ове фазе био је добијање чистог пиперина као засебног производа погодног за даљу карактеризацију и припрему инклузионих комплекса са циклодекстринима, у циљу побољшања његове растворљивости, стабилности и потенцијала за примену у фармацеутским формулацијама.

4.6.1 Изолација пиперина

Избор 96%-ног етанола за изолацију пиперина и олеорезина из бибера заснован је на његовим доказаним предностима у литератури, укључујући високу селективност према липофилним компонентама попут пиперина и способност да смањи ко-екстракцију поларних нечистоћа, што осигурава већу чистоћу екстракта (Wood et al., 1988). Употреба 96%-ног етанола омогућава оптимизацију дифузије и кинетике екстракције, јер висок садржај етанола смањује енергију потребну за ослобађање пиперина из ћелијских структура биљке, што је потврђено кроз математичке моделе дифузије и екстракционе процесе (Mustikaningrum et al., 2023). Овај растварач се често користи у стандардним протоколима због своје доступности, сигурности у руковању и једноставности уклањања путем испаравања, што додатно доприноси ефикасности и економичности процеса. Његова способност да селективно раствори биоактивне компоненте попут пиперина осигурава висок квалитет крајњег екстракта, чиме се

обезбеђује његова употреба у фармацеутској и прехрамбеној индустрији (Kapoor et al., 2009). Ове карактеристике, потврђене кроз бројне студије, чине 96%-ни етанол универзалним избором за изолацију пиперина и олеорезина из бибера, омогућавајући високу чистоћу, ефикасност и репродуктивност резултата (Le et al., 2024).

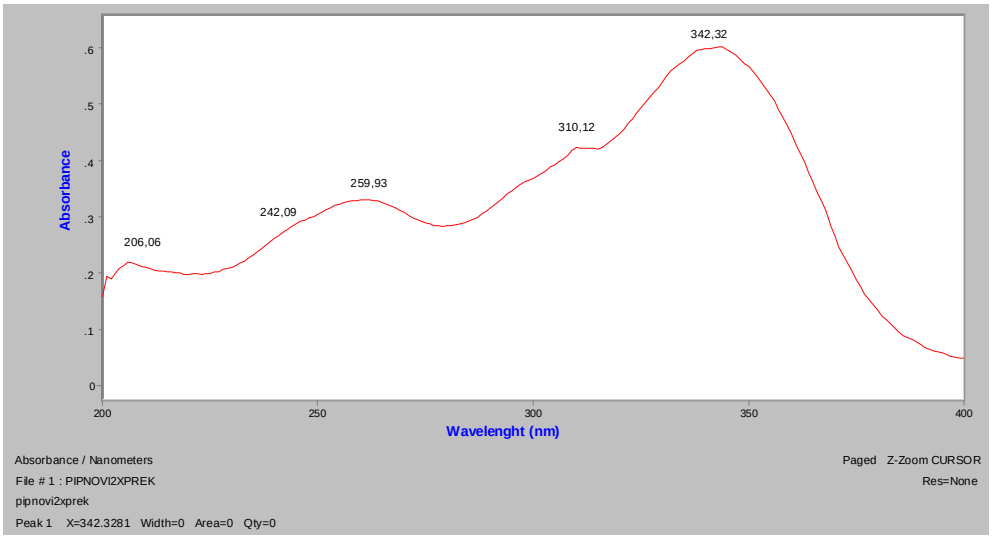
Садржај пиперина у плоду црног бибера креће се најчешће од 2-7,4% (Ravindran, 2003; Peter, 2006; Parthasarathy et al., 2008), мада у неким случајевима овај садржај достиже и 9% (Gaikar and Raman 2002; Agarwal, 2010). Принос изолованог пиперина из плода бибера у овој дисертацији износи 1,8 g/100 g б.м. одн. 1,8%. Екстракција пиперина из плода црног бибера може дати различите резултате у зависности од методе и растварача који се користе. Наравно, не треба занемарити ни утицај климатских фактора, начина узгајања, обраде биљног материјала, као и само место гајења биљке, на садржај пиперина (Peter, 2006).

Zarai и сарадници (2013) су традиционалном екстракцијом уз рефлукс, применом растварача различите поларности (хлороформ, етил ацетат, етанол, метанол и вода), највећи принос добили етанолом (3,78%). Такође, савременији приступ изолацији пиперина обухватао је најпре екстракцију потпомогнуту микроталасима, а затим ултразвучну екстракцију етанолом, при чему је принос пиперина достигао 46,60 mg/g (Gorgani et al., 2017). Модификовном Soxhlet екстракцијом, са дуплим сифонирањем (енг. *Double Bypasses Sidearm Soxhlet Apparatus - DBSA*) добија се принос пиперина од 3,9% након 12 сати, али са великом потрошњом растварача, у овом случају метанола (Subramanian et al., 2016). Употреба природних еутектичких растварача (енг. *Natural Deep Eutectic Sovents - NADES*) представља обећавајућу „зелену" алтернативу за екстракцију пиперина (Lwamba et al., 2023). Суперкритична екстракција угљен-диоксидом (SC-CO_2) истиче се као једна од најефикаснијих метода, која користи висок притисак (300 bar) и температуру (60 °C) за добијање приноса пиперина до 48% у олеорезину, док се додатком ензима попут α-амилазе постиже додатно побољшање (Dutta and Bhattacharjee, 2015).

Избор методе екстракције и растварача је кључан за максимизирање приноса пиперина, при чему мацерација и модерне технике попут микроталасне екстракције показују посебно повољне резултате.

4.6.1.1 UV–Vis анализа пиперина

UV-Vis спектар пиперина (Слика 4.52) показује три главне апсорпционе траке, при чему је најјача трака на 342–344 nm. Прати је затим мањи пик на око 300–310 nm који показује фину вибрациону структуру, док је трећа трака још слабијег интензитета апсорпције између 230 и 270 nm.



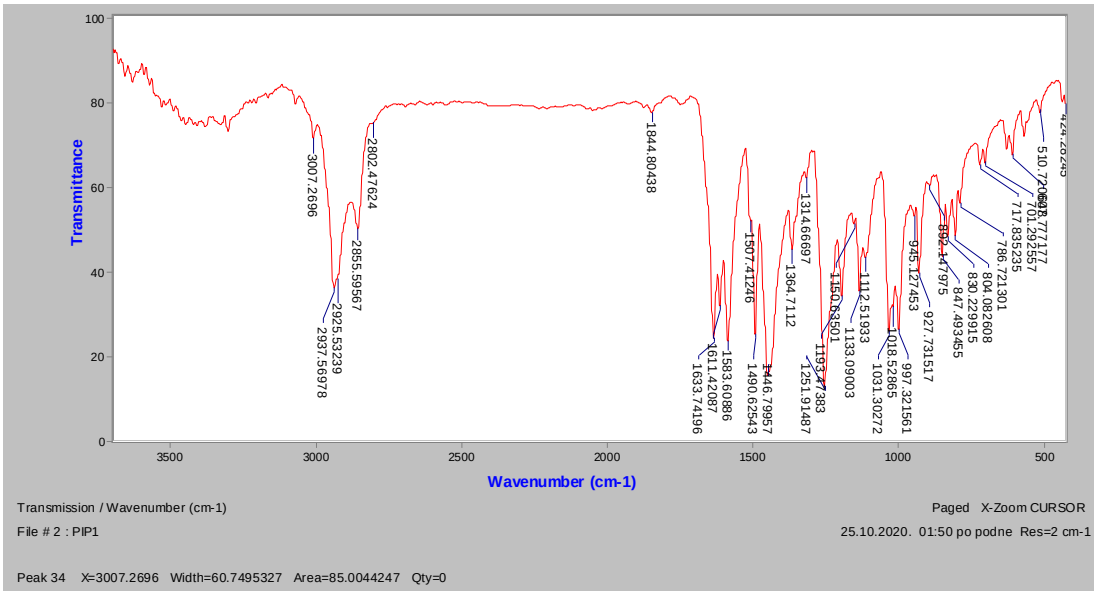
Слика 4.52 UV-Vis спектар изолованог пиперина

Молекул пиперина се може посматрати као агрегат две посебне хромофорне групе које су електронски конјуговане, а то су метилендиоксибензен и оксопентадиенил. Ове две хромофоре не делују одвојено већ као заједнички конјугован π-систем у коме је π–π* прелаз задужен за најизраженију траку у спектру. Интензитет ове траке показује да је π–π* прелаз дозвољен електронски дипол, односно прелазни диполни момент лежи у равни молекула и оријентисан је око дуже осе молекула пиперина. Врх на таласним дужинама од 206,0 nm и 259,93 nm потиче од присуства бензена у молекулу пиперина, док траке на таласним дужинама 310 nm и 342 nm потичу од конјугације карбонилне групе са диеном везаним за бензен и метилендиокси супституенте у мета и пара положају (ефекат резонанције) (Bahri et al., 2019).

4.6.1.2 FT-IR анализа пиперина

Ова метода омогућава идентификацију карактеристичних функционалних група на основу специфичних апсорпционих трака у инфрацрвеном подручју, а посебно је

погодна за разликовање амидних, карбонилних и ароматичних фрагмената који су типични за молекул пиперина. FT-IR анализа је спроведена у циљу потврде присуства амидне везе и конјугованог система који обухвата карбонилну групу, диенску јединицу и ароматични прстен овог алкалоида. Добијени спектар (Слика 4.53) је потом упоређен са литературним подацима за чист пиперин, ради потврде да изоловано једињење заиста одговара очекиваној структури. Апсорпционе траке изолованог пиперина дате су у Табели 4.53.



Слика 4.53 FT-IR спектар изолованог и пречишћеног пиперина (Грамs програм)

Табела 4.53 Апсорпционе траке изолованог пиперина

Таласни број (cm^{-1})	**Тип апсорпционе траке**
3007,27	Ароматична C–H истезања
2937,57; 2925,53; 2855,57	Алифатична (симетрична и асиметрична) CH_2 истезања метилендиокси групе; C–H истезања
1633,74	C=O–N– истезање
1611,42; 1583,60; 1507,41; 1490,62	Ароматично истезање C=C (бензенов прстен)
1633,74; 1611,42	C=C истезање дијена (асиметрично и симетрично)
1446,79	CH_2 савијање метилендиокси групе
1251,91; 1193,47	Асиметрично истезање =C–O–C
1031,30	Симетрично истезање =C–O–C
927,73	–C–O истезање
1133,09	Савијање C–H везе фенилне групе у равни
997,32	C–H савијање *trans* –CH=CH– везе

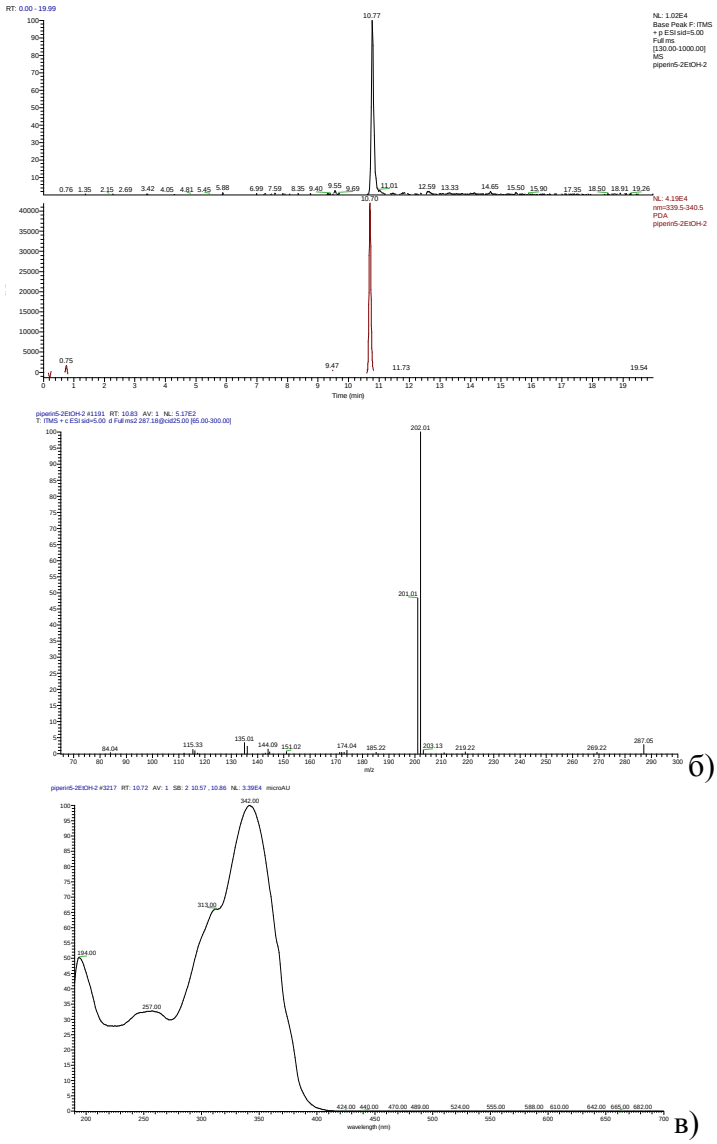
Наставак Табеле 4.53

847,49; 830,22; 804,08	–C–H савијање ван равни 1,2,4-трисупституисане фенил групе (два суседна атома водоника)

Присуство ових трака потврђује стабилност амидне и ароматичне структуре након изолације, без појаве деградационих производа. Ови резултати су у потпуности у сагласности са подацима из литературе, где су сличне FT-IR карактеристике пиперина у области 1630–1620 cm^{-1} (C=O), 1600–1500 cm^{-1} (C=C), и 1250–1020 cm^{-1} (=C–O–C) (Srivastava et al., 2024), као и у новијим радовима о FT-IR анализи биљних једињења (Mayuresh and Madhura, 2025).

4.6.1.3 UHPLC-DAD-MS/MS анализа пиперина

Хроматограм изолованог пиперина снимљен на 340 nm (UHPLC-DAD хроматограм, Слика 4.54) показује један доминантан, узак и симетричан пик са временом задржавања 10,77 min, што може указивати на високу чистоћу изолованог једињења. Одсуство додатних пикова у околини главног пика потврђује да је процес изолације био ефикасан и да није дошло до коекстракције сродних амидних деривата као што су изокавицин, пиперолеин или пиперетин, који се иначе јављају у екстрактима црног бибера, у траговима (Srivastava et al., 2024).



Слика 4.54 UHPLC хроматограми пиперина: а) DAD детекција на 340 nm и MS-детекција (по базном пику), б) MS/MS и в) UV-Vis спектри изолованог пиперина

Масени хроматограм (Слика 4.54 б) показује карактеристичан молекулски јон на *m/z* = 286,01 [M^+], што одговара молекулској формули пиперина ($C_{17}H_{19}NO_3$, M = 285,33 g/mol). Фрагментациони јон на *m/z* = 201,01 представља најинтензивнији фрагмент (базни пик) и настаје услед цепања амидне везе и губитка фрагмента – $C_5H_9NO_2$, што је у складу са познатим LC–MS/MS понашањем пиперина (Kozukue et al., 2007). Добијени спектар потпуно се поклапа са литературним подацима за чист пиперин добијен из природних извора (Liang et al., 2021). UV-Vis спектар истог пика (Слика 4.54 в) показује максимум апсорпције на 342,0 nm, уз мање траке на 310 nm и 254 nm, што је типично за π–π* прелазе у конјугованом систему бензен–диен–карбонил. Ови резултати потврђују електронску структуру пиперина и потпуно се

слажу са литературним UV-Vis подацима (Singh et al., 2011). Комбиновани резултати UHPLC-DAD-MS/MS и UV-Vis анализа јасно потврђују да изоловано једињење одговара чистом пиперину, без присуства других пиперидамида или деградационих производа. Идентичност пика, вредности m/z = 286 $[M]^+$ и спектрални максимум на 342 nm представљају карактеристичан „молекулски отисак“ пиперина, што потврђује да је примењени поступак изолације и пречишћавања био успешан.

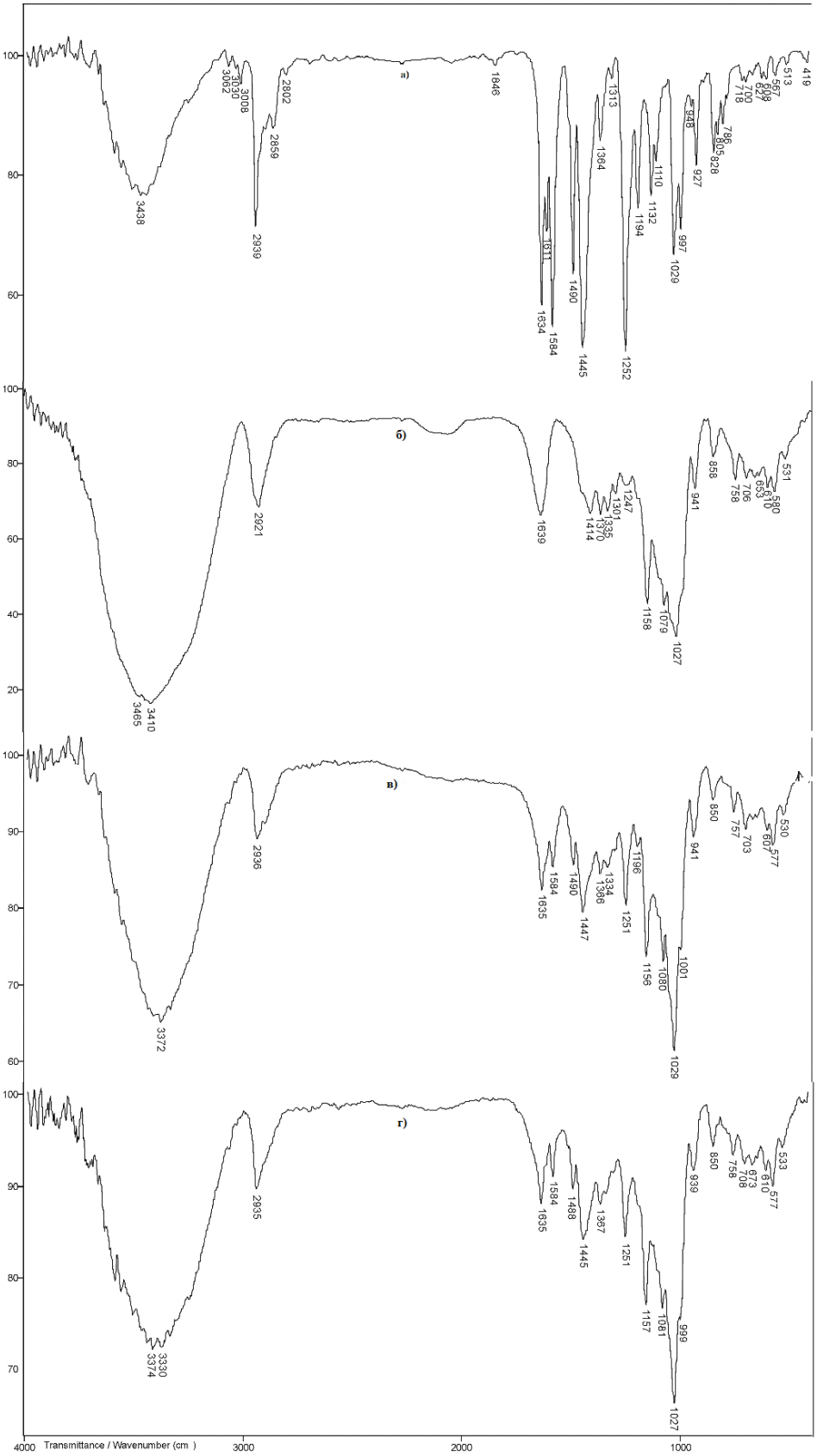
4.6.2 Припрема инклузионих комплекса и физичких смеша са пиперином

Након изолације, идентификације и структурне карактеризације пиперина, приступило се проучавању његове способности да формира инклузионе комплексе са циклодекстринима, у циљу побољшања његове растворљивости, стабилности и биорасположивости. Пиперин, као липофилно једињење са ограниченом растворљивошћу у води, представља погодан гост-молекул за инкапсулацију у шупљину циклодекстрина. За истраживања су коришћена два типа молекула: *β*-циклодекстрин (*β*-CD) и његов дериват 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрин (HP-*β*-CD), које одликују различити степени поларности и величина шупљине. Циљ је био да се испита утицај структуре циклодекстрина на ефикасност формирања инклузионог комплекса са пиперином и да се добијени комплекси карактеришу различитим аналитичким техникама (FT-IR, UV-Vis, DSC, XRD, HPLC).

4.6.2.1 FT-IR анализа инклузионих комплекса и физичких смеша

Формирање инклузионих комплекса између активне компоненте и циклодекстрина је процес који укључује хемијске интеракције типа водоничних веза и/или хидрофобне интеракције између функционалних група активне супстанце и расположивих група молекула домаћина (Quilaqueo et al., 2019). У FT-IR спектрима инклузионих комплекса запажа се оваква интеракција као померање, проширење или нестанак појединих карактеристичних трака активне компоненте и циклодекстрина.

На Слици 4.55 приказани су FT-IR спектри пиперина, *β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD и њихове физичке смеше.



Слика 4.55 FT-IR спектри: а) пиперина, б) *β*-циклодекстрина, в) инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD и г) физичке смеше

У FT-IR спектру пиперина (Слика 4.55 а) уочава се јака трака на 1584 cm^{-1}, која потиче од валенционих вибрација C=C везе из фенилног језгра (Schulz et al., 2004), док C–H деформационе вибрације из фенилне групе дају траку на 1110 cm^{-1}. Такође, у спектру се уочавају две траке на 1252 cm^{-1} и 1029 cm^{-1}, од асиметричних и симетричних валенционих вибрација из винил-фенилетарског дела структуре (=C–O–C). Амидна трака I од валенционих C=O вибрација из дела структуре O=C–N јавља се на 1634 cm^{-1}. Конјуговани диенски део структуре у пиперину у FT-IR спектру даје траке слабог интензитета које потичу од валенционих C–H вибрација у области од 3100–3000 cm^{-1}. У овој области падају и траке од C–H валенционих вибрација из CH_2 групе (ν_sCH 2859 cm^{-1} и ν_{as}CH 2939 cm^{-1}). Деформационе вибрације C–H везе из CH_2 групе дају траку јаког интензитета на 1445 cm^{-1}.

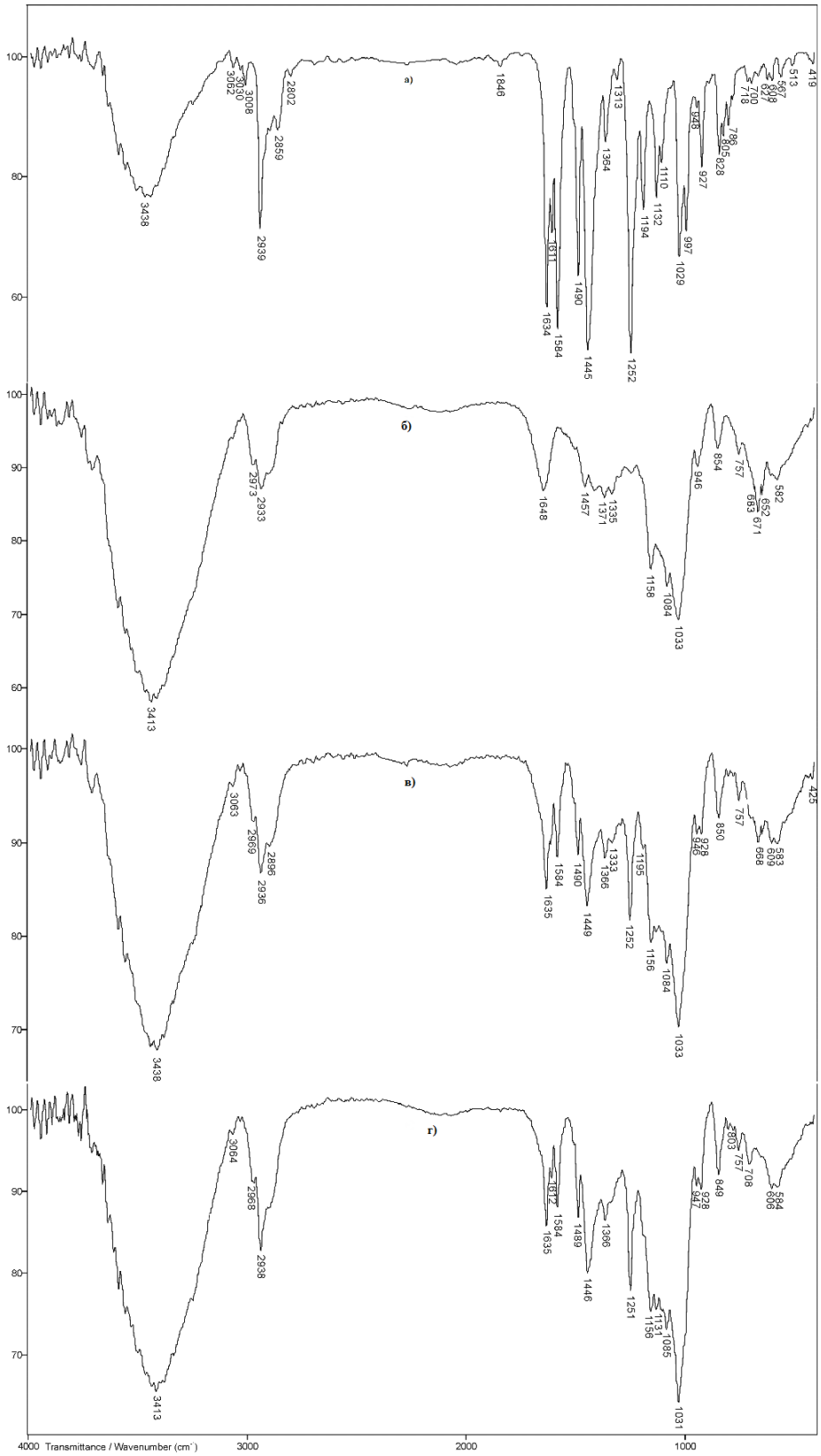
У FT-IR спектру *β*-CD (Слика 4.55 б) запажа се широка интензивна трака у области од 3600–3000 cm^{-1} са максимумом на 3410 cm^{-1}, која је резултат валенционих OH вибрација. На 2921 cm^{-1} се налази трака која потиче од валенционих C–H вибрација CH_2 групе и CHOH групе. Деформационе *δ*(C–H) вибрације ових група дају траке у области од 1400–1200 cm^{-1}, а у истој области се очекују и траке деформационих *δ*(O–H) вибрација CHOH групе. У области од 1200–1000 cm^{-1} јавља се комплексна трака са више максимума: 1158 cm^{-1}, 1079 cm^{-1} и 1027 cm^{-1}, која представља куповану вибрацију која укључује CO, COC, CCO и CCC асиметричне валенционе вибрације. Деформационе вибрације ових група дају траке у области таласних бројева 1000–700 cm^{-1}. На основу изгледа FT-IR спектра у овој области може се одредити конформација глукопиранозне јединице. У спектру су присутне траке на 941 cm^{-1} и 858 cm^{-1}, које су карактеристичне за C1 столичасту конформацију (Nikolić, 2003), па се може закључити да су и овде глукопиранозне јединице у тој конформацији.

У FT-IR спектру инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD (Слика 4.55 в), центроид комплексне траке у области валенционих νOH вибрација је померен за 38 јединица ка нижим вредностима таласних бројева у односу на положај ове траке у спектру *β*-CD. Ово померање указује на интеракцију примарних OH група *β*-CD као протон-донора и C=O групе из пиперина као протон-акцептора, чија трака се помера за 1 јединицу ка вишим вредностима таласних бројева и јавља се на 1635 cm^{-1} у спектру инклузионог комплекса. Валенционе вибрације из COH дела структуре (νCO) у спектру *β*-CD дају траку на 1027 cm^{-1}, а у комплексу је ова трака померена за 2 јединице и налази се на 1029 cm^{-1}, што указује на интеракцију OH група из *β*-CD са пиперином, што није примећено у FT-IR спектру физичке смеше (Слика 4.55 г). Трака на 1158 cm^{-1} од νCOC

глукозидне везе у *β*-CD је померена у комплексу за 2 јединице ка мањим вредностима таласних бројева и јавља се на 1156 cm^{-1}. Такође су запажена померања валенционих вибрација CH везе из CH_2 група, које се у комплексу јављају на 2936 cm^{-1}, а померене су за 15 јединица у односу на положај у спектру *β*-CD (2921 cm^{-1}). Поређењем FT-IR спектара комплекса и пиперина уочавају се дискретна померања траке на 1634 cm^{-1}, која се у комплексу налази на 1635 cm^{-1}. Такође, у комплексу је трака од валенционих асиметричних вибрација фенилалкил-етарске групе (C=C–O–C) из пиперина померена за 1 јединицу ка нижим вредностима таласних бројева и јавља се на 1251 cm^{-1}. Деформационе вибрације CH везе које дају траку на 1445 cm^{-1} у спектру пиперина померене су за 2 јединице у комплексу ка већим вредностима таласних бројева (1447 cm^{-1}), а у односу на *β*-CD (1414 cm^{-1}) за 30 јединица.

Разлике у изгледу FT-IR спектра инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD у односу на FT-IR спектре активне супстанце и циклодекстрина, као и у односу на FT-IR спектар физичке смеше, показују да је дошло до инкорпорације пиперина у шупљине *β*-циклодекстрина и формирања инклузионог комплекса.

На Слици 4.56 приказани су FT-IR спектри пиперина, 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD и њихове физичке смеше.



Слика 4.56 FT-IR спектри: а) пиперина, б) 2-хидроксипропил-β-циклодекстрина, в) инклузионог комплекса пиперин:HP-β-CD и г) физичке смеше

FT-IR спектар 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина (Слика 4.56 б) карактерише широка, интензивна трака са максимумом на 3413 cm^{-1}, која потиче од валенционих вибрација ОН групе, ν(ОН). У опсегу таласних бројева од 2970–2930 cm^{-1} очекује се трака од валенционих С–Н вибрација и она се у спектру 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина јавља на 2933 cm^{-1}. Асиметричне и симетричне С–Н деформационе вибрације у равни дају траке на 1457 cm^{-1} и 1371 cm^{-1}, редом (Nikolić et al., 2023). Комплексна трака у области 1200–1000 cm^{-1} са максимумима на 1158 cm^{-1}, 1084 cm^{-1} и 1033 cm^{-1} потиче од куплованих валенционих вибрација СО, СОС, ССО и ССС веза. Деформационе вибрације ових група дају траке у области таласних бројева 1000–700 cm^{-1}. Траке на 946 cm^{-1} и 854 cm^{-1} потврђују столичасту конформацију C_1 глукопиранозне јединице.

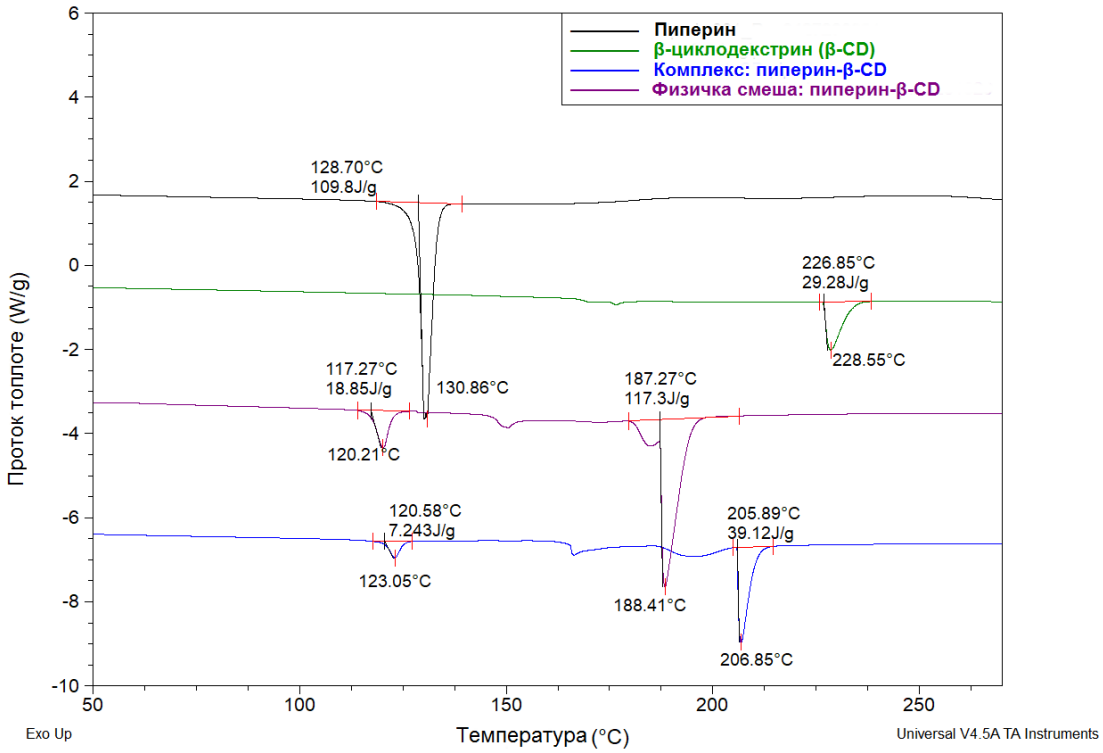
У FT-IR спектру инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD (Слика 4.56 в) центроид комплексне траке у области валенционих νОН вибрација померен је за 25 јединица ка вишим вредностима таласних бројева у односу на траку у FT-IR спектру 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина и налази се на 3438 cm^{-1}. Ово померање указује на интеракцију примарних ОН група 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина са одговарајућим групама пиперина. Трака која потиче од валенционих вибрација С–Н везе померена је за 3 јединице ка вишим вредностима таласних бројева (2936 cm^{-1}). Трака на 1158 cm^{-1} од νСОС глукозидне везе у 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстину померена је у комплексу за 2 јединице ка мањим вредностима таласних бројева и јавља се на 1156 cm^{-1}.

Поређењем FT-IR спектара комплекса и пиперина уочавају се дискретна померања траке на 1634 cm^{-1}, која се у комплексу налази на 1635 cm^{-1}. Деформационе вибрације С–Н везе које дају траку на 1445 cm^{-1} у спектру пиперина померене су за 4 јединице у комплексу ка већим вредностима таласних бројева (1449 cm^{-1}). Трака која потиче од асиметричних С–Н валенционих вибрација из CH_2 групе померена је за 3 јединице ка нижим вредностима таласних бројева у односу на положај у FT-IR спектру пиперина (ν_{as}CH 2939 cm^{-1}), док је трака од симетричних вибрација померена за 37 јединица ка вишим вредностима таласних бројева у односу на спектар пиперина (ν_sCH 2859 cm^{-1}). Смањење интензитета карактеристичних трака, као и померање максимума трака ка нижим или вишим вредностима таласних бројева, показује да је дошло до инкорпорације пиперина у шупљине 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина и формирања инклузионог комплекса.

4.6.2.2 DSC анализа инклузионих комплекса и физичких смеша

DSC анализа је примењена ради потврде формирања инклузионих комплекса пиперина са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином. Ова метода омогућава уочавање промена у термалном понашању компоненти, где нестанак или померање карактеристичних ендотермних пикова пиперина, као и појава нових термалних ефеката, указују на интеракције између молекула госта и домаћина и на формирање стабилних комплекса (Quilaqueo et al., 2019).

На Слици 4.57 приказани су DSC термограми пиперина, *β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:*β*-циклодекстрин (пиперин:*β*-CD) и њихове физичке смеше.

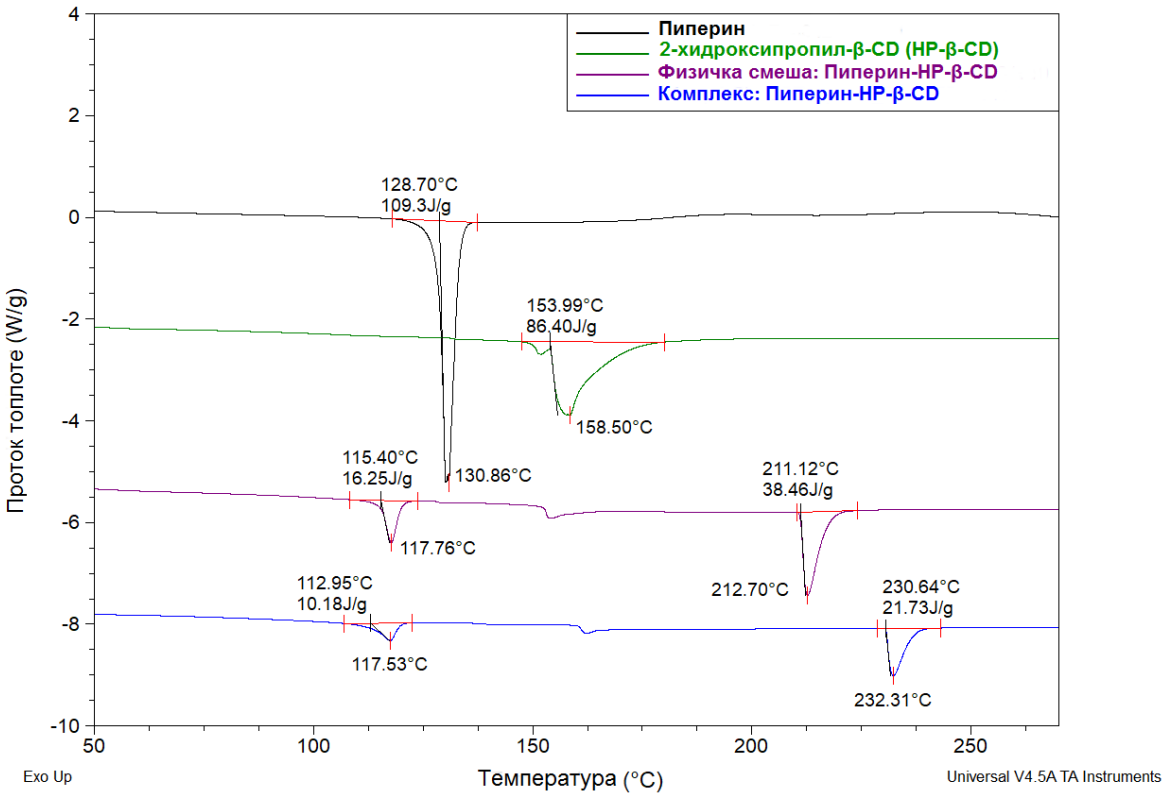


Слика 4.57 DSC термограми пиперина, *β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD и одговарајуће физичке смеше

DSC термограм инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD показује термалне промене које се разликују од термалних промена молекула пиперина и *β*-циклодекстрина. На DSC термограму пиперина уочава се оштар ендотермни пик са максимумом на 130,86 °C, који указује на кристалну структуру пиперина, а одговара

његовој температури топљења (Ezawa et al., 2016). DSC термограм *β*-циклодекстрина садржи пик мањег интензитета са максимумом на 228,55 °C. Пикови на 123,05 °C и 206,85 °C у DSC термограму инклузионог комплекса не одговарају термалним променама пиперина и *β*-циклодекстрина, што указује на настанак нових структура са другачијим режимом температурних промена. Поред тога, може се уочити да долази и до значајног смањења енталпије топљења пиперина, са 109,8 J/g на 7,243 J/g у инклузионом комплексу, што такође потврђује настајање нових супрамолекулских структура.

На Слици 4.58 приказани су DSC термограми пиперина, 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрин (пиперин:HP-*β*-CD) и њихове физичке смеше.



Слика 4.58 DSC термограми пиперина, 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD и одговарајуће физичке смеше

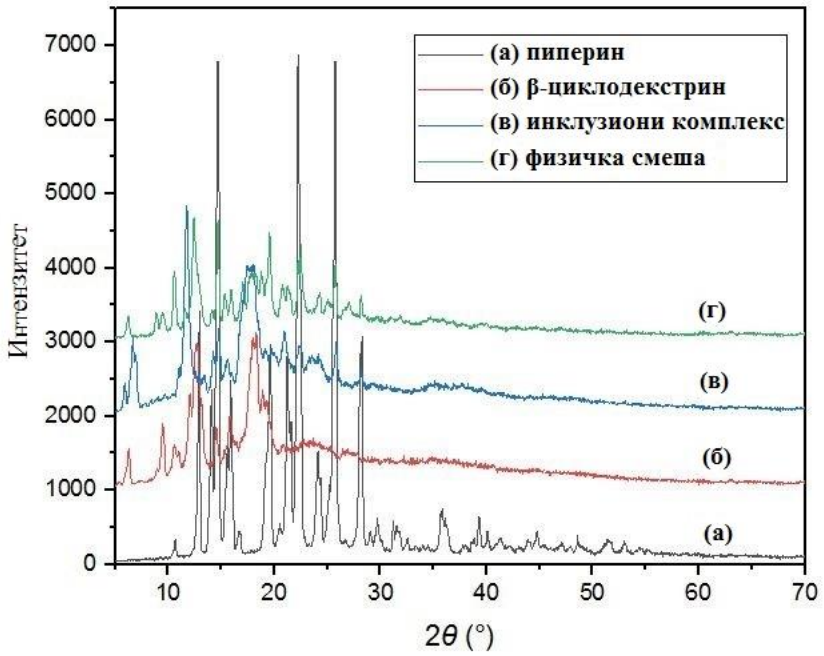
DSC термограм инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD показује термалне промене које се разликују од термалних промена молекула пиперина и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина. DSC термограм 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина садржи широк пик мањег интензитета са максимумом на 158,50 °C.

Пикови на 117,53 °C и 232,31 °C у DSC термограму инклузионог комплекса не одговарају термалним променама молекула домаћина и молекула госта. У прилог овој констатацији иде и смањење енталпије топљења пиперина са 109,8 J/g на 10,18 J/g у инклузионом комплексу, што указује на настанак нових супрамолекулских структура са другачијим режимом температурних промена.

4.6.2.3 XRD анализа инклузионих комплекса и физичких смеша

XRD анализа је спроведена у циљу одређивања структурних промена и степена кристалности пиперина након формирања инклузионих комплекса са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином.

На дифрактограму пиперина (Слика 4.59 а) уочава се неколико изражених пикова јаког интензитета на вредностима дифракционих углова 2θ 14,66°, 22,22° и 25,73°, који заједно са пиковима средњег интензитета на 2θ 12,95°, 15,89°, 19,61°, 21,2° и 28,25° указују на кристалну структуру пиперина, што је у складу са резултатима других аутора (Zaini et al., 2020). Резултати XRD анализе такође упућују на полиморфни облик I пиперина, његов комерцијално доступни, термодинамички најстабилнији облик са најмањом брзином растварања (Pfund et al., 2015).



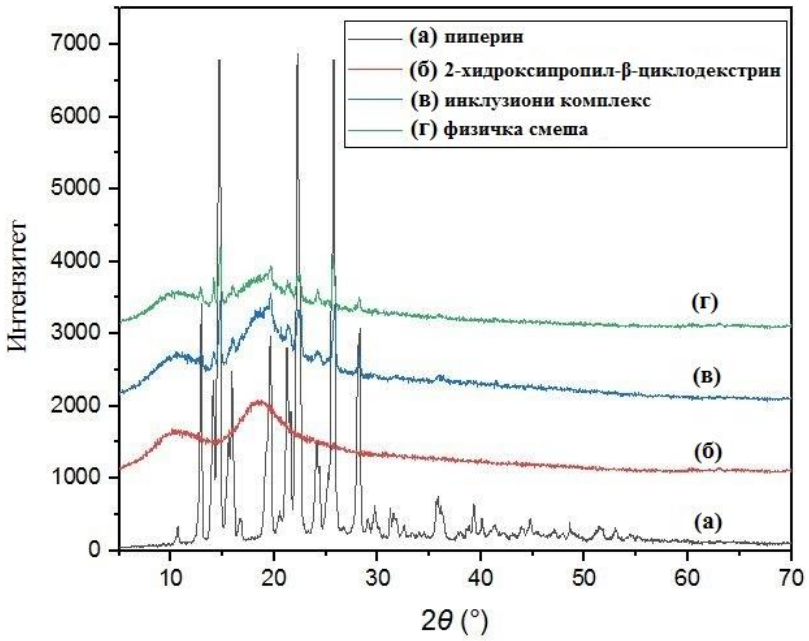
Слика 4.59 XRD дифрактограми: (а) пиперина, (б) 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, (в) инклузионог комплекса пиперин:*β*-циклодекстрин и (г) физичка смеша одговарајуће физичке смеше

Дифрактограм инклузионог комплекса се разликује од дифрактограма пиперина и *β*-циклодекстрина. У дифрактограму инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD (Слика 4.59 в) уочава се појава нових пикова на вредностима дифракционих углова 2θ 5,87°, 6,65°, 11,75° и 17,45°, којих нема у дифрактограму физичке смеше (Слика 4.59 г), као ни у дифрактограмима чистих супстанци. Поред тога, интензитет пикова који потичу од пиперина је вишеструко смањен, што упућује на инклузију пиперина у шупљину *β*-циклодекстрина и у складу је са претходним анализама. За разлику од дифрактограма инклузионог комплекса, у дифрактограму физичке смеше се уочавају пикови из пиперина и *β*-циклодекстрина, тако да у физичкој смеши није постигнута инклузија.

На Слици 4.60 приказани су XRD дифрактограми пиперина, 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD и физичке смеше.

Ја бих овде ставила Слику 4.60

У дифрактограму 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина (Слика 4.60 б) присутна су два широка пика, слабијег интензитета у интервалу 2θ 8–20°. Одсуство оштрих пикова у дифрактограму 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина указује на његову аморфну структуру. У дифрактограму инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD (Слика 4.60 в) уочавају се поједини пикови који потичу од пиперина, али је њихов интензитет значајно смањен, што показује да је само део молекула пиперина инкорпориран у шупљину циклодекстрина. Ово је у сагласности са резултатима других аутора који су такође применили методу гњечења за израду инклузионог комплекса пиперина са 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином (Stasiłowicz et al., 2021). У дифрактограму физичке смеше (Слика 4.60 г) постоје пикови и од пиперина и од 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, што указује да није дошло до инклузије пиперина у шупљину молекула домаћина.

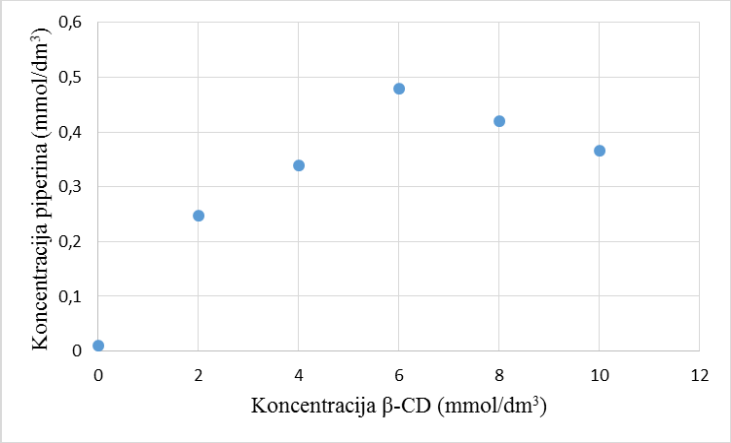


Слика 4.60 XRD дифрактограми: (а) пиперина, (б) 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, (в) инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD и (г) одговарајуће физичке смеше

4.6.2.4 Анализа фазне растворљивости

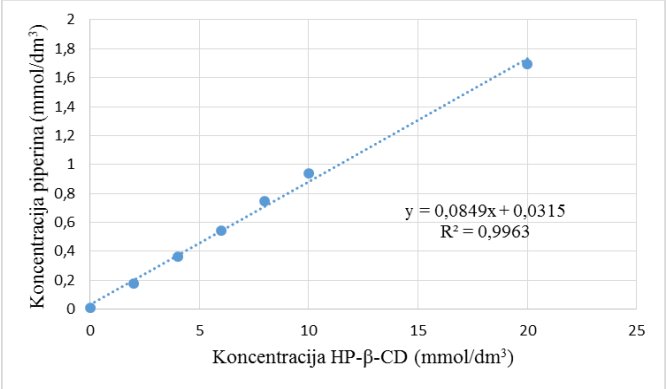
Да би се експериментално потврдио утицај формирања инклузионих комплекса на повећање растворљивости пиперина, анализирана је његова апсолутна растворљивост у води и у присуству *β*-циклодекстрина и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина. Побољшање растворљивости један је од најзначајнијих ефеката инклузије у циклодекстринима, јер уношење хидрофобних молекула у поларну шупљину циклодекстрина доводи до формирања термодинамички стабилних комплекса који повећавају укупну концентрацију растворене супстанце у воденој фази.

Дијаграми фазне растворљивости пиперина у присуству *β*-циклодекстрина и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина приказани су на Сликама 4.61 и 4.62, редом.



Слика 4.61 Дијаграм фазне растворљивости пиперина у присуству *β*-циклодекстрина

Приказани дијаграм фазне растворљивости (Слика 4.61) припада BS типу (Higuchi i Connors, 1965), што је у сагласности са резултатима других аутора (Christoforides et al., 2022), при чему растворљивост пиперина у присуству *β*-циклодекстрина иницијално расте (до концентрације *β*-циклодекстрина од 6 mmol/dm³), а затим опада (до анализиране концентрације *β*-циклодекстрина од 10 mmol/dm³), што указује на настанак инклузионог комплекса ограничене растворљивости.



Слика 4.62 Дијаграм фазне растворљивости пиперина у присуству 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина

Са друге стране, растворљивост пиперина се линеарно повећава са порастом концентрације 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина у раствору (Слика 4.62). Приказани дијаграм фазне растворљивости припада AL типу, што имплицира да је молски однос пиперина и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина у инклузионом комплексу 1:1, при чему је формирани инклузиони комплекс растворљив у води (Higuchi and Connors, 1965), што је у сагласности са резултатима других аутора

(Christoforides et al., 2022). Резултати анализе фазне растворљивости пиперина у присуству различитих циклодекстрина су сумирани у Табели 4.54.

Табела 4.54 Параметри добијени анализом фазне растворљивости пиперина присуству циклодекстрина на собној температури

Комплекс	**Тип**	**Једначина праве**	**R^2**	**Константа стабилности (dm^3/mmol)**	**Ефикасност солубилизације***
Пиперин:*β*-CD	B_S	y=0,0748x+0,0443 (за линеарни део)	0,9631	7,93	46,91
Пиперин:HP-*β*-CD	A_L	y=0,0849x+0,0315	0,9963	9,09	165,85

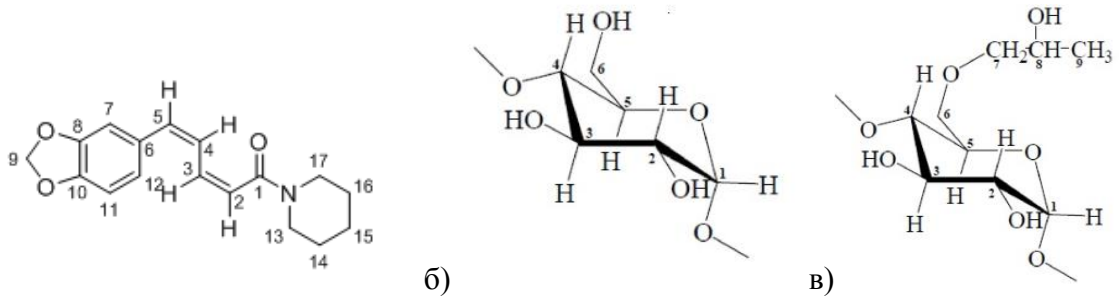
*Однос између растворљивости пиперина у присуству највеће концентрације циклодекстрина (6 mmol/dm³ *β*-циклодекстрина, односно 20 mmol/dm³ 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина) и растворљивости чистог пиперина

На основу вредности одређених константи стабилности за оба припремљена комплекса (Табела 4.54), може се закључити да је комплекс пиперин:2-HP-*β*-CD стабилнији од комплекса пиперин:*β*-CD, при чему је способност комплексирања 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина за пиперин већа. Поред тога, могуће је израчунати и ефикасност солубилизације пиперина у присуству циклодекстрина. Наиме, ефикасност солубилизације представља однос између растворљивости пиперина у присуству највеће концентрације циклодекстрина и растворљивости чистог пиперина. Максимално повећање растворљивости пиперина постиже се у присуству 6 mmol/dm^3 *β*-циклодекстрина и износи скоро 47 пута у односу на чист пиперин у раствору. Са друге стране, у присуству 20 mmol/dm^3 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина растворљивост пиперина се повећава чак 166 пута. Повећањем растворљивости пиперина у присуству циклодекстрина и формирањем инклузионих комплекса значајно се побољшава и његова биорасположивост у људском организму, што може позитивно утицати на фармаколошку примену пиперина у терапији.

4.6.2.4 ^{1}H NMR анализа инклузионих комплекса

Да би се потврдио механизам интеракције и укљученост пиперина у шупљину циклодекстрина, извршена је ^{1}H NMR анализа инклузионих комплекса. Ова техника омогућава детаљан увид у промене хемијских померања протона, које се јављају услед формирања хидрофобних интеракција између ароматичних и алифатичних делова

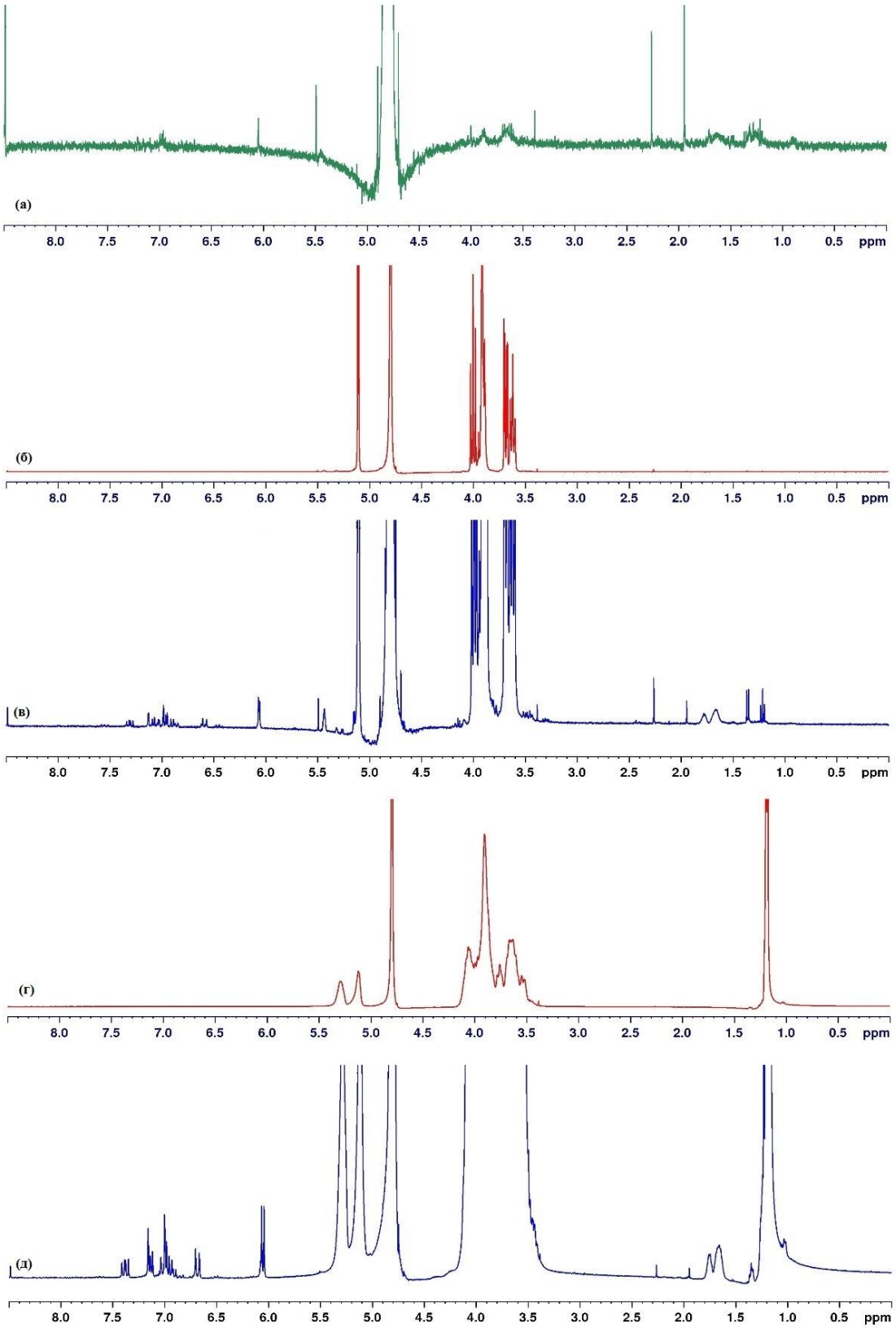
молекула пиперина и унутрашње шупљине циклодекстрина. Поређењем NMR спектара пиперина, *β*-циклодекстрина и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина са спектрима њихових инклузионих комплекса, могуће је идентификовати промене у положајима сигнала које потврђују укључење дела молекула пиперина у хидрофобну шупљину циклодекстрина. Структуре пиперина и глукозидних јединица *β*-CD и HP-*β*-CD са јасно означеним положајима атома приказане су на Слици 4.63.



а) б) в)

Слика 4.63 Структуре: а) пиперина и глукозидних јединица б) *β*-циклодекстрина и в) хидроксипропил-*β*-циклодекстрина са јасно означеним положајима атома

^{1}H NMR спектри пиперина, *β*-CD, HP-*β*-CD, инклузионих комплекса пиперин:*β*-CD и пиперин:HP-*β*-CD приказани су на Слици 4.64. Због ниске растворљивости пиперина, његов ^{1}H NMR спектар није било могуће снимити у D_2O. ^{1}H NMR спектри инклузионих комплекса снимљени у D_2O потврђују задовољавајућу растворљивост пиперина након комплексирања са циклодекстринама.



Слика 4.64 ^{1}H NMR спектри: а) пиперина, б) *β*-циклодекстрина, в) инклузионог комплекса пиперин:*β*-CD, г) хидроксипропил-*β*-циклодекстрина и д) инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD

^{1}H NMR спектар алкалоида, којима припада и пиперин, одликује се присуством карактеристичног сигнала на δ = 2,86–3,95 ppm који потиче од водоникових атома на C атому у α положају у односу на N атом (Gómez-Calvario and Rios, 2019). Овај сигнал се у ^{1}H NMR спектру пиперина, приказаном на Слици 4.64a, налази на δ = 3,654 ppm. У области нижих вредности хемијских померања (1–4 ppm) налазе се и сигнали који потичу од осталих протона из пиперидинског прстена (Nikitin, 2020). Сигнал који потиче од метиленских протона (–O–CH_2–O–) из бензендиоксолног прстена у ^{1}H NMR спектру пиперина налази се на δ = 6,049 ppm, док се сигнали који потичу од ароматичних и алкенил протона јављају у интервалу од 6,5–7,5 ppm, што је у складу са резултатима других аутора (Nikitin, 2020).

Хемијска померања и промене хемијских померања протона у комплексу пиперин:β-CD у поређењу са чистим пиперином и β-циклодекстрином приказане су у Табели 4.55.

Табела 4.55 Хемијска померања (δ) и промене хемијских померања ($\Delta\delta$) протона у ^{1}H NMR спектрима пиперина, β-циклодекстрина и инклузионог комплекса пиперин:β-CD

	δ, ppm (D_2O)[1]			**$\Delta\delta$[2]**
	Пиперин	**β-CD**	**Пиперин:β-CD**	
H-1 β-CD		5,102	5,108	0,006
H-2 β-CD		3,681	3,688	0,007
H-3 β-CD		3,996	3,993	-0,003
H-4 β-CD		3,614	3,624	0,010
H-5 β-CD		3,884	3,877	-0,007
H-6 β-CD		3,909	3,911	0,002
H-2 пиперин	–		6,449	–
H-3 пиперин	–		7,309	–
H-4 пиперин	–		6,588	–
H-5 пиперин	6,954		6,879	-0,075
H-7 пиперин	7,210		7,111	-0,099
H-9 пиперин	6,049		6,066	0,017
H-11 пиперин	6,989		6,967	-0,022
H-12 пиперин	–		7,049	–
H-13,17 пиперин	3,654		Преклапање са β-CD	–
H-14,16 пиперин	1,637		1,668	0,031
H-15 пиперин	1,708		1,777	0,069

[1]400 MHz 1H NMR; [2]$\Delta\delta = \delta_{комплекс} - \delta_{некомплексиран}$

Највеће промене хемијских померања протона пиперина након комплексирања са *β*-циклодекстрином уочавају се на положајима H-5, H-7 и H-15 и износе –0,075 ppm, –0,099 ppm и 0,069 ppm, редом, што указује да су наведени протони највише укључени у интеракцију са *β*-циклодекстрином. Промене у хемијским померањима протона *β*-циклодекстрина су веома мале (до 0,010 ppm). Тако мала одступања типично указују на нековалентне интеракције, најчешће водоничне везе, између молекула госта (пиперина) и молекула домаћина (*β*-циклодекстрина) у формираном инклузионом комплексу.

Хемијска померања и промене хемијских померања протона у комплексу пиперин:HP-*β*-CD у поређењу са чистим пиперином и хидроксипропил-*β*-циклодекстрином приказане су у Табели 4.56.

Табела 4.56 Хемијска померања (*δ*) и промене хемијских померања (Δ*δ*) протона у ^{1}H NMR спектрима пиперина, хидроксипропил-*β*-циклодекстрина и инклузионог комплекса пиперин:HP-*β*-CD

	***δ*, ppm (D_2O)[1]**			**Δ*δ*[2]**
	Пиперин	**HP-*β*-CD**	**Пиперин:HP-*β*-CD**	
H-1 HP-*β*-CD		5,090	5,207	0,117
H-3 HP-*β*-CD		3,448-4,057	3,487-4,064	0,007-0,039
H-4 HP-*β*-CD				
H-5 HP-*β*-CD				
H-6 HP-*β*-CD				
CH_3 HP-*β*-CD		1,158	1,177	0,019
H-2 пиперин	–		6,498	–
H-3 пиперин	–		7,372	–
H-4 пиперин	–		6,676	–
H-5 пиперин	6,954		6,916	-0,038
H-7 пиперин	7,210		7,150	-0,060
H-9 пиперин	6,049		6,046	-0,003
H-11 пиперин	6,989		6,992	0,003
H-12 пиперин	–		7,119	–
H-13,17 пиперин	3,654		Преклапање са HP-*β*-CD	–
H-14,16 пиперин	1,637		1,651	0,014
H-15 пиперин	1,708		1,743	0,035

[1]400 MHz 1H NMR

[2]$\Delta\delta = \delta_{комплекс} - \delta_{некомплексиран}$

Највеће промене хемијских померања протона пиперина након комплексирања са хидроксипропил-*β*-циклодекстрином уочавају се на положајима H-5, H-7 и H-15 и износе –0,038 ppm, –0,060 ppm и 0,035 ppm, редом, што указује да су наведени протони молекула госта највише укључени у интеракцију са молекулом домаћина. Ови резултати су у сагласности са претходно приказаним вредностима за инклузиони комплекс пиперина са *β*-циклодекстрином (Табела 4.55). Протони 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрина показују израженије промене хемијских померања, при чему је највећа промена уочена код протона у положају H-1 ($\Delta\delta$ = 0,117 ppm), што указује на учешће овог протона у интеракцијама између пиперина и хидроксипропил-*β*-циклодекстрина. На основу приказаних резултата протонске NMR анализе, може се закључити да само део молекула пиперина бива уклопљен у шупљине *β*-циклодекстрина и хидроксипропил-*β*-циклодекстрина, што потврђује делимичну инклузију и постојање стабилних, али не потпуно затворених супрамолекулских структура.

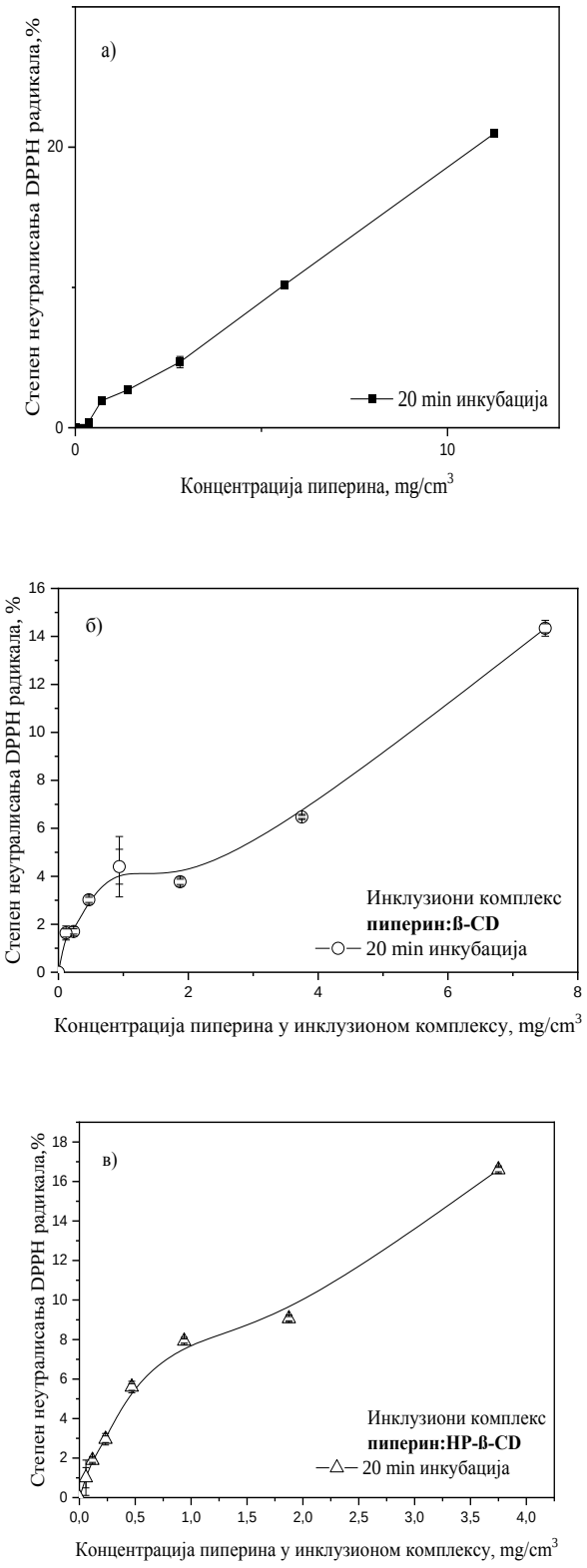
На основу добијених резултата и промена хемијских померања у ^{1}H NMR спектрима, може се закључити да начин инкорпорирања молекула пиперина у шупљине циклодекстрина у овој дисертацији одступа од модела предложеног у литератури. Према наводима Ezawa и сарадника (2016) и Christoforides и сарадника (2022), највероватнији начин укључивања пиперина подразумева продирање бензендиоксолног прстена у унутрашњост шупљине циклодекстрина. Међутим, у овој дисертацији највеће промене хемијских померања уочене су код протона H7 (из бензеновог прстена), H5 (алкенил протон у непосредној близини бензеновог прстена) и H15 (два протона из пиперидинског прстена), што указује на другачији оријентациони модел у односу на онај из литературе. Протони H9 (метиленски протони из –O–CH_2–O– групе), за које се у литератури наводи да се налазе у унутрашњости шупљине, у приказаним резултатима ове дисертације показују минималне промене хемијских померања. Овакви резултати упућују на могућност да се пиперин уклапа у шупљину циклодекстрина под другачијим оријентационим углом, што би могло бити последица разлика у типу циклодекстрина, методи припреме комплекса или физичко-хемијским условима током комплексирања.

4.6.3 Биолошке активности пиперина и инклузионих комплекса

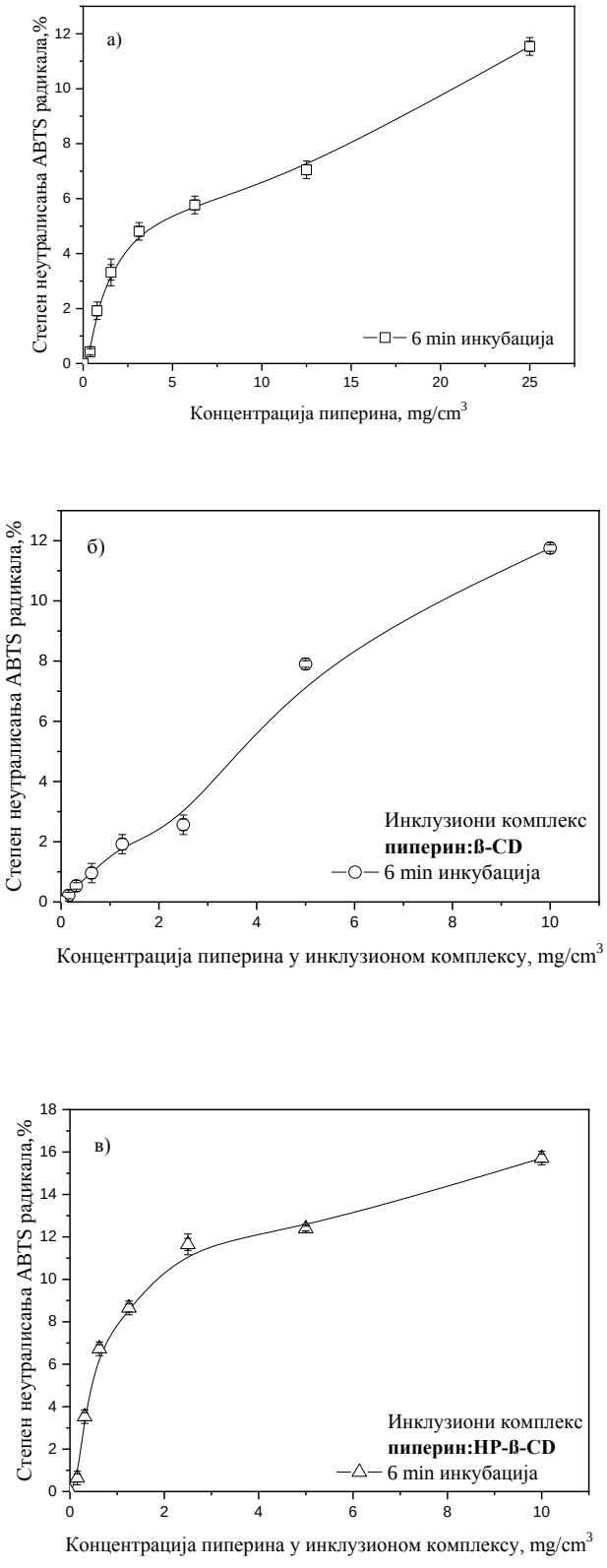
4.6.3.1 Антиоксидативна активност

Липофилност и ограничена растворљивост пиперина у води значајно умањују биорасположивост и антиоксидативну ефикасност у воденим системима. Из тог разлога, у овој дисертацији истраживана је антиоксидативна активност чистог пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином, са циљем да се утврди утицај комплексирања на његову способност неутрализације слободних радикала, хелирајућу способност јона гвожђа и редукциону моћ.

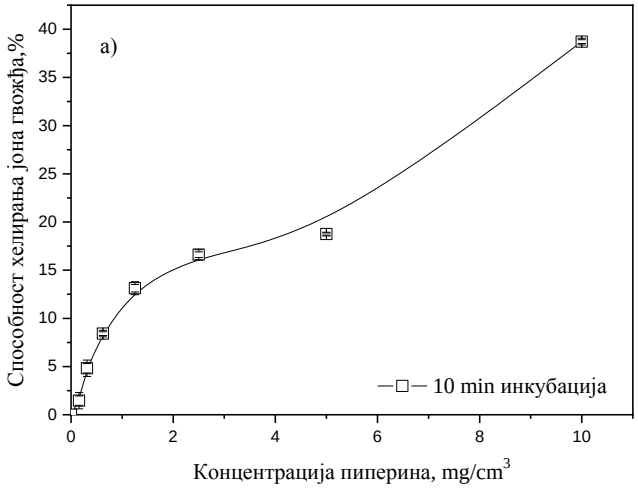
Графички прикази за DPPH, ABTS и FIC тестове (Слике 4.65-4.67) показују да антиоксидативна активност пиперина расте са повећањем концентрације, али да се углавном побољшава након формирања инклузионих комплекса са циклодекстринима. Комплекс пиперина са HP-*β*-CD је показао највећу активност у свим тестовима, што се приписује побољшаној растворљивости и стабилизацији пиперина у водено-етанолном раствору.

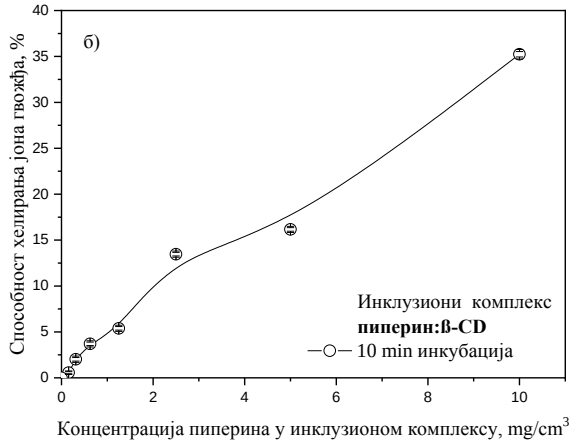


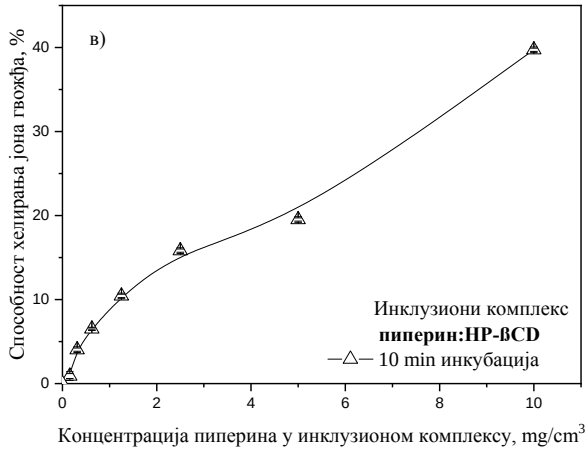
Слика 4.65 Степен неутралисања DPPH радикала у зависности од концентрације а) пиперина, б) пиперина у инкузионом комплексу пиперин:*β*-CD и в) пиперина у инкузионом комплексу пиперин:HP-*β*-CD



Слика 4.66 Степен неутралисања ABTS радикала у зависности од концентрације а) пиперина, б) пиперина у инкузионом комплексу пиперин:*β*-CD и в) пиперина у инкузионом комплексу пиперин:HP-*β*-CD







Слика 4.67 Степен хелирања јона гвожђа од концентрације а) пиперина, б) пиперина у инкузионом комплексу пиперин:*β*-CD и в) пиперина у инкузионом комплексу пиперин:HP-*β*-CD

У Табели 4.57 дат је упоредни приказ антиоксидативне активности пиперина и награђених комплека одређен применом пет различитих антиоксидативних метода.

Табела 4.57 EC_{50} вредности (DPPH, ABTS и FIC тест), FRAP вредност и редукциона способност пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-CD и HP-*β*-CD

Узорак	DPPH EC_{50}, mg/cm^3	ABTS EC_{50}, mg/cm^3	FIC EC_{50}, mg/cm^3	FRAP mgEFe^{2+}/g пип.	RP (Fe^{3+} - Fe^{2+}) mg GKE/g пип.
	20 min инкубација	6 min инкубација	10 min инкубација	30 min инкубација	20 + 30 min инкубација
Пиперин	25,59 ± 0,786	148,72 ± 15,348	14,00 ± 0,074	4,01 ± 0,025	0,02 ± 0,015
Инклузиони комплекс (пиперин : *β*-CD)	26,11 ± 0,639	42,62 ± 1,975	15,19 ± 0,272	3,76 ± 0,025	0,09 ± 0,044
Инклузиони комплекс (пиперин : HP-*β*-CD)	14,25 ± 0,520	73,19 ± 12,927	13,38 ± 0,204	3,71 ± 0,025	4,26 ± 0,050

Према резултатима DPPH теста, пиперин је показао умерену способност неутрализације слободних радикала (EC_{50} = 25,59 mg/cm^3). Након формирања инклузионих комплекса, вредност EC_{50} се смањила, на 14,25 mg/cm^3 за комплекс са HP-*β*-CD, што представља побољшање од приближно 45% у односу на чист пиперин. Међутим, у литератури су забележени и другачији налази. Тако су Stasiłowicz и сарадници (2021) показали да је EC_{50} вредност за чист пиперин износила 38,95 ± 1,84 mg/cm^3, док је за инклузиони комплекс пиперин:HP-*β*-CD добијен поступком гњечења износила 37,18 ± 0,86 mg/cm^3, што указује да у њиховом случају комплексирање није довело до значајнијег побољшања DPPH активности. Разлика у односу на резултате добијене у оквиру ове дисертације може се довести у везу са различитим начином припреме комплекса, степеном укључивања пиперина у циклодекстринску шупљину, као и специфичностима примењених експерименталних услова (Stasiłowicz et al., 2021).

У ABTS тесту, који је сличног механизма као и DPPH тест, пиперин је показао ниску активност (EC_{50} = 148,72 mg/cm^3), док су комплекси, нарочито са *β*-CD (42,62 mg/cm^3), показали значајно боље резултате. Сличан тренд забележили су Yang и сарадници (2022), који су одређивали антиоксидативну активност микрокапсула добијених ко-енкапсулацијом ресвератрола и пиперина у HP-*β*-циклодекстрин. У њиховом раду је показано да се енкапулацијом ових једињења значајно побољшавају

активности одређене DPPH и ABTS тестом, у односу на пиперин иако у поменутом раду нису наведене EC_{50} вредности (Yang et al., 2022).

Резултати FIC теста ($EC_{50} \approx 13–15$ mg/cm^3) су показали да пиперин и његови комплекси показују способност хелирања јона гвожђа, без значајних разлика између узорака. Према резултатима FRAP теста, који процењује редукциону способност, уочено је да формирање комплекса није значајно утицало на редукциони капацитет пиперина одређену овим тестом.

Најизраженије промене уочене су у фericијанидној методи, где се редукциона способност пиперина (0,02 mg GKE/g) повећала чак до 4,26 mg GKE/g код комплекса са HP-*β*-CD. Овај пораст активности може се објаснити повећаном доступношћу електрон-донорских позиција на молекулу пиперина након стварања комплекса, као и смањеном тенденцијом молекула ка агрегацији. Слични резултати су забележени у литератури са другим супстанцама где је показано да су липофилне супстанце које су биле у комплексима довеле до повећања редукционе активности (Jo et al., 2021b).

На основу резултата свих тестова може се закључити да је антиоксидативна активност пиперина побољшана након формирања инклузионих комплекса, посебно са HP-*β*-CD, што се може приписати повећаној растворљивости, стабилности и бољој доступности реактивних позиција молекула у поларној средини. Ови резултати су у потпуности у складу са литературним подацима и потврђују потенцијал примене циклодекстрина као носача за побољшање биорасположивости и антиоксидативних својстава пиперина (Stasiłowicz et al., 2021; Yang et al., 2022).

4.6.3.2 Антимикробна активност пиперина и инклузионих комплекса

Резултати одређивања антимикробне активности пиперина, инкулизоних комплекса пиперина са циклодекстринима и стандардних антибиотика/антимикотика су приказани као МИК и ММК вредности у Табелама 4.58 и 4.59, редом.

Табела **4.58** Минималне инхибиторне (МИК) концентрације пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-CD и HP-*β*-CD, према референтним и изолованим сојевима микроорганизама

Бактерија/ гљива	*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја	Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Пиперин : *β*-CD	>7,5	7,5	3,75	7,5	>7,5	7,5	7,5	3,75
Пиперин : HP-*β*-CD	>7,5	>7,5	>7,5	7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5
Пиперин	7,5	>15	7,5	7,5	7,5	7,5	3,75	3,75
Антибиотик/ антимикотик, mg/cm^3	Хлорамфеникол		Ципрофлоксацин				Нистатин	
	0,006	0,003	0,00003125	0,0000625	0,000007812 5	0,000007812 5	0,004	0,004

Табела 4.59 Минималне микробицидне (ММК) (бактерицидне/фунгицидне) концентрације пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-CD и HP-*β*-CD, према референтним и изолованим сојевима микроорганизама

Бактерија/ гљива	*Salmonella*	*Salmonella*	*B.cereus*	*B.cereus*	*E. coli*	*E. coli*	*C. albicans*	*C. albicans*
Порекло соја	Изолат из фецеса	ATCC 13076	ATCC 11778	Изолат из хране	ATCC 8739	Изолат из хране	Изолат из фецеса	ATCC 24433
Пиперин : *β*-CD	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5
Пиперин : HP-*β*-CD	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5
Пиперин	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5	>7,5

Из резултата приказаних у Табели 4.58 може се уочити да чист пиперин испољава инхибиторну активност према анализираним микроорганизмима, док инклузиони комплекси пиперина са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином нису показали значајнију промену активности у односу на пиперин у примењеном концентрационом опсегу (MIC > 7,5 mg/cm^3), при чему су наведене вредности, у случају инклузионих комплекса, изражене као еквивалентне концентрацији пиперина у комплексима. Комплексирање пиперина са циклодекстринима није довело до

значајнијег унапређења његовог антимикробног потенцијала у датим експерименталним условима. Најизраженији ефекат пиперина утврђен је према *Candida albicans* (МИК = 3,75 mg/cm^3, Табела 4.58), док су за бактеријске сојеве *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* и *Salmonella spp.* добијене вредности МИК = 7,5 mg/cm^3 (Табела 4.58), што упућује на бактериостатски тип деловања. Ови резултати су у складу са налазима Aldaly (2010), који је утврдио да пиперин делује на широк спектар микроорганизама са МИК вредностима у опсегу 3,125–100 mg/cm^3, при чему је најјачи ефекат забележен управо према *Candida albicans* и *Escherichia coli* (Aldaly, 2010). Слично, Rani и сарадници (2013) су применом диск-дифузионе методе показали да пиперин поседује антимикробну активност према *Escherichia coli* са зонама инхибиције у опсегу од 5 до 8 mm. Имајући у виду да је диск-дифузиона метода превасходно квалитативна/семиквантитативна, добијене вредности зона инхибиције не могу се директно поредити са квантитативним резултатима овог истраживања, заснованим на одређивању МИК вредности. Међутим, ови подаци су показали израженију антимикробну активност пиперина према Грам-позитивним бактеријама у односу на Грам-негативне врсте (Rani et al., 2013).

Према резултатима Alves и сарадника (2022), *Candida albicans* (IC_{50} = 136,0 μg/cm^3) је показала мању осетљивост, док је *Salmonella* (IC_{50} = 45,0 μg/cm^3) била умерено отпорна на дејство пиперина (Alves et al., 2022). У раду Hikel-a (2018) пиперин је испољио инхибиторно дејство према *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* (зоне инхибиције 3,14–10,43 mm и 5,42–8,34 mm при концентрацијама 0,2–0,5%), док није показано дејство на *Salmonella sp.* и *Escherichia coli*. С друге стране, иако су *β*-CD и HP-*β*-CD побољшали растворљивост и биорасположивост пиперина, нису директно довели до значајног повећања антимикробног ефекта, што се слаже са литературним налазима (Stasiłowicz et al., 2021; Christoforides et al., 2022). Повећање хидрофилности услед енкапсулације може чак умањити интеракцију са липидним мембранама бактерија, што је један од кључних механизама деловања пиперина. С друге стране, формирање комплекса може стабилизовати пиперин и спречити његову агрегацију, што потенцијално доприноси очувању активности током дужег периода складиштења (Quilaqueo et al., 2019).

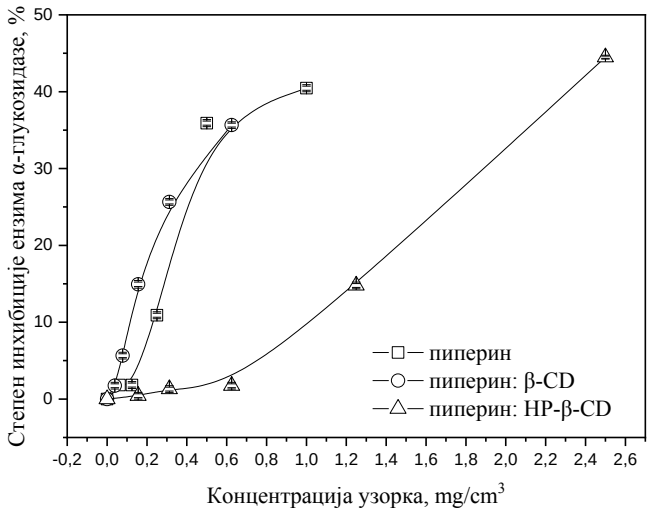
Резултати приказани у Табели 4.59 показују да за чист пиперин, као ни за његове инклузионе комплексе са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином, није утврђена микробицидна, односно бактерицидна/фунгицидна концентрација у анализираном опсегу, јер су све ММК вредности биле >7,5 mg/cm^3.

У целини, добијени резултати показују да пиперин поседује антимикробни потенцијал који је најизраженији према *C. albicans*, док је формирање инклузионих комплекса без значајног унапређења антимикробног ефекта.

4.6.3.3 Антихипергликемијска активност пиперина и инклузионих комплекса

У циљу проучавања потенцијала пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-циклодекстрином и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином као природних агенаса у регулацији нивоа глукозе у организму, одређена је њихова *in vitro* антихипергликемијска активност. Истраживање је засновано на способности инхибиције ензима *α*-глукозидазе, који катализује разградњу сложених угљених хидрата до глукозе, чиме се посредно утиче на постпрандијално повећање нивоа шећера у крви.

Резултати одређивања инхибиторног дејства пиперина и његових инклузионих комплекса на дејство ензима *α*-глукозидазе приказани су на Слици 4.68 и у Табели 4.60.



Слика 4.68 Степен инхибиције ензима *α*-глукозидазе у зависности од концентрације пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-CD и HP-*β*-CD

Резултати су показали да пиперин и његови инклузиони комплекси са циклодекстринима инхибирају ензим *α*-глукозидазу у зависности од концентрације узорка (Слика 4.68).

Табела 4.60 EC_{50} вредности инхибиције ензима *α*-глукозидазе пиперином и његовим инклузионим комплексима са *β*-CD и HP-*β*-CD

Узорак	**Инхибиција *α* - глукозидазе, EC_{50}, mg/cm^3**
	10+ 10 min инкубација
Пиперин	1,180 ± 0,013
Пиперин : *β*-CD	0,944 ±0,020
Пиперин : HP-*β*-CD	1,608 ± 0,023

Вредност EC_{50} за чист пиперин износи 1,180 ± 0,013 mg/cm^3, што указује на умерену способност инхибиције ензима. Комплексирањем са *β*-циклодекстрином активност је благо побољшана (EC_{50} = 0,944 ± 0,020 mg/cm^3), док је код комплекса са 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином забележено нешто слабије дејство (EC_{50} = 1,608 ± 0,023 mg/cm^3). Побољшање антихипергликемијске активности код комплекса пиперин:*β*-CD може се објаснити оптималнијом просторном оријентацијом молекула пиперина у шупљини циклодекстрина, што омогућава бољу изложеност активних функционалних група које учествују у инхибицији ензима. Смањена активност комплекса са HP-*β*-CD вероватно је последица снажнијих интеракција унутар шупљине, које делимично смањују доступност пиперина за реакцију са ензимом.

У студији Magaña-Barajas и сарадника (2021) одређена је инхибиторна активност пиперина према *α*-глукозидази и поређена је са етанолним екстрактима црног бибера. Пиперин је показао EC_{50} вредност од 147 μg/cm^3, што указује на умерену способност инхибиције ензима, али већу ефикасност у односу на етанолне екстракте. Поређењем са резултатима ове дисертације, где је вредност EC_{50} за инхибицију *α*-глукозидазе пиперином износила 1,18 mg/cm^3 (≈1180 μg/cm^3), може се уочити да је активност слабија (Magaña-Barajas et al., 2021). Temrangsee и сарадници (2019) су утврдили да изоловани пиперин инхибира *α*-глукозидазу са EC_{50} = 45,26 μg/cm^3, што указује на умерено јаку активност у односу на стандардни инхибитор акарбозу (EC_{50} = 142,77 μg/cm^3) (Temrangsee et al., 2019).

Ипак, чист пиперин испољава израженију инхибицију *α*-глукозидазе у односу на екстракте (Табела 4.20), док инклузиони комплекс пиперин:*β*-CD (EC_{50} = 0,94 mg/cm^3, Табела 4.60) показује додатно побољшање активности, што указује да комплексирање побољшава растворљивост и биорасположивост пиперина, а тиме и његову биолошку активност. Вредности EC_{50} за екстракте добијене различитим поступцима кретале су се у опсегу 5,19–6,69 mg/cm^3 (Табела 4.21), док је за чист пиперин EC_{50} износио 1,18

mg/cm^3 (Табела 4.60), што указује да је изоловани пиперин вишеструко активнији у инхибицији ензима *α*-глукозидазе. Ова разлика се може објаснити присуством других липофилних компоненти у екстрактима које могу делимично умањити инхибиторно дејство пиперина.

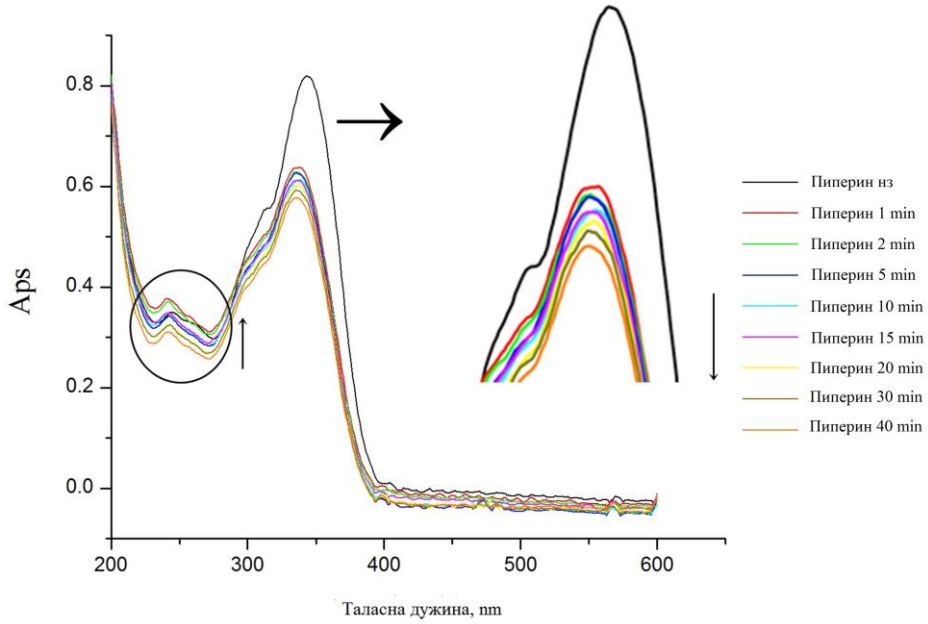
Комплекс пиперин:HP-*β*-CD (EC_{50} = 1,61 mg/cm^3, Табела 4.60) испољио је сличну или нешто слабију активност у односу на чист пиперин, што је у складу са резултатима FT-IR и DSC анализа, где је утврђено да је интеракција у овом систему јача и може делимично ограничити активне групе молекула.

У целини посматрано, изоловани пиперин и његови комплекси са циклодекстринима показују већу антихипергликемијску активност у односу на етанолне екстракте, што указује на важност изолације и модификације пиперина као активне компоненте у циљу добијања потенцијално ефикаснијих фитофармацеутских формулација.

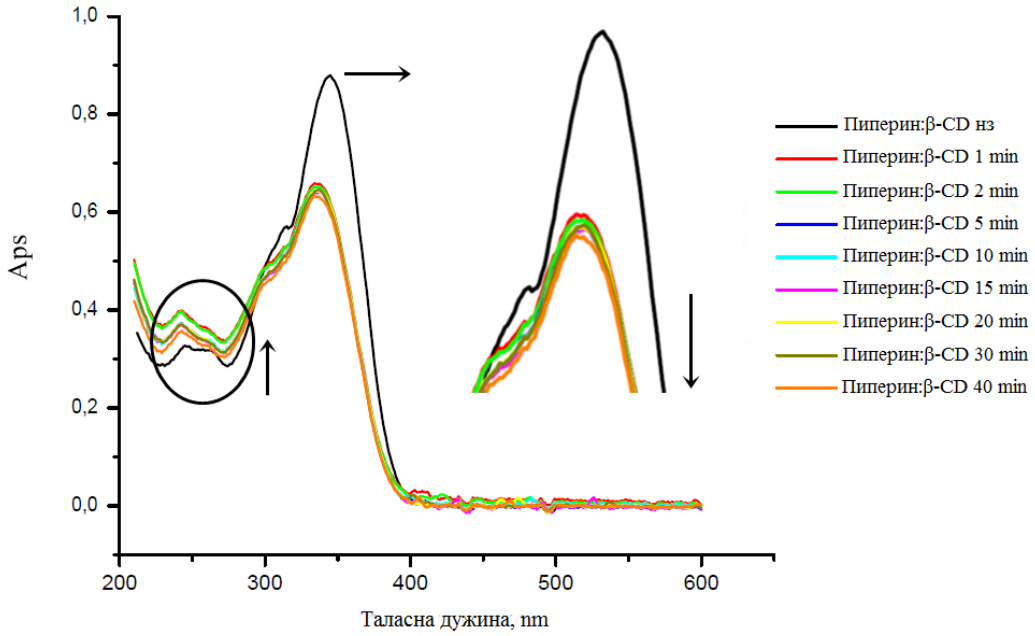
4.6.4 Зрачење пиперина и инкузионих комплекса – анализа фотостабилности награђених комплекса

Анализа фотостабилности пиперина и његових инклузионих комплекса са циклодекстринима спроведено је праћењем промена у апсорпционим спектрима током излагања UV-B зрачењу. Пиперин је познат као фотолабилно једињење које под утицајем UV зрака пролази кроз изомеризацију и разградњу конјугованог система (Soumyanath et al., 2006). Да би се повећала његова стабилност, све чешће се примењује формирање инклузионих комплекса са циклодекстринима, који захваљујући својој хидрофобној шупљини штите молекул од директног дејства светлости и оксидационих реакција (Nikolić et al., 2010; Nikolić et al., 2014; Savić-Gajić et al., 2017).

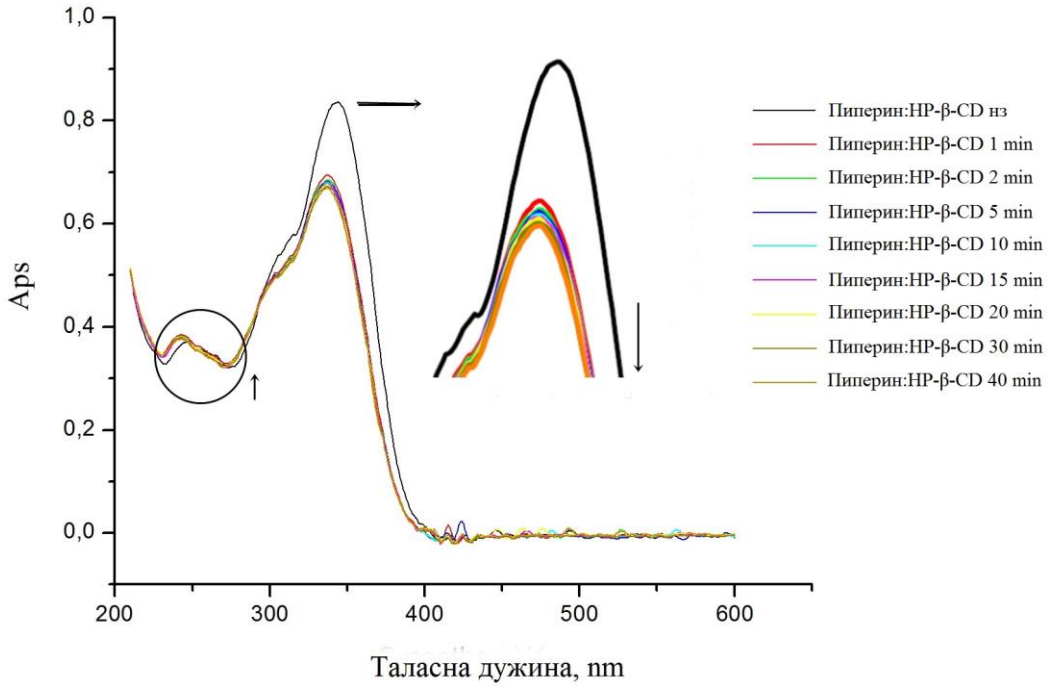
У овој дисертацији је анализирана деградација чистог пиперина и његових инклузионих комплекса са *β*-циклодекстрином (Пиперин:*β*-CD) и 2-хидроксипропил-*β*-циклодекстрином (Пиперин:HP-*β*-CD) под дејством UV-B зрачења. Промене у апсорбанци су праћене методом UV-Vis спектрофотометрије, а добијени резултати су приказани на Сликама 4.69-4.71 и у Табели 4.61. На основу логаритамске зависности апсорбанце од времена (*ln*Aps = f (t)) одређене су константе брзине фотодеградације и процењена релативна фотостабилност узорака, што омогућава поређење заштитног ефекта циклодекстрина (Jadhav et al., 2021; Christoforides and Andreou, 2022).



Слика 4.69 UV-Vis спектар пиперина под дејством UV-B зрачења током различитих временских интервала



Слика 4.70 UV-Vis спектар комплекса пиперин:*β*-CD под дејством UV-B зрачења током различитих временских интервала



в)

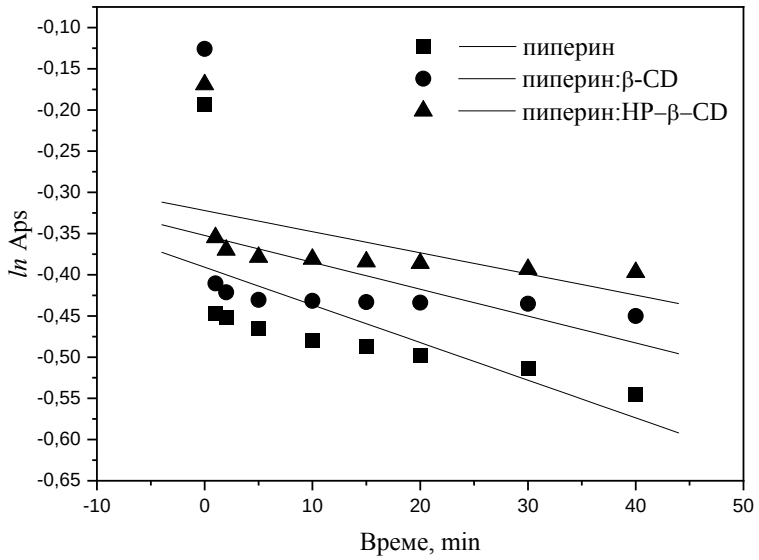
Слика 4.71 UV-Vis спектар комплекса пиперин:HP-*β*-CD под дејством UV-B зрачења током различитих временских интервала

Табела 4.61 Вредности апсорбанце (Aps) и природног логаритма апсорбанце (*ln* Aps) у зависности од времена озрачивања за пиперин и инклузионе комплексе са *β*-CD и HP-*β*-CD

Време (min)	Пиперин (Aps)	Пиперин (*ln* Aps)	Пиперин:*β*-CD (Aps)	Пиперин:*β*-CD (*ln* Aps)	Пиперин:HP-*β*-CD (Aps)	Пиперин:HP-*β*-CD (*ln* Aps)
0	0,8245	-0,1929	0,8817	-0,1259	0,8444	-0,1691
1	0,6400	-0,4463	0,6633	-0,4105	0,7014	-0,3547
2	0,6365	-0,4518	0,6562	-0,4213	0,6908	-0,3699
5	0,6278	-0,4655	0,6502	-0,4305	0,6848	-0,3786
10	0,6188	-0,4800	0,6495	-0,4316	0,6832	-0,3810
15	0,6147	-0,4866	0,6485	-0,4331	0,6810	-0,3842
20	0,6078	-0,4979	0,6480	-0,4339	0,6798	-0,3860
30	0,5982	-0,5138	0,6472	-0,4351	0,6748	-0,3933
40	0,5798	-0,5451	0,6376	-0,4500	0,6723	-0,3971

На Слици 4.72 је приказана кинетика фотодеградације пиперина и његових инклузионих комплекса под дејством UV-B зрачења, док су у Табели 4.62 приказане

константе брзине деградације (k), коефицијенти детерминације (R^2) и полувремена разградње ($t_{1/2}$) пиперина и његових комплекса.



Слика 4.72 Кинетика фотодеградације пиперина и његових инклузионих комплекса под дејством UV-B зрачења

Табела 4.62 Константе брзине деградације (k), коефицијенти детерминације (R^2) и полувремена разградње ($t_{1/2}$) пиперина и његових комплекса

Узорак	**Једначина (y = a·x + b)**	**R^2**	**k (min^{-1})**	**$t_{1/2}$ (min)**
Пиперин	y = -0,0046x - 0,3909	0,3919	0,0046	150,7
Пиперин:*β*-CD	y = -0,0033x - 0,3523	0,2005	0,0033	210,0
Пиперин:HP-*β*-CD	y = -0,0026x - 0,3220	0,2527	0,0026	266,5

У UV-Vis спектру неозраченог узорка пиперина уочавају се две доминантне апсорпционе области: 230–250 nm, која потиче од π→π* прелаза у ароматичном делу молекула, и 320–350 nm, која одговара π→π* прелазима у конјугованом *trans*-систему пиперина (–CH=CH–CH=O). Ове апсорпционе области одражавају карактеристичну структуру пиперина, која обухвата конјуговани систем двоструких веза повезан са карбонилном групом и ароматичним прстеном.

Са почетком озрачивања, најупадљивија промена се јавља у региону 320–350 nm, где долази до постепеног и константног смањења апсорбанце током времена. Овај пад је најизраженији код чистог пиперина, што јасно указује на фотохемијску деградацију конјугованог π-система и делимичну *trans→cis* изомеризацију молекула (Ali et al.,

2025). Пад апсорбанце на 340 nm је праћен благим хипсохромним померањем, што указује на постепено скраћивање дужине конјугације у систему услед фотоиндукованих структурних промена. Ови резултати потврђују да је *trans*-пиперин фотолабилан и подложан фотодеградацији под дејством UV-B зрачења (Kotte et al., 2014).

Истовремено, у области 230–250 nm уочава се пораст апсорбанце, присутан код сва три узорка, али најизраженији код чистог пиперина. Иако нису снимани посебни спектри фотопродуката, ова појава се може интерпретирати као последица настанка секундарних фотохемијских продуката са краћим конјугованим системима и већим енергетским π→π* прелазима. На основу анализе рада Kotte и сарадника (2014), у коме су идентификовани продукти разградње пиперина под различитим условима (укључујући фотолизу), издвојена су следећа једињења која имају сличну конјугацију и, стога, сличан UV-Vis спектар као пиперин: пиперилин, *cis*-пиперилин, пиперетин и дихидропиперлонгуминин (Kotte et al., 2014). Пиперин, као једињење са најдужим конјугованим π-системом, има максимум апсорпције око 340 nm, док његов *cis*-изомер, услед губитка планарности молекула, показује благо хипсохромно померање λ_{max} на око 320 nm. Насупрот томе, фотодеградациони продукти као што су пиперилин и пиперетин поседују краће конјуговане системе, што доводи до померања максимума апсорпције ка краћим таласним дужинама, у опсегу од 230 nm до 260 nm, што се слаже са експериментално уоченим порастом апсорбанце у овој области током озрачивања. Поред тога, дихидро- деривати, попут дихидропиперлонгуминина, испољавају изражене апсорпционе максимуме у региону 230–250 nm, што потврђује да овај део спектра потиче од фотодеградационих продуката са скраћеним или делимично редукованим π-системима. Због тога се уочени пораст у том делу спектра може сматрати индиректним доказом постепене акумулације фотодеградационих продуката током озрачивања, који настају паралелно са смањењем концентрације *trans*-пиперина.

Код чистог пиперина (Слика 4.69а) је деградација најинтензивнија, што потврђује и највећа вредност константе брзине ($k = 0{,}0046\ min^{-1}$) и најкраће полувреме разградње ($t_{1/2} = 150{,}7$ min). Спектри показују брз пад апсорбанце на таласној дужини максимума апсорпције од 340 nm и изражен пораст у области 230–250 nm, што указује на брзу фоторазградњу и стварање фотопродуката у првим минутима зрачења.

Код комплекса пиперин:*β*-CD (Слика 4.69б) је деградација значајно спорија. Пад апсорбанце на таласној дужини од 340 nm је умерен, док је пораст у области 230–250 nm слабијег интензитета, што указује да је пиперин делимично заштићен у

хидрофобној шупљини *β*-циклодекстрина и мање изложен фотолизи (Christoforides and Andreou, 2022).

Комплекс пиперин:HP-*β*-CD (Слика 4.69в) показује најмање промене у обе области, интензитет апсорбанце остаје скоро константан током целог периода зрачења. Овај резултат јасно указује да хидроксипропил-*β*-циклодекстрин обезбеђује највиши степен фотозаштите, стабилније и чвршће уклапање пиперина унутар хидрофобне шупљине (Stasiłowicz et al., 2021).

Кинетика деградације потврђује ова запажања: вредности константи брзине фотодеградације (Табела 4.62) опадају редом пиперин (0,0046 min^{-1}) > пиперин:*β*-CD (0,0033 min^{-1}) > пиперин:HP-*β*-CD (0,0026 min^{-1}), док се полувреме разградње повећава од 150,7 → 210,0 → 266,5 min. Ови подаци недвосмислено потврђују да формирање инклузионих комплекса доводи до смањења брзине фотохемијске деградације пиперина за 30–45%. Овај ефекат је у складу са бројним студијама које показују да циклодекстрини делују као фотозаштитни агенси за природне антиоксидансе и алкалоиде (Suvarna et al., 2022b).

Механизам стабилизације може се објаснити делимичним инкапсулирањем ароматичног дела молекула у хидрофобну шупљину циклодекстрина, чиме се спречава директна апсорпција фотонске енергије и настанак реактивних кисеоничних врста. Последично, деградациони процеси су успорени, а стварање фотопродуката је ограничено. Закључно, спектрални и кинетички подаци показују да је пиперин фотолабилан и да UV-B зрачење доводи до фотоизомеризације и фотодеградације пиперина праћену формирањем фотопродуката који апсорбују на краћим таласним дужинама, али да је овај процес значајно ублажен у присуству циклодекстрина, нарочито комплекса са HP-*β*-CD.

5 ЗАКЉУЧАК

- Одређене су технолошке карактеристике биљног материјала (плода црног бибера): садржај влаге (10,67%), релативна густина (1,312 g/cm^3), запреминска маса (1,0317 g/cm^3), насипна маса (0,507 g/cm^3), средњи пречник честица (0,258 mm), садржај укупних екстрактивних материја (q_0, УЕМ = 19,85 g/100 g б.м.), садржај етарског уља (q_0, ЕУ=3,26 cm^3/100 g б.м) и садржај испарљивих компоненти у биљном материјалу.
- Концентрација етанола, солвомодул, температура и време екстракције утичу на принос укупних екстрактивних материја из плода црног бибера. Дефинисани су оптимални оперативни услови екстракције укупних екстрактивних материја мацерацијом и то растварач: 70% v/v етанол и солвомодул 1:10 m/V. Највећи принос укупних екстрактивних материја (14,60 g/100 g б.м.) остварен је на температури кључања у трајању од 180 минута, па је ова температура усвојена као оптимална.
- Примењена техника екстракције има утицаја на принос укупних екстрактивних материја и кинетику екстракције 70% v/v етанолом. Највећи принос укупних екстрактивних материја остварен је Soxhlet екстракцијом (18,77 g/100 g б.м. за време од 240 min), што потврђује високу ефикасност континуалног контакта растварача и биљног материјала. Ултразвучном екстракцијом се три пута скраћује време екстракције потребно за постизање нешто већег приноса (9,80 g/100 g б.м.) од оно који се добија класичном мацерацијом (9,10 g/100 g б.м.) при истим осталим оперативним условима.
- На основу праћења кинетике екстракције укупних екстрактивних материја 70% v/v етанолом из плода црног бибера утврђено је да постоје брзи и спори период екстракције и да криве кинетике екстракције УЕМ показују типичне криве за екстракцију из целуларних материјала. За праћење кинетике екстракције примењена су два модела, модел Пономарјева (Модел А) и модел нестационарне дифузије (модел Б) и одређени параметри у једначинама кинетике екстракције мацерацијом, екстракцијом уз рефлукс (на 40 °C, 50 °C и температури кључања), Soxhlet и ултразвучном екстракцијом укупних екстрактивних материја.
- Највећи садржај укупних фенола одређен је у етанолном екстракту добијеном ултразвучном екстракцијом (85,64 mg GKE/g c.e.), док је највећи садржај укупних флавоноида одређен у екстракту добијеном екстракцијом уз рефлукс на температури кључања (97,56 mg RE/g c.e.).

- UHPLC-DAD-MS/MS анализом у позитивном јонизационом режиму идентификовано је сродних пиперамидних једињења (пиперин, пиперитин, пиперолеин А и В, пиперлонгуминин итд.), док су у негативном јонизационом режиму идентификована једињења попут лимунске и изолимунске киселине, гликозида апигеина и лутеолина, пиперина итд.
- Применом UHPLC-DAD-MS/MS анализе одређен је садржај пиперина у етанолним екстрактима, који се кретао у опсегу од 0,1-7,0 g/100 g б.м., односно од 1,134-47,268 g/100 g сувог екстракта. Најнижа вредност утврђена је у екстракту добијеним мацерацијом на собној температури (1,134 g/100 g с.е.), док је највиша вредност забележена код екстракта добијеног екстракцијом уз рефлукс на темератури кључања (47,268 g/100 g с.е.).
- Антиоксидативна активност етанолних екстраката плода црног бибера одређена је применом пет антиоксидативних тестова (DPPH, ABTS, FIC, FRAP и ферицијанидна метода). Најбољу антиоксидативну активност показао је екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на температури кључања са најнижом EC_{50} вредношћу применом DPPH теста (0,112 mg/cm^3), ABTS теста (1,010 mg/cm^3) и FIC теста (1,146 mg/cm^3), и највишом FRAP вредношћу (67,82 mgEFe^{2+}/1g екс.), док је екстракт добијен ултразвучном екстракцијом показао најбољу активност одређену ферицијанидном методом (31,20 mg GKE/g с.е.).
- Екстракти црног бибера показали су израженије инхибиторно од микробицидног дејства, при чему је најосетљивији сој био Грам-позитивни сој *Bacillus cereus* (ATCC 11778) (МИК вредности од 0,781 mg/cm^3 до 1,56 mg/cm^3). Екстракт добијен мацерацијом показао је набољу активност на овај сој са МИК вредношћу од 0,781 mg/cm^3. Значајна осетљивост је утврђена и код *Candida albicans* (ATCC 24433), са МИК вредностима у опсегу 1,56–3,125 mg/cm^3. Грам-негативни сојеви *Escherichia coli* (ATCC 8739 и изолат из хране) показали су резистенцију (МИК > 5 mg/cm^3), док је код *Salmonella spp*. забележена бактериостатска активност са МИК вредношћу од 3,125–5 mg/cm^3. Најбољу бактерицидну активност на *Salmonella* ATCC 13076 и *Bacillus cereus* ATCC 11778 сојеве показали су екстракти добијени мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс на 40 °C, са МБК вредностима од 5 mg/cm^3.
- Одређивањем антихипергликемијске активности екстраката утврђено је да је екстракт добијен екстракцијом уз рефлукс на температури кључања показао најбољу антихипергликемијску активност, односно највећи степен инхибиције α-глукозидазе

(EC_{50} = 5,189 mg/cm^3), док је екстракт добијен мацерацијом показао најмању активност (EC_{50} = 6,689 mg/cm^3).

- Сви анализирани екстракти црног бибера показали су антиинфламаторну активност, односно способност инхибиције денатурације протеина (BSA) при концентрацији од 0,1 mg/cm^3, при чему је највиши степен инхибиције утврђен ектрактом добијеним Soxhlet екстракцијом (89,61%), а најнижи екстрактом добијеним екстракцијом уз рефлукс на 50 °C (80,11%).
- Садржај макро-и микроелемената у етанолним екстрактима одређен је применом ICP-OES анализе. Од макроелемената је детектован највећи садржај калијума (20,412–47,228 mg/g с.е.) док је од микроелемената детектован највећи садржај силицијума (2,268–2,490 mg/g с.е.) у свим узорцима. Гвожђе, манган, хром и никл нису идентификовани у екстрактима. Од анализираних тешких метала, детектован је највећи садржај бизмута (0,134–0,156 mg/g с.е.) у свим узорцима.
- Принос олеорезина износи 13,76 g/100 g б.м. UHPLC-DAD-MS/MS анализом у позитивном моду јонизације одређен је квалитативни хемијски састав олеорезина (пиперанин, пиперилин, пиперлонгуминин и изомерне форме пиперина, пиперлонгуминин, дихидропиперлонгуминин, пиперолеин B, пиперциди итд.) и квантитативни садржај пиперина у олеорезину (41,0 g пиперина/100 g олеорезина односно 5,65 g пиперина/100 g биљног материјала).
- Олеорезин црног бибера показао је антиоксидативну активност применом свих тестова. У поређењу са етанолним екстрактима, олеорезин је показао израженију антиоксидативну активност применом FIC теста, док је применом ABTS теста испољио већу активност у односу на екстракте добијене мацерацијом и екстракцијом уз рефлукс на 40 °C. Применом DPPH, FRAP, као и ферицијанидне методе утврђена је нижа антиоксидативна активност олеорезина у односу на екстракте.
- Антимикробна анализа показала је да олеорезин црног бибера испољава активност према тестираним микроорганизмима, са вредностима минималне инхибиторне концентрације (МИК) у опсегу од 1,56 до 5 mg/cm^3, док је ММК била >5 mg/cm^3 за све микрооргаанизме.
- Доказана је *in vitro* антихипергликемијска активност олеорезина са EC_{50} вредношћу од 7,603 mg/cm^3, што је нешто слабија активност у односу на екстракте.
- Изолација „масног уља“, тј. *n*-хексанског изолата из плода црног бибера извршена је *n*-хексаном и добијен принос од 6,778 g/100 g б.м. FT-IR и HPLC анализом није

потврђено присуство триглицеридне фракције типичне за класична масна уља, док је утврђен висок садржај воскова (29%), што указује да овај изолат не представља класично масно уље, већ комплекс липофилних компоненти. Антиоксидативна активност масног уља одређена применом DPPH теста показала је да добијени изолат показује знатно мању активност (EC_{50} = 1,982 mg/cm^3) од активности етанолних екстраката и олеорезина (EC_{50} = 0,11–0,30 mg/cm^3).

- За хидродестилацију етарског уља и издвајање хидролата коришћене су две технике хидродестилације: *Техника I* – Класична Clevenger хидродестилација (Хидродестилација етарског уља са кохобацијом воденог дела дестилата) и *Техника II* – Хидродестилација етарског уља са коришћењем водене фазе суспензије из претходних хидродестилација за потапање биљног материјала у наредним хидродестилацијама.
- Фракционисање етарског уља црног бибера извршено је издвајањем фракција етарског уља за одређене временске интервале I (0-15 min), II (15-30 min), III (30-60 min), IV (60-90 min) и V (90-120 min) у циљу добијања етарског уља са бољом антиоксидативном активношћу у односу на уље добијено техником I.
- Највећи принос етарског уља из плода црног бибера добијен је применом хидромодула 1:10 m/V (3,16 cm^3/100 g б.м.). Фракционисањем је издвојено пет фракција етарског уља црног бибера, при чему је највећи принос остварен у првих 15 минута (1,54 cm^3/100 g б.м.), а затим постепено опадао у наредним интервалима: 0,45 cm^3 (15–30 min), 0,66 cm^3 (30–60 min), 0,27 cm^3 (60–90 min) и 0,08 cm^3/100 g б.м. (90–120 min).
- За моделовање кинетике хидродестилације етарског уља примењена су два кинетичка модела: модел Пономарјева (А) и модел нестационарне дифузије (Б) за изолацију техником I. С обзиром на то да су промене у хемијском саставу водене фазе утицале на пренос масе, због чега систем не испуњава претпоставке класичних кинетичких модела, моделовање кинетике хидродестилације није извршено за технику хидродестилације II.
- На основу GC/MS анализе утврђено је да у етарском уљу плода црног бибера изолованом техником I доминирају компоненте: (*E*)-кариофилен (34,6–44,6%), лимонен (8,4–12,6%), сабинен (6,2–11,7%), *β*-пинен (2,9–5,6%) и *α*-пинен (1,4–3,2%). Повећање хидромодула доводи до пораста удела сесквитерпена (47,0→61,6%), оксигенованих моно- (1,3→1,8%) и сесквитерпена (5,9→10%) и смањења

монотерпенских угљоводоника (44,1%→25,7%) у етарском уљу, што указује на селективнију екстракцију тежих и мање поларних једињења.

- Фракционисањем етарског уља црног бибера утврђено је да се са временом хидродестилације, удео монотерпена у етарском уљу смањује (64,6→33,6%), док расте удео сесквитерпена (31,5→52,3%) и њихових оксигенованих деривата (0,7→12,1%), при чему (*E*)-кариофилен постаје доминантна компонента (до 36,6%).
- Антиоксидативна активност етарског уља, хидролата и фракција црног бибера изолованих техником I, расте са временом инкубације, при чему су највећу антиоксидативну активност у свим тестовима показали хидролат након изолације етарског уља и фракција V етарског уља (изоловано у току фракционисања). Фракција V етарског уља је имала најниже EC_{50} вредности у односу на етарско уље изоловано техником I као и етарска уља из осталих фракција применом DPPH (8,02 mg/cm^3), ABTS (44,88 mg/cm^3) и FIC (3,38 mg/cm^3) теста, као и највише вредности у FRAP (8,11 mgEFe^{2+}/g уља) и ферицијанидној методи (9,63 mg GKE/g уља). Хидролат је показао бољу антиоксидативну активност од етарског уља и свих изолованих фракција етарског уља (EC_{50} DPPH: 0,993 mg/cm^3; EC_{50} ABTS: 3,65 mg/cm^3; EC_{50} FIC: 0,97 mg/cm^3; FRAP: 40,39 mgEFe^{2+}/g с.х.; ферицијанидна метода: 29,66 mg GKE/g с.х.).
- Резултати одређивања антимикробне активности показују да етарско уље изоловано техником I показује инхибиторну активност, нарочито против *Bacillus cereus* (МИК = 1,56 mg/cm^3) и гљиве *Candida albicans* (МИК = 3,125–6,25 mg/cm^3), док су сојеви *Salmonella* и *Escherichia coli* показали слабију осетљивост (МИК = 25 mg/cm^3). Хидролат није показао инхибиторну активност према одабраним сојевима микроорганизама у анализираном опсегу концентрација (МИК >15 mg/cm^3).
- Етарско уље изоловано техником I показало је антихипергликемијску активност (EC_{50} = 0,32 mg/cm^3), док хидролат није показао активност у примењеном опсегу концентрација.
- Техником хидродестилације II добијен је већи принос етарског уља након пете пробе хидродестилације (3,34 cm³/100 g б.м.) од приноса оствареног техником I (3,16 cm³/100 g б.м.).
- GC/MS анализом је у етарским уљима изолованим техником II идентификовано је 55–61 једињење (98,7–99,8%), од којих су најзаступљеније компоненте биле: (*E*)-кариофилен (39,8–48,6%), лимонен (8,4–11,1%) и сабинен (4,2–8,6%).

- HS-SPME анализом испарљивих једињења у хидролатима изолованим техиком II утврђено је да садржај оксигенованих монотерпена (нпр. *α*-терпинеол, борнеол и терпинен-4-ол) опада кроз серију проба, док се удео сесквитерпенских угљоводоника (попут *β*-пинена и (*E*)-кариофилена) повећава, што указује на промену хемијског састава у правцу мање оксигенисаних и више угљоводоничних компоненти. UHPLC-DAD-MS/MS анализом хидролата издвојеним након сваке пробе хидродестилације применом техике II утврђено је присуство више пиперамидних деривата (пиперин, пиперанин, пиперетин, пиперлонгуминин, пиперолеин A и B, ретрофрактамид, пелиторин) и одређена концентрација пиперина у свим хидролатима. Највиша концентрација пиперина утврђена је у хидролату након четврте пробе хидродестилације (0,6222 g/100 g б.м.), што потврђује кумулативни ефекат екстракције и обогаћивање хидролата биолошки активним компонентама током серијске дестилације.
- Антиоксидативна активност етарских уља и хидролата црног бибера изолованих техником II расте са бројем проба хидродестилације. Највећу активност применом DPPH теста показало је етарско уље из пробе V (EC_{50} = 1,61 mg/cm^3, 20 min) и хидролат из пробе V (0,212 mg/cm^3, 20 min), док је применом ABTS теста најбољу активност показало етарско уље из пробе IV (13,26 mg/cm^3, 24 min) и хидролат из пробе III (3,65 mg/cm^3, 6 min). Применом FIC теста најбољу хелирајућу способност показали су етарско уље из пробе IV (1,12 mg/cm^3, 24 min) и хидролат из пробе V (0,65 mg/cm^3, 6 min). Редукциони потенцијал (FRAP) био је највиши код етарског уља из пробе V (16,30 mgEFe^{2+}/g уља) и хидролата пробе из V (58,68 mgEFe^{2+}/g с.е.), док су по ферицијанидној методи најактивнији били етарско уље из пробе V (16,23 mg GK/g уља) и хидролати из пробе II и V (37,87 и 37,27 mg GK/g с.е. редом).
- Етарска уља добијена техником хидродестилације II показала су антимикробну активност сличну етарском уљу изолованом техником I, али са нешто вишим МИК/ММК вредностима, што указује на благо смањење ефикасности. Најосетљивији је такође био *Bacillus cereus* (MIC = 1,56–6,25 mg/cm^3), док су Грам-негативни сојеви били отпорнији (12,5 – >25 mg/cm^3). Изражена активност према *Candida albicans* приписује се присуству (*E*)-кариофилена, лимонена и сабинена, док хидролати нису показали антимикробно дејство (MIC >15 mg/cm^3) у примењеном опсегу концентрација.
- Етарска уља црног бибера добијена техником II показала су добру антихипергликемијску активност, са EC_{50} вредностима од 0,16 до 0,94 mg/cm^3, што

је упоредиво са етарским уљем изолованим техником I ($EC_{50} \approx 0{,}32$ mg/cm^3). Ово потврђује да терпенске компоненте, попут (*E*)-кариофилена и лимонена, значајно доприносе инхибицији *α*-глукозидазе. Хидролати одвојени након изолације етарског уља техником II нису показали антихипергликемијску активност у анализираном опсегу концентрација.

- Изолацијом пиперина из плода црног бибера добијен је принос од 1,8 g/100 g б.м. UV-Vis спектар пиперина показује три главне апсорпционе траке (на таласним дужинама у опсегу 342–344 nm; 300–310 nm и 230–270 nm). FT-IR спектар пиперина показао је карактеристичне траке за амидну групу (C=O–N–, 1633 cm^{-1}), конјуговани диенски систем (1633 и 1611 cm^{-1}), ароматични прстен (1611–1490 cm^{-1}) и етарску метилендиокси групу (=C–O–C, 1251–1031 cm^{-1}). UHPLC-DAD-MS/MS и UV–Vis анализа јасно потврђују да изоловано једињење одговара чистом пиперину. Идентичност пика, вредности *m*/*z* = 286 [M+] и спектрални максимум на 342 nm представљају карактеристичан „молекулски отисак“ пиперина.
- Методом гњечења формирани су инклузиони комплекси пиперина са *β*-CD и HP- *β*-CD, чиме је побољшана растворљивост, стабилност и потенцијална биорасположивост пиперина, при чему је HP-*β*-CD показао већу ефикасност у формирању комплекса. FT-IR анализа потврђује успешно формирање инклузионих комплекса пиперина са *β*-CD и HP-*β*-CD, што је доказано карактеристичним померањима и смањењем интензитета трака (νOH, C=O, C–H, COC), који указују на хидрофобне и водоничне интеракције између молекула пиперина и циклодекстрина, при чему је интеракција израженија код комплекса са HP-*β*-CD.
- DSC анализа комплекса пиперина са *β*-CD и HP-*β*-CD потврђује формирање инклузионих комплекса пиперина са циклодекстринима, што се огледа у нестанку или померању карактеристичних пикова пиперина и смањењу енталпије топљења (са 109,8 J/g на 7,24 J/g за *β*-CD и 10,18 J/g за HP-*β*-CD), што указује на стварање нових стабилних супрамолекулских структура.
- XRD анализа пиперина са *β*-CD и HP-*β*-CD потврђује формирање инклузионих комплекса пиперина са *β*-CD и HP-*β*-CD, што се огледа у појави нових дифракционих пикова и смањењу интензитета карактеристичних пикова пиперина, указујући на губитак кристалности и стварање нових супрамолекулских структура, при чему је комплекс са HP-*β*-CD делимично аморфан.
- Анализа фазне растворљивости показала је да пиперин формира комплекс ограничене растворљивости са *β*-CD (BS тип), док са HP-*β*-CD формира стабилан,

водорастворљив комплекс типа A_L (молски однос 1:1). Комплекс пиперин:HP-*β*-CD је стабилнији и ефикасније повећава растворљивост пиперина, чак 166 пута у односу на чист пиперин, што значајно побољшава његову биорасположивост и потенцијалну фармаколошку примену.

- ^{1}H NMR анализа пиперина и комплекса пиперин:*β*-CD и пиперин:HP-*β*-CD потврђује формирање инклузионих комплекса кроз промене хемијских померања протона H-5, H-7 и H-15, што указује на делимичну инклузију пиперина у шупљине циклодекстрина.
- Антиоксидативна активност пиперина након формирања инклузионих комплекса зависила је од типа примењеног циклодекстрина. При томе, сви резултати за комплексе интерпретирани су у односу на концентрацију пиперина присутног у комплексу. Комплекс пиперин:*β*-CD није довео до побољшања активности у DPPH тесту, с обзиром на то да је EC_{50} вредност благо порасла са 25,59 mg/cm³ на 26,11 mg/cm³. Комплекс пиперин:HP-*β*-CD показао је приближно 45% већу антиоксидативну активност применом DPPH теста (EC_{50} = 14,25 mg/cm³) у поређењу са чистим пиперином. Према резултатима ABTS теста, оба комплекса су испољила значајно већу активност у односу на некомплексирани пиперин, при чему су EC_{50} вредности, изражене на основу концентрације пиперина у комплексу, износиле 42,62 mg/cm³ за комплекс пиперин:*β*-CD и 73,19 mg/cm³ за комплекс пиперин:HP-*β*-CD, у односу на 148,72 mg/cm³ за слободни пиперин. EC_{50} вредности добијене FIC тестом биле су уједначене и кретале су се у опсегу од приближно 13 mg/cm³ до 15 mg/cm³. Резултати FRAP теста и ферицијанидне методе указали су на умерено побољшање редукционог потенцијала, нарочито код комплекса пиперин:HP-*β*-CD, при чему су вредности, изражене по граму пиперина у комплексу, износиле 3,71 mg EFe^{2+}/g и 4,26 mg GK/g.
- Пиперин је показао антимикробну активност, са највећим инхибиторним ефектом према *Candida albicans* (МИК = 3,75 mg/cm^3) и нешто слабијим дејством према *Bacillus cereus, Escherichia coli* и *Salmonella spp.* (МИК = 7,5 mg/cm^3). Инклузиони комплекси пиперин:*β*-CD и пиперин:HP-*β*-CD нису испољили значајну активност (МИК > 7,5 mg/cm^3).
- Пиперин показује антихипергликемијску активност (EC_{50} = 1,180 mg/cm^3), која се након настајања комплекса са *β*-CD побољшава (EC_{50} = 0,944 mg/cm^3), док је код комплекса са HP-*β*-CD активност слабија (EC_{50} = 1,608 mg/cm^3). Ови резултати указују да *β*-CD побољшава биорасположивост и изложеност активних група

пиперина, док јаче интеракције пиперина са HP-*β*-CD у комплексу делимично умањују његову инхибиторну активност према *α*-глукозидази.

- Пиперин је подложан брзој фотодеградацији (k = 0,0046 min^{-1}; $t_{1/2}$ = 150,7 min), док формирање инклузионих комплекса значајно повећава његову фотостабилност. Грађење комплекса са *β*-CD успорава деградацију пиперина (k = 0,0033 min^{-1}; $t_{1/2}$ = 210,0 min), док грађење комплекса са HP-*β*-CD обезбеђује највећу заштиту пиперина (k = 0,0026 min^{-1}; $t_{1/2}$ = 266,5 min), смањујући брзину фотодеградације за 30–45%. Ови резултати потврђују да циклодекстрини, посебно HP-*β*-CD, ефикасно штите пиперин од UV-B-индуковне деградације.
- Сва истраживања спроведена у оквиру ове дисертације омогућила су систематичну и компаративну карактеризацију хемијског састава, физичко-хемијских својстава и биолошких активности различитих изолата плода црног бибера, укључујући етанолне екстракте, етарска уља, хидролате, олеорезин, масно уље и изоловани пиперин, као и инклузионе комплексе пиперина са *β*-CD и HP-*β*-CD. Комбиновањем савремених метода инструменталне анализе добијен је детаљан увид у хемијски састав свих изолата, што је омогућило потпуније разумевање веза између састава, структуре и биолошких активности.

6 ЛИТЕРАТУРА

Abdel-Salam, O. M., Youness, E. R., Mohammed, N. A., Morsy, S. M. Y., Omara, E. A., Sleem, A. A. (2014). Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. Journal of Medicinal Food, 17(5), 588-598.

Acharya, S. G., Momin, A. H., Gajjar, A. V. (2012). Review of piperine as a bio-enhancer. American Journal of PharmTech Research, 2, 32-44.

Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed.;, Eds.; Allured Publishing Co.: Illinois.

Agarwal OP. 2010. Chemistry of organic natural products. Meerut, India:Goel Publishing House.

Akbar, P. N., Jahan, I. A., Hossain, M. H., Banik, R., Nur, H. P., Hossain, M. T. (2014). Antioxidant capacity of *Piper longum* and *Piper nigrum* fruits grown in Bangladesh. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 931-941.

Aladić, K., Jarni, K., Barbir, T., Vidović, S., Vladić, J., Bilić, M., Jokić, S. (2015). Supercritical CO_2 extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. Industrial Crops and Products, 76, 472-478.

Albini, A., Germani, L. (2010). Photochemical Methods. In A. Albini, M. Fagnoni (Eds.), Handbook of Synthetic Photochemistry (pp. 1–24). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Aldaly, Z. T. (2010). Antimicrobial activity of piperine purified from *Piper nigrum*. Journal of Basrah Researches (Sciences), 36(5), 54-61.

Al-Eed, M. A., Assubaie, F. N., El-Garawany, M. M., El-Hamshary, H., Eltayeb, Z. M. (2002). Determination of heavy metal levels in common spices. Journal of Applied Sciences, 17, 87-98.

Aleixandre-Tudo, J. L., Du Toit, W. J. (2018). The role of UV-visible spectroscopy for phenolic compounds in winemaking. Frontiers in Chemistry, 6, 1–14.

Ali, A.; Akram, M.; Rashid, A.; Asif, H. M.; Ayaz, S. (2024). Investigating the therapeutic potential of medicinal plants *Tribulus terrestris*, *Piper nigrum* and *Cichorium intybus* in the management of arthritis. Journal of Population Therapeutics & Clinical Pharmacology, 31(4), 409–414.

Ali, S., Saokaew, P., Aman, A., Todsaporn, D., Sanachai, K., Krusong, K., Hannongbua, S., Wolschann, P., Mahalapbutr, P., Rungrotmongkol, T. (2025). Enhancing solubility and stability of piperine using β-cyclodextrin derivatives: computational and experimental investigations. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 43(5), 2596-2609.

Al-Jasass, F. M., Al-Jasser, M. S. (2012). Chemical composition and fatty acid content of some spices and herbs under Saudi Arabia conditions. The Scientific World Journal, 2012(1), 859892.

Allen, K. E. (2015). Metal chelators as antioxidants for food preservation. In Handbook of antioxidants for food preservation (pp. 79-104). Woodhead Publishing.

Alonso-Carrillo, N., de los Ángeles Aguilar-Santamaría, M., Vernon-Carter, E. J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz-Sosa, F., Román-Guerrero, A. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. Industrial Crops and Products, 103, 213-221.

Alshehri, S., Haq, N., Shakeel, F. (2018). Solubility, molecular interactions and mixing thermodynamic properties of piperine in various pure solvents at different temperatures. Journal of Molecular Liquids, 250, 63-70.

Alves, F. S., Cruz, J. N., de Farias Ramos, I. N., do Nascimento Brandão, D. L., Queiroz, R. N., da Silva, G. V., da Silva, G. V., Dolabela, M. F., da Costa, M., Khayat, A. S., Rodrigues do Rego, J. D., do Socorro Barros Brasil, D. (2022). Evaluation of antimicrobial activity and cytotoxicity effects of extracts of piper nigrum L. and piperine. Separations, 10(1), 21.

Aneja, K. R., Surain, P., Aneja, A., Sharma, C. (2013). Anticandidal potential of *Piper nigrum* and *Piper longum* fruit extracts against selected oral and vaginal *Candida* pathogens. Asian Academic Research Journal of Social Sciences & Humanities, 1(16), 266-280.

Aniszewski, T. (2015). Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications. Elsevier.

Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 8(1), 46-54.

Ara, S. A., Akhlaq, S., Haque, M., Fazil, M., Akram, U., Ahmad, B., Quddusi, N., Sayeed, A. (2023). Ethnobotany, pharmacological application, phytochemistry and therapeutic potential of black pepper (*Piper nigrum* l.): An updated review. Indian Journal of Unani Medicine, 16(1), 35-46.

Arachchige, C. S. I. I. V., Jittanit, W. (2022). Effect of Particle Size and Solid-to-Solvent Ratio on Yield, Piperine Content, Volatile and Non-Volatile Contents of Black Pepper Oleoresin Extracts. Applied Engineering in Agriculture, 38(1), 145-153.

Arimboor, R., Venugopalan, V. V., Sarinkumar, K., Arumughan, C., Sawhney, R. C. (2006). Integrated processing of fresh Indian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries and chemical evaluation of products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86(14), 2345-2353.

Arnao, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology, 11, 419-421.

Ashokkumar, K., Murugan, M., Dhanya, M. K., Pandian, A., Warkentin, T. D. (2021). Phytochemistry and therapeutic potential of black pepper [*Piper nigrum* (L.)] essential oil and piperine: A review. Clinical Phytoscience, 7(1), 52.

Aswad, M., Rayan, M., Abu-Lafi, S., Falah, M., Raiyn, J., Abdallah, Z., Rayan, A. (2018). Nature is the best source of anti-inflammatory drugs: Indexing natural products for their anti-inflammatory bioactivity. Inflammation Research, 67(1), 67-75.

Atkins, P. W., De Paula, J., Keeler, J. (2023). Atkins' physical chemistry. Oxford university press.

Auti, P., Choudhary, A., Gabhe, S., Mahadik, K. (2018). Bioanalytical method development, validation and its application in pharmacokinetic studies of Verapamil in the presence of piperine in rats. International Journal of Pharmaceutical Research, 10(2), 118-123.

Auti, P., Choudhary, A., Gabhe, S., Mahadik, K. (2019). Bioanalytical method development and its application to pharmacokinetics studies on Simvastatin in the presence of piperine and two of its synthetic derivatives. Drug Development and Industrial Pharmacy, 45(4), 664- 668.

Aveldano, M. I., VanRollins, M., Horrocks, L. A. (1983). Separation and quantitation of free fatty acids and fatty acid methyl esters by reverse phase high pressure liquid chromatography. Journal of Lipid Research, 24(1), 83-93.

Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., Laakso, S. (1981). [53] Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13. 11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase. In Methods in Enzymology (Vol. 71, pp. 441-451). Academic Press.

Aziz, N. S., Sofian-Seng, N. S., & Wan Mustapha, W. A. (2018). Functional properties of oleoresin extracted from white pepper (*Piper nigrum* L.) retting waste water. Sains Malaysiana, 47(9), 2009-2015.

Aziz, N. S., Sofian-Seng, N., Mustapha, W. W. (2021). Efficacy of different solvent for oleoresin extraction and physicochemical properties of white pepper produced via water retting. Sains Malaysiana, 50(3), 677-689.

Aziz, S., Naher, S., Abukawsar, M. D., Roy, S. K. (2012). Comparative studies on physicochemical properties and gc-ms analysis of essential oil of the two-varieties of the black pepper (*Piper nigrum* Linn.). International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, 2, 67–70.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering, 117(4), 426-436.

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal & Aromatic Plants, 4(196), 2167-0412.

Babushok, V. I., Linstrom, P. J., Zenkevich, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 40(4), 043101.

Bahri, S., Ambarwati, Y., Iqbal, M., Baihaqy, A. A. (2019). Synthesis 4-piperoilmorpholine from piperine. In Journal of Physics: Conference Series 1338(1), 012010.

Bailey-Shaw, Y. A., Williams, L. A., Green, C. E., Rodney, S., Smith, A. M. (2017). *In-vitro* evaluation of the anti-inflammatory potential of selected Jamaican plant extracts using the bovine serum albumin protein denaturation assay. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 47(1), 145-153.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils–a review. Food and Chemical Toxicology, 46(2), 446-475.

Baky, M. H., Maamoun, A. A., Nicolescu, A., Mocan, A., Farag, M. A. (2025). Multi-targeted MS-based metabolomics fingerprinting of black and white pepper coupled with molecular networking in relation to their *in vitro* antioxidant and antidiabetic effects. RSC advances, 15(34), 27606-27622.

Balasubramanian, S., Kumar, R., Singh, K. K., Zachariah, T. J. (2013). Physico-mechanical properties of black pepper (*Piper nigrum* L.). Journal of Spices & Aromatic Crops, 22(2), 131.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2), 71-79.

Bang, J. S., Oh, D. H., Choi, H. M., Sur, B. J., Lim, S. J., Kim, J. Y., Yang, H.I., Yoo, M. C., Hahm, D. H., Kim, K. S. (2009). Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1β-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis Research & Therapy, 11(2), R49.

Basak, S. S., Candan, F. (2013). Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on α-glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. Iranian Journal Of Pharmaceutical Research:IJPR, 12(2), 367.

Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2009). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC press.

Belahcene, S., Kebsa, W., Omoboyowa, D. A., Alshihri, A. A., Alelyani, M., Bakkour, Y., Leghouchi, E. (2023). Unveiling the chemical profiling antioxidant and anti-inflammatory activities of algerian *Myrtus communis* L. essential oils, and exploring molecular docking to predict the inhibitory compounds against cyclooxygenase-2. Pharmaceuticals, 16(10), 1343.

Benzie, I. F. 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.

Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound applications in food processing. In H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas, J. Weiss (Eds.), Ultrasound technologies for food and bioprocessing (pp. 65–105). Springer.

Bezerra, T. K. A., Araújo, A. R. R., Arcanjo, N. M. D. O., Silva, F. L. H. D., Queiroga, R. D. C. R. D. E., Madruga, M. S. (2016). Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for the analysis of volatile compounds in caprine Coalho cheese using response surface methodology. Food Science and Technology (Campinas), 36(1), 103-110.

Bhardwaj, R. K., Glaeser, H., Becquemont, L., Klotz, U., Gupta, S. K., Fromm, M. F. (2002). Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302(2), 645-650.

Bhattacharya, S. (2012). Prophylactic Role of Dietary Fixed Oils and Fats: A Review. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research Oct-Dec, 2(4), 177–184.

Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Rubiolo, P. (2008). Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. Journal of Chromatography A, 1184(1-2), 220-233.

Billes, F., Mohammed-Ziegler, I. (2007). Vibrational spectroscopy of phenols and phenolic polymers. Theory, experiment, and applications. Applied Spectroscopy Reviews, 42(4), 369-441.

Blagojević, S. M., Blagojević, S. N., Begović, B. M. (2016). Lead, mercury and arsenic content in spices: Black, white and green pepper, black cumin and ginger. Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology, 13(3), 191-202.

Blobaum, A. L., Marnett, L. J. (2007). Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. Journal of Medicinal Chemistry, 50(7), 1425-1441.

Borges, P., Pino, J. (1993). Preparation of black pepper oleoresin by alcohol extraction. Die Nahrung, 37(2), 127–130.

Boss, C. B., Fredeen, K. J. (2004). Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry (3rd ed.). PerkinElmer.Skoog,

Boucher, R., Germain, H., Desgagné-Penix, I. (2025). Exploring the Lesser-Known Bioactive Natural Products of Plant Species of the Genus *Cannabis* L.: Alkaloids, Phenolic Compounds, and Their Therapeutic Potential. Plants, 14(9), 1372.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1), 25-30.

Budhiyanti, S. A., Raharjo, S., Marseno, D. W., Lelana, I. Y. B. (2011). Free radical scavenging, metal chelating and singlet oxygen quenching activity of fractionated brown seaweed Sargassum hystrix extract. Journal of Biological Sciences, 11, 288–298.

Buelga, C. S., González-Paramás, A. M., González-Manzano, S., Dueñas, M. (2015). Analysis and occurrence of flavonoids in foods and biological samples. Recent Advances in Medicinal Chemistry: Volume 2, 10-58.

Burger, E. D., Perkins, T. K., Striegler, J. H. (1981). Studies of wax deposition in the trans Alaska pipeline. Journal of Petroleum Technology, 33(06), 1075-1086.

Cagliero, C., Bicchi, C., Marengo, A., Rubiolo, P., Sgorbini, B. (2022). Gas chromatography of essential oil: State-of-the-art, recent advances, and perspectives. Journal of Separation Science, 45(1), 94-112.

Calderone, R. A., Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology, 9(7), 327-335.

Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC* Trends in Analytical Chemistry, 19(4), 229-248.

Cannon, J. B., Cantrell, C. L., Astatkie, T., Zheljazkov, V. D. (2013). Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. Industrial Crops and Products, 41, 214-220.

Cao, X., Ye, X., Lu, Y., Yu, Y., Mo, W. (2009). Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper. Analytica Chimica Acta, 640(1-2), 47-51.

Carneiro, S. B., Costa Duarte, F. I., Heimfarth, L., Siqueira Quintans, J. D. S., Quintans-Júnior, L. J., Veiga Júnior, V. F. D., Neves de Lima, A. A. (2019). Cyclodextrin–drug inclusion complexes: *In vivo* and *in vitro* approaches. International Journal of Molecular Sciences, 20(3), 642.

Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R. K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 6(2), E329-E357.

Chandran, J., Amma, K. P. P., Menon, N., Purushothaman, J., Nisha, P. (2012). Effect of enzyme assisted extraction on quality and yield of volatile oil from black pepper and cardamom. Food Science and Biotechnology, 21(6), 1611-1617.

Chandran, J., Nayana, N., Roshini, N., Nisha, P. (2017). Oxidative stability, thermal stability and acceptability of coconut oil flavored with essential oils from black pepper and ginger. Journal of Food Science and Technology, 54(1), 144-152.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3), 178−182.

Chaudhary, M., Garg, A. P. (2023). Bioactive compounds from plants and animals: A review. International Journal of Advanced Biochemistry Research, 7(1), 105-117.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry, 34, 540-560.

Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. International Journal of Molecular Sciences, 13(7), 8615-8627.

Cheng, N., Yi, W. B., Wang, Q. Q., Peng, S. M., Zou, X. Q. (2014). Synthesis and α-glucosidase inhibitory activity of chrysin, diosmetin, apigenin, and luteolin derivatives. Chinese Chemical Letters, 25(7), 1094-1098.

Chialva F., Gabri G., Liddle P. A. P., Ulian F. (1982). Qualitative evaluation of aromatic herbs by direct headspace GC analysis. Applications of the method and comparison with the traditional analysis of essential oils. Journal of High Resolution Chromatography, 5, 182.

Choi, J. S., Lee, J. H., Min, B. S. (2017). Alkaloids from *Piper nigrum* exhibit antiinflammatory activity via activating the Nrf2/HO1 pathway. Phytotherapy Research, 31(4), 663-670.

Chong, W. H., Chin, S. F., Pang, S. C., Kok, K. Y. (2020). Synthesis and characterisation of piperine-loaded starch nanoparticles. Journal of Physical Science, 31(1), 57-68.

Chopra, B., Dhingra, A. K., Kapoor, R. P., Prasad, D. N. (2016). Piperine and its various physicochemical and biological aspects: A review. Open Chemistry Journal, 3(1), 75-96.

Christie, W. W., Han, X. (2010). Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis. Elsevier, New Jersey.

Christoforides, E., Andreou, A., Papaioannou, A., Bethanis, K. (2022). Structural studies of piperine inclusion complexes in native and derivative β-cyclodextrins. Biomolecules, 12(12), 1762.

Cicero, N., Gervasi, T., Durazzo, A., Lucarini, M., Macrì, A., Nava, V., Santini, A. (2022). Mineral and microbiological analysis of spices and aromatic herbs. Foods. 11(4), 548.

Ciesla, L.M., Wojtunik-kulesza, K.A., Oniszczuk, A., Waksmundzka-hajnos, M. (2016). Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Flavour and Fragrance Journal, 31(6), 412-419.

Claridge, T. D. (2016). High-resolution NMR techniques in organic chemistry (Vol. 27). Elsevier.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology, 106(3), 290-302.

Cullity, B. D., Stock, S. R. (2001). Elelments of X-ray Diffraction. Prentice-Hall.

D'Aria, F., Pagano, B., Giancola, C. (2022). Thermodynamic properties of hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin/guest interaction: a survey of recent studies. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 147(8), 4889-4897.

Dahabra, L., Broadberry, G., Le Gresley, A., Najlah, M., Khoder, M. (2021). Sunscreens containing cyclodextrin inclusion complexes for enhanced efficiency: A strategy for skin cancer prevention. Molecules, 26(6), 1698.

Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313-7352.

Dang, Q. T., Phan, N. N. (2014). Optimization of supercritical CO 2 extraction of oleoresin from black pepper (*Piper nigrum* L.) and antioxidant capacity of the oleoresin. International Food Research Journal, 21(4), 1489-1493.

Dao, T. P., Tran, T. H., Nhan, N. P. T., Quyen, N. T. C., Tien, L. X., Anh, T. T., Linh, H. T. K. (2020). Optimization of essential oil yield from Vietnamese green pepper (*Piper nigrum*) using hydro-distillation method. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 736(2), 022039).

Daulatabad, C. D., Mulla, G. M., Mirajkar, A. M. (1995). Vernolic and cyclopropenoic fatty acids in *Piper nigrum* seed oil. Lipid/Fett, 97(12), 453-454.

Dawid, C., Henze, A., Frank, O., Glabasnia, A., Rupp, M., Büning, K., Hofmann, T. (2012). Structural and sensory characterization of key pungent and tingling compounds from black pepper (*Piper nigrum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(11), 2884-2895.

Dhas, P. A., Korikanthimath, V. S. (2003). Processing and quality of black pepper: a review. Journal of Spices and Aromatic Crops, 12(1), 1-14.

Dhiman, P., Malik, N., Khatkar, A. (2020). Natural based piperine derivatives as potent monoamine oxidase inhibitors: an *in silico* ADMET analysis and molecular docking studies, BMC Chemistry, 14(1), 1-16.

Dimitrijević, M., Jovanović, V. S., Cvetković, J., Mihajilov-Krstev, T., Stojanović, G., Mitić, V. (2015). Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. Analytical Methods, 7(10), 4181-4191.

Dinh, P. N., Cam, H. D. T., Quoc, T. P. (2020). Comparison of essential oil extracted from black pepper by using various distillation methods in laboratory scale. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 991(1), 012050.

Dinis T.C., Madeira V.M., Almeida L.M., (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers, Archives of Biochemistry and Biophysics, 315, 161–169.

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315(1), 161–169.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis, 22(3), 296-302.

Dosoky, N. S., Satyal, P., Barata, L. M., da Silva, J. K. R., Setzer, W. N. (2019). Volatiles of black pepper fruits (*Piper nigrum* L.). Molecules, 24(23), 4244.

Dudhatra, G. B., Mody, S. K., Awale, M. M., Patel, H. B., Modi, C. M., Kumar, A., Kamani, D.R., Chauhan, B. N. (2012). A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. The Scientific World Journal, 2012(1), 637953.

Dudhatra, G. B., Mody, S. K., Awale, M. M., Patel, H. B., Modi, C. M., Kumar, A., ... & Chauhan, B. N. (2012). A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. The Scientific World Journal, 2012(1), 637953.

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. Journal of agricultural and food chemistry, 57(5), 1768-1774.

Dutta, S., Bhattacharjee, P. (2015). Enzyme-assisted supercritical carbon dioxide extraction of black pepper oleoresin for enhanced yield of piperine-rich extract. Journal of Bioscience and Bioengineering, 120(1), 17-23.

Dutta, S., Bhattacharjee, P. (2016). Modeling of supercritical carbon dioxide extraction of piperine from Malabar black pepper. Materials Today: Proceedings, 3(10), 3238-3252.

EFSA (European Food Safety Authority). (2022). Scientific opinion on the re-evaluation of black pepper oleoresin (E 160i). EFSA Journal, 20(11), 7599

El Omari, N., Mrabti, H. N., Benali, T., Ullah, R., Alotaibi, A., Abdullah, A. D. I., & Bouyahya, A. (2023). Expediting multiple biological properties of limonene and α-pinene: main bioactive compounds of *Pistacia lentiscus* L., essential oils. Frontiers in Bioscience-Landmark, 28(9), 229.

El-Agbar, Z. A., Naik, R. R., Shakya, A. K. (2018). Fatty acids analysis and antioxidant activity of fixed oil of *Quercus infectoria* grown in Jordan. Oriental Journal of Chemistry, 34(3), 1368.

El-Nashar, H. A., Shabana, E. S., Kamli, H., Shaikh, A., Adel, M. (2024). Chemical composition of leaf essential oil of *Schinopsis lorentzii* and its inhibitory effects against key enzymes relevant to type-2 diabetes: an emphasis on GC-MS chemical profiling and molecular docking studies. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 27(3), 731-743.

Elshafie, H. S., Camele, I., Mohamed, A. A. (2023). A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3266.

Enyang, D., Sonibare, M. A., Tchamgoue, A. D., Tchokouaha, L. R., Yadang, F. S., Nfor, G. N., Kom, C. W., Betote, P. D. H., Tchinda, C. F., Tiogo, S. S. K., Agbor, G. A. (2024). Protective and Ameliorative Effects of Hydroethanolic Extract of *Piper nigrum* (L.) Stem against Antiretroviral Therapy-Induced Hepatotoxicity and Dyslipidemia in Wistar Rats. Journal of Toxicology, 2024(1), 5811080.

European pharmacopoeia, Ph. Eur. 7, (2010). European Pharmacopoeia Commission, & European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, Council of Europe.

European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) Supplement 11.1. (2022). European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe.

Ezawa, T., Inoue, Y., Tunvichien, S., Suzuki, R., Kanamoto, I. (2016). Changes in the Physicochemical Properties of Piperine/β-Cyclodextrin due to the Formation of Inclusion Complexes. International Journal of Medicinal Chemistry, 2016(1), 8723139.

FAO/WHO, Contaminants. In Codex Alimentarius, vol. XVII,Edition 1. FAO/WHO, Codex Alimentarius Commision, Rome, 1984.

Farooq, M. A., Dietz, K. J. (2015). Silicon as versatile player in plant and human biology: overlooked and poorly understood. Frontiers in Plant Science, 6, 994.

Fatoki, O. S. (2000). Trace zinc and copper concentrations in roadside vegetation and surface soils: A measurement of local atmospheric pollution in Alice, South Africa. International Journal of Environmental Studies, 57(5), 501-513.

Fenyvesi, É., Sohajda, T. (2022). Cyclodextrin-enabled green environmental biotechnologies. Environmental Science and Pollution Research, 29(14), 20085-20097.

Ferreira, S. R. S., Meireles, M. A. A., Cabral, F. A. (1993). Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. Journal of Food Engineering, 20(2), 121-133.

Ferreres, F., Sousa, C., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gil-Izquierdo, A. (2007). New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(25), 10187-10193.

Feudjieu, E. G., Kemegne, G. A., Tchinda, F. C., Tchamgoue, D. A., Ndedi, E. D. F. M., Matchuenkam, G. S., Agbor, G. A. (2023). Synergistic effects of essential oils and antibiotics against some bacterial strains. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 13(6), 73-82.

Fidyt, K., Fiedorowicz, A., Strządała, L., Szumny, A. (2016). *β*-caryophyllene and *β*-caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. Cancer medicine, 5(10), 3007-3017.

Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C., Batista, M. T. (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. Food Chemistry, 110(3), 718-728.

Filip, S., Vidović, S., Adamović, D., Zeković, Z. (2014). Fractionation of non-polar compounds of basil (*Ocimum basilicum* L.) by supercritical fluid extraction (SFE). The Journal of Supercritical Fluids, 86, 85-90.

Flannigan, D. J., Suslick, K. S. (2010). Inertially confined plasma in an imploding bubble. Nature Physics, 6(8), 598-601.

Flora, S. J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2(4), 191-206.

Forsythe, S. J. (2010). *The microbiology of safe food* (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Friebolin, H. (2011). Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy (5th ed.). Wiley-VCH.

Gaikar, V. G., Raman, G. (2002). Process for extraction of piperine from piperspecies. Google Patents, U.S. Patent No. 6,365,601. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., Khan, Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. Antioxidants, 8(2), 35.

Glišić, S. (2003). Fractionation of *Juniper communis* L. essential oil. Diploma work, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia.

Glišić, S. B., Mišić, D. R., Stamenić, M. D., Zizovic, I. T., Ašanin, R. M., Skala, D. U. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. Food Chemistry, 105(1), 346-352.

Gómez-Calvario, V., & Rios, M. Y. (2019). 1H and 13C NMR data, occurrence, biosynthesis, and biological activity of *Piper* amides. Magnetic Resonance in Chemistry, 57(12), 994-1070.

Gonzalez-Paz, L. A., Lossada, C. A., Moncayo, L. S., Romero, F., Paz, J. L., Vera-Villalobos, J., Pérez, A. E., San-Blas, E., Alvarado, Y. J. (2020). Theoretical molecular docking study of the structural disruption of the viral 3CL-protease of COVID19 induced by binding of capsaicin, piperine and curcumin part 1: A comparative study with chloroquine and hydrochloroquine two antimalaric drugs, preprint.

Gorgani, L., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., Nikzad, M. (2017). Sequential microwave-ultrasound-assisted extraction for isolation of piperine from black pepper (*Piper nigrum* L.). Food and Bioprocess Technology, 10(12), 2199-2207

Gou, G. H., Liu, L., Abdubakiev, S., Xin, X. L., Akber Aisa, H., Li, J. (2023). Anti-diabetic effects and molecular mechanisms of amide alkaloids from *Piper longum* based on network pharmacology integrated with cellular assays. Chemistry & Biodiversity, 20(1), e202200904.

Griffiths, P. R., de Haseth, J. A. (2007). Fourier transform infrared spectrometry (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Grizo A. (1987). Luženje, Hemijsko-tehnološki priručnik (N. Radošević, ured.), Knjiga 5, Hemijsko inženjerstvo, IRO Rad, Beograd, str. 494-505.

Gross, J. H. (2017). Mass Spectrometry: A Textbook (3rd ed.). Cham: Springer.

Gu, Y., Lv, B., Nian, X., Xie, X., Yang, X. (2025). Optimized Extraction, Comprehensive Chemical Profiling, and Antioxidant Evaluation of Volatile Oils from *Wurfbainia villosa* (Lour.) Škorničk. & AD Poulsen Leaves. Plants, 14(13), 2041.

Gude, V. G. (2015). Synergism of microwaves and ultrasound for advanced biorefineries. Resource-Efficient Technologies, 1(2), 116-125.

Guenther, E. (1952). Recent developments in essential oil production. Economic Botany, 6(4), 355-378.

ICH, Guideline, I. (1996). Q1B: photostability testing of new drug substances and products. Secretariat, Geneva, Switzerland.

Gülçin, İ. (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56(7), 491-499.

Gulcin, İ., Alwasel, S. H. (2022). Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. Processes, 10(1), 132.

Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology, 90(2-3), 205-215.

Güneş, F., Çeçen, Ö., Özer, E. B., Yuca, H., Aydın, B., Demirci, B., Karakaya, S. (2026). Comparative phytochemical profiling, enzyme inhibitory activities, and *in silico* pharmacokinetic insights of essential oils and extracts from *Origanum leptocladum* Boiss. and *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (link) A. Terracc. Natural Product Research, 1-6.

Gupta, N., Parashar, P., Mittal, M., Mehra, V., Khatri, M., Rajguru, S. (2014). Antibacterial potential of *Elletaria cardamomum*, *Syzygium aromaticum* and *Piper nigrum*, their synergistic effects and phytochemical determination. Journal of Pharmacy Research. 8(8), 1091-1097.

Gupta, R. A., Motiwala, M. N., Dumore, N. G., Danao, K. R., Ganjare, A. B. (2015). Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice. Journal of Ethnopharmacology, 164, 239-246.

Hailemichael, G., Tilahun, D., Tsegaw, T. (2009). Physical parameters, oleoresin and volatile oil contents of five pepper (*Piper nigrum* L.) cultivars as influenced by maturity. East African Journal of Sciences, 3(2), 189-192.

Haines, P. J. (2002). Principles of Thermal Analysis and Calorimetry. Royal Society of Chemistry.

Hamrapurkar, P. D., Jadhav, K., Zine, S. (2011). Quantitative estimation of piperine in *Piper nigrum* and *Piper longum* using high performance thin layer chromatography. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 1(3), 117-120.

Harold, M. (2004). On Food and Cooking, Revised Edition, Scribner, New York, p. 427-429.

Hartman, L., Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice, 22(6), 475-476.

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(2), 251-258.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. Food Chemistry, 98(1), 136-148.

Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. Journal of Chromatography a, 1217(16), 2495-2511.

Hidalgo, G. I., Almajano, M. P. (2017). Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. Antioxidants, 6(1), 7.

Hien, L. T. M., Dao, D. T. A. (2022). Antibacterial activity of black pepper essential oil nanoemulsion formulated by emulsion phase inversion method. Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 10(1), 311-320.

Higuchi, T., Connors, K. (1965). Phase solubility techniques. Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation, 7, 117-212.

Hikal, D. M. (2018). Antibacterial activity of piperine and black pepper oil, Biosciences Biotechnology Research Asia, 15(4), 877-880.

Hirasa K, Takemasa M. (1998). Spice science and technology. Boca Raton, Fla.: CRC Press.

Hirayama, F., Uekama, K. (1999). Cyclodextrin-based controlled drug release system. Advanced Drug Delivery Reviews, 36(1), 125-141.

Hossain, M. D., Paul, B. K., umar Roy, S., Saha, G. C., Begum, F., Huq, D. (2014). Studies on fatty acids composition and some valuable nutrients of *Piper nigrum* Linn.(Gol Morich). Dhaka University Journal of Science, 62(2), 65-68.

Hu, C. J., Gao, Y., Liu, Y., Zheng, X. Q., Ye, J. H., Liang, Y. R., Lu, J. L. (2016). Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. Food Chemistry, 194, 312-318.

Hu, Z., Zhu, X., Dong, G., Naibaho, J., Hannon, S., Sun, D. W., Tiwari, B. K. (2025). Valorization of potato by-products as a source of plant proteins: novel extraction techniques and potential applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 65(28), 5666-5682.

Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 373(1), 23-30.

Hwang, Y. P., Yun, H. J., Kim, H. G., Han, E. H., Choi, J. H., Chung, Y. C., Jeong, H. G. (2011). Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKCα/ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. Toxicology Letters, 203(1), 9-19.

Ilić, M.D., Jovanović, V.P.S., Mitić, V.D., Jovanović, O.P., Mihajilov-Krstev, T.M., Marković, M.S., Stojanović, G.S., (2015). Comparison of chemical composition and biological activities of Seseli rigidum fruit essential oils from Serbia. Open Chemistry, 13(1), 42-51.

Inam, F., Deo, S., Narkhede, N. (2013). Analysis of minerals and heavy metals in some spices collected from local market. Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences. 8(2), 40-43.

Induruwa, V. A. D. C. S. I., Jittanit, W., Lorjaroenphon, Y. (2022). Application of ohmic heating for black pepper (*Piper nigrum* L.) oleoresin extraction compared with conventional heating. Journal of Food Processing and Preservation, 46(7), e16568.

International Organization for Standardization. (2008). ISO 3061:2008. Oil of black pepper (*Piper nigrum* L.) — Specification**.** Geneva: ISO.

Ismail, M., Kemegne, G. A., Njayou, F. N., Penlap, V., Mbacham, W. F., & Kamdem, S. L. S. (2017). Chemical composition, antibiotic promotion and in vivo toxicity of *Piper nigrum* and *Syzygium aromaticum* essential oil. African Journal of Biochemistry Research, 11(10), 58-71.

Ito, N., Hirose, M., Fukushima, H., Tsuda, T., Shirai T., Tatenatsu, M. (1986). Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogens. Food and Chemical Toxicology, 24, 1071-1092.

Jadhav, P. (2021). Piperine-hydroxy acid-cyclodextrin inclusion complexes; antioxidant, antiinflammatory, and stability studies: PART II. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP), 15(1), 130-140.

Jansook, P., Ogawa, N., Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics, 535(1-2), 272-284.

Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. Food Chemistry, 73(3), 285-290.

Jeena, K., Liju, V. B., Umadevi, N. P., Kuttan, R. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of black pepper essential oil (*Piper nigrum* Linn). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(1), 1–12.

Jeleń, H. H., Gracka, A. (2015). Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction–gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. Journal of Chromatography A, 1418, 200-209.

Jo, H., Cha, B., Kim, H., Brito, S., Kwak, B. M., Kim, S. T., Lee, M. G. (2021a). α-Pinene enhances the anticancer activity of natural killer cells via ERK/AKT pathway. International Journal of Molecular Sciences, 22(2), 656.

Jo, Y. J., Cho, H. S., Chun, J. Y. (2021b). Antioxidant activity of β-cyclodextrin inclusion complexes containing trans-cinnamaldehyde by DPPH, ABTS and FRAP. Food Science and Biotechnology, 30(6), 807-814.

Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(1), 5-23.

Johari, A., Khan, M. H. (2022). Evaluation of antioxidant activity of essential oils of some Indian medicinal plants by DPPH, FRAP and ABTS assay. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 2602-2607.

Jugoslovenska farmakopeja Ph. Jug. V, Vol. 1. (2000). Savremena administracija, Beograd.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10), 3954-3962.

Kalemba, D. A. A. K., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10(10), 813-829.

Kapoor, I. P. S., Singh, B., Singh, G., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., Catalan, C. A. (2009). Chemistry and *in vitro* antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(12), 5358-5364.

Karpiński, T., Adamczak, A., Ożarowski, M. (2019). Antibacterial activity of apigenin, luteolin, and their C-glucosides. In Proceedings of the 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (pp. 1-9).

Karsha, P. V., Lakshmi, O. B. (2010). Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) with special reference to its mode of action on bacteria. Indian Journal of Natural Products and Resources, 1(2), 213-215.

Keerthana, B., Roy, A., Rajeshkumar, S., Thangavelu, L. (2021). White pepper oleoresin mediated selenium nanoparticles — its antidiabetic and cytotoxic effects. Journal of Complementary Medicine Research, 12(4), 107–113.

Khade, O. S., Sruthi, K., Sonkar, R. M., Gade, P. S., Bhatt, P. (2023). Plant secondary metabolites: extraction, screening, analysis and their bioactivity. International Journal of Herbal Medicine, 11(2), 01-17.

Khan, A. U., Ali, S., Rehman, A. U., Ali, H., Ahmad, T., Waqar, M., Niaz, Z. (2013). Antibacterial activity of *Nigella sativa* and *Piper nigrum*. Asian Journal of Natural and Applied Sciences, 2(4), 173-179.

Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. Food Chemistry, 119(2), 851-858.

Khaw, K. Y., Parat, M. O., Shaw, P. N., Falconer, J. R. (2017). Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. Molecules, 22(7), 1186.

Khokhar, S., Apenten, R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. Food Chemistry, 81(1), 133-140.

Kim, A., Lee, C. S. (2018). Apigenin reduces the Toll-like receptor-4-dependent activation of NF-κB by suppressing the Akt, mTOR, JNK, and p38-MAPK. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 391(3), 271-283.

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3713–3717.

Kim, H. G., Han, E. H., Jang, W. S., Choi, J. H., Khanal, T., Park, B. H., & Jeong, H. G. (2012). Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF-κB, C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. Food and Chemical Toxicology, 50(7), 2342-2348.

Kopjar, M., Lončarić, A., Mikulinjak, M., Šrajbek, Ž., Šrajbek, M., Pichler, A. (2016). Evaluation of antioxidant interactions of combined model systems of phenolics in the presence of sugars. Natural Product Communications, 11(10), 1934578X1601101008.

Kotte, S. C. B., Dubey, P. K., Murali, P. M. (2014). Identification and characterization of stress degradation products of piperine and profiling of a black pepper (*Piper nigrum* L.) extract using LC/Q-TOF-dual ESI-MS. Analytical Methods, 6(19), 8022-8029.

Kozukue, N., Park, M. S., Choi, S. H., Lee, S. U., Ohnishi-Kameyama, M., Levin, C. E., Friedman, M. (2007). Kinetics of Light-Induced *cis−trans* isomerization of four piperines and their levels in ground black peppers as determined by HPLC and LC/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(17), 7131-7139.

Kranl, K., Schlesier, K., Bitsch, R., Hermann, H., Rohe, M., Bohm, V., (2005). Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays. Food Chemistry, 93, 171–175.

Krishna, A. G., Lokesh, B. R., Sugasini, D., Kancheva, V. D. (2010). Evaluation of the antiradical and antioxidant properties of extracts from Indian red chili and black pepper by *in vitro* models. Bulgarian Chemical Communications, 42, 62-69.

Ku, S. K., Lee, I. C., Kim, J. A., Bae, J. S. (2014). Anti-septic effects of pellitorine in HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. Inflammation, 37(2), 338-348.

Kumar, S., Malhotra, S., K Prasad, A., V Van der Eycken, E., E Bracke, M., G Stetler-Stevenson, W., & Ghosh, B. (2015). Anti-inflammatory and antioxidant properties of Piper species: a perspective from screening to molecular mechanisms. Current Topics in Medicinal Chemistry, 15(9), 886-893.

Kumar, S., Sharma, S., Vasudeva, N. (2013). Screening of antidiabetic and antihyperlipidemic potential of oil from *Piper longum* and piperine with their possible mechanism. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 14(13), 1723-1736.

Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: introduction. U: K.G. Ramawat, J.M. Mérillon. Natural Products. Springer Berlin Heidelberg, 1543-1580.

Lavanya, R., Maheshwari, S. U., Harish, G., Raj, J. B., Kamali, S., Hemamalani, D., Varma, J.B., Reddy, C. U. (2010). Investigation of *in-vitro* anti-inflammatory, anti-platelet and anti-arthritic activities in the leaves of *Anisomeles malabarica* Linn. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 1(4), 745-752.

Le, X. T., Nguyen, N. T., Nguyen-Thi, B. T., Dang, M. K., Ngo-Thi, T. N., Vu, D. P., Duong-Nguyen, H. N., Pham-Vu, M. C. (2024). Optimization of piperine extraction process from Vietnamese White Pepper. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1340(1), 012020.

Lee, H. Y., Ko, M. J. (2021). Thermal decomposition and oxidation of *β*-caryophyllene in black pepper during subcritical water extraction. Food Science and Biotechnology, 30(12), 1527-1533.

Lee, J. G., Chae, Y., Shin, Y., Kim, Y. J. (2020). Chemical composition and antioxidant capacity of black pepper pericarp. Applied Biological Chemistry, 63(1), 35.

Lertnitikul, N., Suttisri, R., Sitthigool, S., Pattamadilok, C., Piewpong, K., Khanboon, A., Liangsakul, J., Boonyong, C. (2023). Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Amides and Aristolactams from *Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz. Stems. Journal of Biologically Active Products From Nature, 13(2), 94-104.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 47, 1-11.

Liang, J., Sun, J., Chen, P., Frazier, J., Benefield, V., Zhang, M. (2021). Chemical analysis and classification of black pepper (*Piper nigrum* L.) based on their country of origin using mass spectrometric methods and chemometrics. Food Research International, 140, 109877.

Lim, H. J., Bak, S. G., Park, E. J., Ku, S. K., Lee, S., Lee, S. W., Lee, K. M., Lee, S. J., Rho, M. C. (2020). Retrofractamide C derived from *Piper longum* alleviates xylene-induced mouse ear edema and inhibits phosphorylation of ERK and NF-κB in LPS-induced J774A. 1. Molecules, 25(18), 4058.

Lim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants (Vol. 4, pp. 322-350). Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Lin, J. Y., Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry, 101(1), 140-147.

Liu, W., Wang, X., Fan, X., Zhou, D., Hu, W., Liu, X., Zhu, J. (2023). Glucose-Triggered Release of trans-N-p-Coumaroyltyramine from Zeolitic Imidazolate Framework-8 (ZIF8) Modified with *Dioscorea opposita* Thunb Polysaccharide. Langmuir, 39(26), 9069-9077.

Liu, Y., Yadev, V. R., Aggarwal, B. B., Nair, M. G. (2010). Inhibitory effects of black pepper (*Piper nigrum*) extracts and compounds on human tumor cell proliferation,

cyclooxygenase enzymes, lipid peroxidation and nuclear transcription factor-kappa-B, Natural Product Communications, 5(8),1253-1257.

Loftsson, T., Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences, 85(10), 1017-1025.

Lucchesi, M. E., Chemat, F., Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. Journal of Chromatography a, 1043(2), 323-327.

Lwamba, C., Musonge, P., Lamoolphak, W. (2023). Innovative green approach for extraction of piperine from black pepper using natural deep eutectic solvents (NADES). Journal of Food Processing and Preservation, 47(5), e17356.

Maazaoui, R., Abderrahim, R. (2015). Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization. International Journal of Advanced Research, 3(2), 1030.

Madhusankha, G. D. M. P., Siow, L. F., Thoo, Y. Y. (2023). Efficacy of green solvents in pungent, aroma, and color extractions of spice oleoresins and impact on phytochemical and antioxidant capacities. Food Bioscience, 56, 103171.

Magaña-Barajas, E., Buitimea-Cantúa, G. V., Hernández-Morales, A., Torres-Pelayo, V. D. R., Vázquez-Martínez, J., Buitimea-Cantúa, N. E. (2021). *In vitro* α-amylase and α-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant activity by capsaicin and piperine from *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 56(3), 282-291.

Marković, M. S. (2018). Frakciona hidrodestilacija i rektifikacija etarskog ulja ploda kleke (*Juniperus communis* L.) (Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet).

Martinelli, L., Rosa, J. M., Ferreira, C. D. S. B., Nascimento, G. M. D. L., Freitas, M. S., Pizato, L. C., Santos, W. de O., Pires, R. F., Okura, M. H., Malpass, G. R. P., Granato, A. C. (2017). Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. Ciência Rural, 47(5), e20160899.

Martini, D., Taddei, F., Nicoletti, I., Ciccoritti, R., Corradini, D., D'Egidio, M. G. (2014). Effects of genotype and environment on phenolic acids content and total antioxidant capacity in durum wheat. Cereal Chemistry, 91(4), 310-317.

Mason, T. J., Peters, D. (2002). Practical sonochemistry: Power ultrasound uses and applications. Woodhead Publishing.

Matsuda, H., Ninomiya, K., Morikawa, T., Yasuda, D., Yamaguchi, I., Yoshikawa, M. (2008). Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on d-galactosamine/TNF-α-induced cell death in mouse hepatocytes. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18(6), 2038-2042.

Mayuresh, D., Madhura, M. (2025). Functional group profiling of medicinal plants using FTIR spectroscopy. World Journal Of Biology Pharmacy And Health Sciences, 21(1), 243-249.

Meghwal, M., Goswami, T. K. (2011). Effect of moisture content on physical properties of black pepper. Journal of Agricultural Engineering, 48(2), 8-14.

Meghwal, M., Goswami, T. K. (2012). Chemical Composition, Nutritional, Medicinal And Functional Properties of Black Pepper: A Review. Journal of Food Processing & Technology, 1(2), 172.

Mgbeahuruike, E. E., Fyhrquist, P., Vuorela, H., Julkunen-Tiitto, R., Holm, Y. (2018). Alkaloid-rich crude extracts, fractions and piperamide alkaloids of *Piper guineense* possess promising antibacterial effects. Antibiotics, 7(4), 98.

Michalke, K., Schmidt, A., Huber, B., Meyer, J., Sulkowski, M., Hirner, A.V., Boertz, J., Mosel, F., Dammann, P., Hilken, G., Hedrich, H.J., Dorsch, M., Rettenmeier, A.W.,

Hensel, R. (2008). Role of intestinal microbiota in transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. Applied and Environmental Microbiology. 74, 3069–3075.

Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M. L., Simões, M. T. F., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2011). *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. Natural Product Research, 25(5), 526-541.

Milenković, A. N., Stanojević, L. P. (2021). Black pepper: Chemical composition and biological activities. Advanced Technologies, 10(2), 40-50.

Milenković, A., (2018). Hemijski sastav i biološka aktivnost ekstrakata i etarskih ulja crnog bibera (*Piper nigrum* L.), kubeba bibera (*Piper cubeba* L.) i najkvirca (*Pimenta dioica* (L.) Merr), (Diplomski rad, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu).

Milenković, A., Aleksovski, S., Miteva, K., Milenković, L., Stanojević, J., Nikolić, G., Ilić, Z., Stanojević, L. (2025). The Effect of Extraction Technique on the Yield, Extraction Kinetics and Antioxidant Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Ethanolic Extracts. Horticulturae, 11(2), 125.

Milenković, A., Savić, S., Nikolić, V., Stanojević, J., Cvetković, D., Nikolić, G., Stanojević, L. (2023). *In vitro* antihyperglycemic activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) fructus ethanolic extracts. Archives of Pharmacy, 73(Suppl. 4), S69-S70.

Milenković, A., Stanojević, J. Stanojević, L. (2022). Comparative analysis of chemical composition and antioxidant activity of essential oil and hydrolate from black pepper fruit (*Piper nigrum* L.). Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 41(2), 209-220.

Milenković, A., Stanojević, J., Cvetković, D., Stanojević, L. (2024). Chemical composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) fructus essential oil hydrodistillation fractions. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 27(1), 166-176.

Milojević, S. Ž. (2011). Kinetika hidrodestilacije, karakterizacija i frakcionisanje etarskog ulja ploda kleke (*Juniperus communis* L.) (Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu-Tehnološko-metalurški fakultet).

Mimica-Đukić N. (1992). Ispitivanje sekundarnih biomolekula u nekim vrstama roda Mentha, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Misharina, T. A. (2016). Antiradical properties of essential oils and extracts from coriander, cardamom, white, red, and black peppers. Applied Biochemistry and Microbiology, 52(1), 79–86.

Mitić, S., Janković, S. (2017). Kinetika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, Master rad, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet.

Mollik, M. A., Rahman, M. S., Khan, A. A., Malik, A., Mondal, T. K., Islam, M. R., Alexiou, A., Papadakis, M. (2024). Investigation of *in-vitro* hypoglycaemic activity of the different fractions of black pepper (*Piper nigrum*). Results in Chemistry, 11, 101780.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(2), 211-219.

Moore W. (1975), Fizička hemija, IV izdanje, prevod sa engleskog, Naučna knjiga, Beograd

Morshed, S., Hossain, M. D., Ahmad, M., Junayed, M. (2017). Physicochemical characteristics of essential oil of black pepper (*Piper nigrum*) cultivated in Chittagong, Bangladesh. Journal of Food Quality and Hazards Control, 4(3), 66-69.

Morsy, N. F. S., Abd El-Salam, E. A. (2017). Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oil and Oleoresin. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 20(3), 779–790.

Moyer, D. A., Heath, H. B. (1988). Liquid carbon dioxide extraction of essential oils. In B. M. Lawrence, B. D. Mookherjee, B. J. Willis (Eds.), Flavors and fragrances: A world perspective: Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances, and Flavors, Washington, DC, U.S.A., 16–20 November 1986 (pp. 41–63). Elsevier.

Muharini, R., Liu, Z., Lin, W., Proksch, P. (2015). New amides from the fruits of *Piper retrofractum*. Tetrahedron Letters, 56(19), 2521-2525.

Mukhopadhyay, M. (2000). Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC press.

Murthy, C. T., RANI, M., Rao, P. S. (1999). Optimal grinding characteristics of black pepper for essential oil yield. Journal of Food Process Engineering, 22(2), 161-173.

Mustafa, A., Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. Analytica Chimica Acta, 703(1), 8-18.

Mustikaningrum, M., Arista, D., Nyamiati, R. D., Nanda, D. E. (2023). Evaluation of Diffusivity Values and Extraction Speed Constants on Black Pepper Piperine Isolation. Eksergi, 20(2), 47-51.

Naczk, M., Shadidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.

Nagavekar, N., Singhal, R. S. (2018). Enhanced extraction of oleoresin from *Piper nigrum* by supercritical carbon dioxide using ethanol as a co-solvent and its bioactivity profile. Journal of Food Process Engineering, 41(1), e12670.

Nahak, G., Sahu, R. K. (2011). Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 01(08), 153-157.

Nair, K. P. P. (2011). Agronomy and economy of Black Pepper and Cardamom: The" King" and" Queen" of Spices. Elsevier Science, London, p. 1-90.

Nair, K. P. P. (2020). The geography of black pepper (*Piper nigrum*): The "king" of spices (Vol. 1, p. 11). Springer Nature Switzerland AG, p. 1-30.

Naji, E. F., Abdulfatah, H. F., Hashim, K. S. (2024). Plant Secondary Metabolites, Their Classification and Biological Roles: A Review. Journal of University of Anbar for Pure Science, 18(1), 106-115.

Nasiruddin, N., Chen, G. Y., Yu, Z. X., Zhao, T. (2020). Endophytes of terrestrial plants: A potential source of bioactive secondary metabolites. Journal of Food and Nutrition Research, 8(7), 362–377.

Ncube, N. S., Afolayan, A. J., Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. African Journal of Biotechnology, 7(12), 1797-1806.

Nelson, S. C., Cannon-Eger, K. T. (2011). Black pepper. Farm and Forestry Production, 45(1), 14.

Newman, D. J., Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products, 83(3), 770-803.

Newman, D. J., Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products, 79(3), 629–661.

Ngo, Q. T., Tran, P. T., Tran, M. H., Kim, J. A., Rho, S. S., Lim, C. H., Kim, J. C., Woo, M. H., Choi, J. S., Lee, J. H., Min, B. S. (2017). Alkaloids from Piper nigrum exhibit antiinflammatory activity via activating the Nrf2/HO1 pathway. Phytotherapy Research, 31(4), 663-670.

Nicolaescu, O. E., Belu, I., Mocanu, A. G., Manda, V. C., Rău, G., Pîrvu, A. S., Ionescu, C., Ciulu-Costinescu, F, Popescu, M., Ciocîlteu, M. V. (2025). Cyclodextrins: Enhancing drug delivery, solubility and bioavailability for modern therapeutics. Pharmaceutics, 17(3), 288.

Nikitin, S. (2020). Structure elucidation and complete assignment of 1H and 13C NMR data of piperine. Magnetic Resonance in Chemistry, 20(1), 1-4.

Nikolai, P., Rabiyat, B., Aslan, A., Ilmutdin, A. (2019). Supercritical CO_2: properties and technological applications-a review. Journal of Thermal Science, 28(3), 394-430.

Nikolić, L., Urošević, M., Nikolić, V., Gajić, I., Dinić, A., Miljković, V., Rakić, S., Đokić, S., Kesić, J., Ilić-Stojanović, S., Nikolić, G. (2023). The formulation of curcumin: 2-hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin complex with smart hydrogel for prolonged release of curcumin. Pharmaceutics, 15(2), 382.

Nikolić, M., Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Marković, T., Smiljković, M., Soković, M. (2015). Could essential oils of green and black pepper be used as food preservatives?. Journal of Food Science and Technology, 52(10), 6565-6573.

Nikolić, V. D. (2003). Sinteza i karakterizacija alicina, njegovih derivata i inkluzionih kompleksa. (Doktorska disertacija). Univerzitet u Nišu.

Nikolić, V. D., Ilić-Stojanović, S. S., Nikolić, L. B., Cakić, M. D., Zdravković, A. S., Kapor, A. J., Popsavin, M. M. (2014). Photostability of piroxicam in the inclusion complex with 2-hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin. Hemijska Industrija, 68(1), 107-116.

Nikolić, V., Ilić, D., Nikolić, L., Stanković, M., Cakić, M., Stanojević, L., Kapor, A., Popsavin, M. (2010). The protection of Nifedipin from photodegradation due to complex formation with *β*-cyclodextrin. Central European Journal of Chemistry, 8(4), 744-749.

Nimni, M. E., Han, B., Cordoba, F. (2007). Are we getting enough sulfur in our diet?. Nutrition & Metabolism, 4(1), 1-12.

Nirmala, A. R., Permatasari, L., Muliasari, H., Deccati, R. F. (2023). Analysis of optimal conditions of bovine serum albumin (BSA) protein denaturation inhibition method in anti-inflammatory activity testing of various plant leaf extracts. Journal of Agritechnology and Food Processing, 3(2), 101-113.

Nirwane, A. M., Bapat, A. R. (2012). Effect of methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in Ethanol-CCl4 induced hepatotoxicity in Wistar rats, Der Pharmacia Lettre, 4(3), 795-802.

Nisha, P., Singhal, R. S., Pandit, A. B. (2009). The degradation kinetics of flavor in black pepper (*Piper nigrum* L.). Journal of Food Engineering, 92(1), 44-49.

Nwofia, G. E., Kelechukwu, C., Nwofia, B. K. (2013). Nutritional composition of some *Piper nigrum* (L.) accessions from Nigeria. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 3, 247–254.

Oboh, G., Ademosun, A. O., Odubanjo, O. V., Akinbola, I. A. (2013). Antioxidative properties and inhibition of key enzymes relevant to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from black pepper. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, 2013(1), 926047.

O'Byrne, D. J., Devaraj, S., Grundy, S. M., Jialal, I., (2002). Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids *α*-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults, The American Journal of Clinical Nutrition, 76(6), 1367–1374.

Okawa, M, Kinjo, J, Nohara, T, Ono, M. (2001). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 24, 1202–1205.

Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., Afolayan, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry, 120(1), 308-312.

Olalere, O. A., Abdurahman, N. H., Alara, O. R. (2017). Extraction, radical scavenging activities and physicochemical fingerprints of black pepper (*Piper nigrum*) extract. Journal of Food Measurement and Characterization, 11, 2195-2201.

Olalere, O. A., Abdurahman, N. H., bin Mohd Yunus, R., Alara, O. R., Akbari, S. (2018). Evaluation of optimization parameters in microwave reflux extraction of piperine-

oleoresin from black pepper (*Piper nigrum*). Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7(4), 626-631.

Olalere, O. A., Abdurahman, N. H., bin Mohd Yunus, R., Alara, O. R., Ahmad, M. M. (2019). Mineral element determination and phenolic compounds profiling of oleoresin extracts using an accurate mass LC-MS-QTOF and ICP-MS. Journal of King Saud University-Science, 31(4), 859-863.

Olayiwola, H. A., Abudulawal, L., Adewuyi, G. K., Azeez, M. O. (2017). Heavy metal contents in soil and plants at dumpsites: A case study of Awotan and Ajakanga dumpsite Ibadan, Oyo State, Nigeria. Journal of Environment and Earth Science. 7(4), 11-24.

Orav, A., Stulova, I., Kailas, T., Müürisepp, M. (2004). Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(9), 2582-2586.

Otunola, G. A., Afolayan, A. J. (2018). Chemical composition, antibacterial and *in vitro* anti-inflammatory potentials of essential oils from different plant parts of *Moringa oleifera* lam. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, (3), 210-220.

Ouamnina, A., Alahyane, A., Elateri, I., Boutasknit, A., Abderrazik, M. (2024). Relationship between phenolic compounds and antioxidant activity of some Moroccan date palm fruit varieties (*Phoenix dactylifera* L.): a two-year study. Plants, 13(8), 1119.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 44(6), 307–315.

Özcan, M. M., Akbulut, M. (2008). Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. Food Chemistry, 106 (2), 852-858.

Ravindran P.N., Nirmal Babu K., Sasikumar B., Krishnamurthy K.S., In Black Pepper, Ravindran P.N., Ed., CRC Press, London 2000, p. 23-142.

Panda, S., Kar, A. (2003). Water and ethanol extracts of *Piper nigrum* in regulating thyroid function and lipid peroxidation in mice. Pharmaceutical Biology, 41(7), 479-482.

Panthong, A., Norkaew, P., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Anantachoke, N., Reutrakul, V. (2007). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboge from Garcinia hanburyi Hook f. Journal of Ethnopharmacology, 111(2), 335-340.

Parmar, S. V., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A. K., Wengel, J., Olsen, C. E., Boll, P. M. Phytochemistry of genus Piper, Phytochemistry, 46(4) (1997) 597-673.

Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., Zachariah, T. J. (2008). Chemistry of spices. London: CABI.

Pattanaik, S., Hota, D., Prabhakar, S., Kharbanda, P., Pandhi, P. (2009). Pharmacokinetic interaction of single dose of piperine with steady-state carbamazepine in epilepsy patients. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 23(9), 1281-1286.

Pattanaik, S., Hota, D., Prabhakar, S., Kharbanda, P., Pandhi, P. (2006). Effect of piperine on the steady-state pharmacokinetics of phenytoin in patients with epilepsy. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 20(8), 683-686.

Pavlov, K. F., Romankov, P. G. Noskov, A. A., (1979). Examples and Problems to the Course of Unit Operations of Chemical Engineering, Mir Publishers, Moscow p. 384-422.

Pei, H., Xue, L., Tang, M., Tang, H., Kuang, S., Wang, L., Ma, X., Cai, X., Li, Y., Zhao, M., Peng, A., Ye, H., Chen, L. (2020). Alkaloids from black pepper (*Piper nigrum* L.) exhibit anti-inflammatory activity in murine macrophages by inhibiting activation of NF-κB pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(8), 2406-2417.

Penecilla, G. L., Magno, C. P. (2011). Antibacterial activity of extracts of twelve common medicinal plants from the Philippines. Journal of Medicinal Plants Research, 5(16), 3975-3981.

Perry, R. H. and C. H. Chilton,: Chemical Engineers' Handbook, 5th Ed., International Student Edition, McGraw-Hill Kogakushe, Ltd., Tokyo (1973) p. 173 -178.

Peter, K. V. (Ed.). (2006). Handbook of herbs and spices (Vol. 3). Cambridge, England: Woodhead Publishing.

Petrović, S. M., Savić, S. R., Dimitrijević, M. L., Petronijević, Ž. B. (2015). The determination of macro and microelements in chamomile teas (*Matricaria chammomilla* L.). Advanced Technologies, 4 (2), 37-42.

Pfund, L. Y., Chamberlin, B. L., Matzger, A. J. (2015). The bioenhancer piperine is at least trimorphic. Crystal Growth & Design, 15(5), 2047-2051.

Picket R., Cates J., Sharpe F. R. (1975). Distortion of essential oil composition during isolation by steam distillation, Chemistry & Industry, 21, 571.

Plaza, M., Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 71, 39-54.

Politeo, O., Jukić, M., Miloš M. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. Croatica Chemica Acta, 79(4), 545-552.

Ponomarev, V. D. (1976). Extraction of medicinal raw materials. *Moscow: Medicine*.

Pop, A. S., Romina, A., Mureșan, C. C. (2024). Therapeutic insights into black pepper (*Piper nigrum*): Phytochemical composition, bioactive properties, and health benefits. Hop and Medicinal Plants, 32(1-2), 139-152.

Popl, M., Fahnrich, J., Tatar, V. (1990). Chromatographic analysis of alkaloids. M. Dekker.

Poulson, B. G., Alsulami, Q. A., Sharfalddin, A., El Agammy, E. F., Mouffouk, F., Emwas, A. H., Jaremko, L., Jaremko, M. (2021). Cyclodextrins: Structural, chemical, and physical properties, and applications. Polysaccharides, 3(1), 1-31.

Pourmortazavi, S. M., Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. Journal of Chromatography A, 1163(1-2), 2-24.

Prashant, A., Rangaswamy, C., Yadav, A. K., Reddy, V., Sowmya, M. N., Madhunapantula, S. (2017). In vitro anticancer activity of ethanolic extracts of *Piper nigrum* against colorectal carcinoma cell lines. International Journal of Applied and Basic Medical Research, 7(1), 67-72.

Pruthi J. 1999. Quality assurance in spices and spice products, modern methods of analysis. New Delhi, India: Allied Publishers Ltd.

Pullela, S.V., Tiwari, A.K., Ravishankar, B., Pal, S. N. (2006). HPLC-assisted chemobiological standardization of *Piper longum* Linn.: A bioactive compound-based approach for quality assurance of botanicals with α-glucosidase inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology, 107(3), 361–367.

Qi, H. S., Liu, P., Gao, S. Q., Diao, Z. Y., Yang, L. L., Xu, J., Han, E. J. (2009). Inhibitory effect of piperlonguminine/dihydropiperlonguminine on the production of amyloid beta and APP in SK-N-SH cells. The Chinese Journal of Physiology, 52(3), 160-168.

Qi, Z. H., Sikorski, C. T. (1999). Controlled delivery using cyclodextrin technology.

Quan, X., Liu, H., Ye, D., Ding, X., Su, X. (2021). Forsythoside A alleviates high glucose-induced oxidative stress and inflammation in podocytes by inactivating MAPK signaling via MMP12 inhibition. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, 1885-1895.

Quilaqueo, M., Millao, S., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Acevedo, F., Shene, C., Rubilar, M. (2019). Inclusion of piperine in β-cyclodextrin complexes improves their bioaccessibility and *in vitro* antioxidant capacity. Food Hydrocolloids, 91, 143-152.

Rajbhar, K. A. R. I. S. H. M. A., Dawda, H., Mukundan, U. (2015). Polyphenols: Methods of extraction. Scientific Reviews Chemical Communications. 5(1), 1-6.

Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, J. C., Torrado-Agrasar, A., Simal-Gándara, J. (2017). Physico-chemical characterization and evaluation of bio-efficacies of black pepper essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. Food Hydrocolloids, 65, 157-164.

Raman, G., Gaikar, V. G. (2002). Microwave-assisted extraction of piperine from Piper nigrum. Industrial & Engineering Chemistry Research, 41(10), 2521-2528.

Ramos-Martínez, B., Dávila-Pousa, C., Merino-Bohórquez, V., & García-Palomo, M. (2022). Use of cyclodextrins as excipients in pharmaceutical products: why not in extemporaneous preparations?. Farmacia Hospitalaria, 46(1), 31-39.

Rani, S. S., Saxena, N., Udaysree, N. (2013). Antimicrobial activity of black pepper (Piper nigrum L.). Global Journal of Pharmacology, 7(1), 87-90.

Rather, R. A., Bhagat, M. (2018). Cancer chemoprevention and piperine: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. Frontiers in cell and developmental biology, 6, 10.

Ravindran P. 2003. Black pepper: Piper nigrum. Boca Raton, Fla.: CRC Press.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Yang, M., Rice Evans, C., (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237.

Ren, T., Hu, M., Cheng, Y., Shek, T. L., Xiao, M., Ho, N. J., & Zuo, Z. (2019). Piperine-loaded nanoparticles with enhanced dissolution and oral bioavailability for epilepsy control. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 137, 104988.

Reverchon, E. (1997). Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. The Journal of Supercritical Fluids, 10(1), 1-37.

Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. The Journal of Supercritical Fluids, 38(2), 146-166.

Reverchon, E., Senatore, F. (1992). Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO_2 extraction. Flavour and Fragrance Journal, 7(4), 227-230.

Revutska, A., Belava, V., Golubenko, A., Taran, N., Chen, M. (2021). Plant secondary metabolites as bioactive substances for innovative biotechnologies. In E3S Web of Conferences (Vol. 280, p. 07014). EDP Sciences.

Rezaee, M. M., Kazemi, S., Kazemi, M. T., Gharooee, S., Yazdani, E., Gharooee, H., Shiran, M. R., Moghadamnia, A. A. (2014). The effect of piperine on midazolam plasma concentration in healthy volunteers, a research on the CYP3A-involving metabolism. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 22(1), 8.

Rho, M. C., Lee, S. W., Park, H. R., Choi, J. H., Kang, J. Y., Kim, K., Kim, Y. K. (2007). ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. Phytochemistry, 68(6), 899-903.

Richardson, J. F., Harker, J. H., Backhurst, J. R. (2002). Coulson and Richardson's chemical engineering: Vol. 2: Particle technology and separation processes (5th ed.). Butterworth-Heinemann.

Rmili, R., Ramdani, M., Ghazi, Z., Saidi, N., El Mahi, B. (2014). Composition comparison of essential oils extracted by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation from *Piper nigrum* L. Journal of Materials and Environmental Science, 5, 1560–1567.

Rocha, J. A., Menezes, E. V., da Fonseca, F. S. A., Brandão, M. M., Santos, K. T., de Oliveira, D. A., de Andrade Royo, V. (2017). *Magonia pubescens* (Sapindaceae) seed oil: physical and chemical properties, fatty acid profile and biodiesel production. Journal of Agricultural Science, 9(10), 2017.

Roselló-Soto, E., Galanakis, C. M., Brnčić, M., Orlien, V., Trujillo, F. J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwari B. K., Barba, F. J. (2015). Clean recovery of antioxidant compounds

from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. Trends in Food Science & Technology, 42(2), 134-149.

Rouatbi, M., Duquenoy, A., Giampaoli, P. (2007). Extraction of the essential oil of thyme and black pepper by superheated steam. Journal of Food Engineering, 78(2), 708-714.

Rouessac, F., Rouessac, A. (2013). Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques. John Wiley & Sons.

Ruberto, G., Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry, 69(2), 167-174.

Sabina, E. P., Nasreen, A., Vedi, M., Rasool, M. (2013). Analgesic, antipyretic and ulcerogenic effects of piperine: an active ingredient of pepper. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 5(10), 203-206.

Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2009). Application of supercritical CO_2 in lipid extraction–A review. Journal of Food Engineering, 95(2), 240-253.

Salleh, W. M. N. H. W., Hashim, N. A., Fabarani, N. P., Ahmad, F. (2020). Antibacterial Activity of Constituents from *Piper retrofractum* Vahl. and *Piper arborescens* Roxb. Agriculturae Conspectus Scientificus, 85(3), 269-280.

Sano, Y., Satoh, H., Chiba, M., Okamoto, M., Serizawa, K., Nakashima, H., Omae, K. (2005). Oral toxicity of bismuth in rat: single and 28-day repeated administration studies. Journal of Occupational Health, 47, 293–298.

Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., Loftsson, T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. Molecules, 23(5), 1161.

Sarma, N., Gogoi, R., Begum, T., Lal, M., Perveen, K., Bukhari, N. A., Alsulami, J. A. (2024). Exploring the pharmacological significance of *Murraya koenigii* (L.) Spreng: Insights from North-East India. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 27(3), 804-817.

Savic-Gajic, I., Savic, I. M., Nikolic, V. D., Nikolic, L. B., Popsavin, M. M., Kapor, A. J. (2016). Study of the solubility, photostability and structure of inclusion complexes of carvedilol with *β*-cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)-*β*-cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 86(1), 7-17.

Savić, S., Petrović, S., Petronijević, M., Cvetanović, A., Petronijević, Ž. 2019: Determination of the mineral content of spices by ICP-OES. Advanced Technologies. 8(1), 27-32.

Schaich, K. M. (2005). Developing a rational basis for selection of antioxidant screening and testing methods. In I International Symposium on Natural Preservatives in Food Systems, 709, 79-94.

Scheppers-Wercinski, S. A. (1999). Solid Phase Microextraction: A Practical Guide**.** New York: Marcel Dekker.

Schulz, H., Baranska, M., Quilitzsch, R., Schütze, W., Lösing, G. (2004). Characterisation of pepper and pepper oleoresins by Fourier-transform Raman spectroscopy. Science Access, 2(1), 409-410.

Selvakumar, K., Madhan, R., Srinivasan, G., Baskar, V. (2011). Antioxidant assays in pharmacological research. Asian Journal of Pharmacy and Technology, 1(4), 99–103.

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(20), 7749-7759.

Shang, Z., Sharma, V., Kumar, T., Dev, K., Patil, S. (2024). Phytochemical characterization and synergistic antibacterial effects of colebrookea oppositifolia essential oil as adjuvants to modern antibiotics in combating drug resistance. Drug Design, Development and Therapy, 4601-4614.

Sharma, G. N., Dubey, S. K., Sati, N., Sanadya, J. (2011). Anti-inflammatory activity and total flavonoid content of *Aegle marmelos* seeds. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 3(3), 214–218.

Shi, J., Xia, Y., Wang, H., Yi, Z., Zhang, R., Zhang, X. (2022). Piperlongumine is an NLRP3 inhibitor with anti-inflammatory activity. Frontiers in Pharmacology, 12, 818326.

Shityakov, S., Bigdelian, E., Hussein, A. A., Hussain, M. B., Tripathi, Y. C., Khan, M. U., Shariati, M. A. (2019). Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. European Journal of Medicinal Chemistry, 176, 149-161.

Shukla, S., Gupta, S. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. Pharmaceutical Research, 27(6), 962-978.

Shyam Sunder, G. S., Adhikari, S., Rohanifar, A., Poudel, A., Kirchhoff, J. R. (2020). Evolution of environmentally friendly strategies for metal extraction. Separations. 7(1), 4.

Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M. (2007). Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. Journal of Food Composition and Analysis, 20(2), 106-112.

Singh, N. K., Kumar, P., Gupta, D. K., Singh, S., Singh, V. K. (2011). UV-spectrophotometric method development for estimation of piperine in Chitrakadi Vati. Der Pharmacia Lettre, 3(3), 178-182.

Singh, S., Kapoor, I. P. S., Singh, G., Schuff, C., De Lampasona, M. P., Catalan, C. A. (2013). Chemistry, antioxidant and antimicrobial potentials of white pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil and oleoresins. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 83(3), 357-66.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

Sintim, H. Y., Burkhardt, A., Gawde, A., Cantrell, C. L., Astatkie, T., Obour, A. E., Schlegel, V. (2015). Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. Industrial Crops and Products. 63, 190-196.

Skala D., Žižović I., Gavrančić S. (2002). Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, Hemijska industrija 56 (5), 179-190.

Skala D., Žižović I., Petrović S. (1999), Etarska ulja – destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet, Hemijska Industrija. 53, 123-139.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2018). Principles of instrumental analysis (7th ed.). Cengage.

Soumyanath, A., Venkatasamy, R., Joshi, M., Faas, L., Adejuyigbe, B., Drake, A. F., Young, A. R. (2006). UV irradiation affects melanocyte stimulatory activity and protein binding of piperine. Photochemistry and Photobiology, 82(6), 1541-1548.

Sparkman D.O., Penton Z.E., Fulton K.G. (2011). Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide, 2nd Eds: Elsevier Inc., Oxford, USA.

Sreedharan, V. P., Symon, B., & Narayanan, C. S. (1985). Moisture influence on fungal growth in black pepper. Journal of Stored Products Research, 21(3), 127-129.

Srivastava, A. K., Kumar, A., Srivastava, H., Pandey, S., Kumar, N., Brahmachari, G., Misra, N. (2024). Molecular Dynamics and Quantum Chemical Studies on Piperine, a Naturally Occurring Alkaloid. Polycyclic Aromatic Compounds, 44(6), 3663-3677.

Sriwiriyajan, S., Ninpesh, T., Sukpondma, Y., Nasomyon, T., Graidist, P. (2014). Cytotoxicity screening of plants of genus *Piper* in breast cancer cell lines. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13(6), 921-928.

Sriwiriyajan, S., Sukpondma, Y., Srisawat, T., Madla, S., Graidist, P. (2017). (−)-Kusunokinin and piperloguminine from *Piper nigrum*: An alternative option to treat breast cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 92, 732-743.

Sruthi, D., Zachariah, T. J., Leela, N. K., Jayarajan, K. (2013). Correlation between chemical profiles of black pepper (*Piper nigrum* L.) var. Panniyur-1 collected from different locations. Journal of Medicinal Plants Research, 7, 2349–2357.

Stanković, M. S., Radić, Z. S., Blanco-Salas, J., Vázquez-Pardo, F. M., Ruiz-Téllez, T. (2017). Screening of selected species from Spanish flora as a source of bioactive substances. Industrial Crops and Products, 95, 493-501.

Stanković, M. Z., Nikolić, N. Č., Stanojević, L., Cakić, M. D. (2004). The effect of hydrodistillation technique on the yield and composition of essential oil from the seed of *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex. A.W. Hill. Hemijska Industrija, 58(9), 409-412.

Stanković, M. Z., Stanojević, L. J. P. (2014). Tehnologija lekovitog i začinskog bilja, Tehnološki fakultet, Leskovac.

Stanojević Lj. (2004). Uticaj tehnike i uslova hidrodestilacije na sastav i karakteristike etarskog ulja iz semena *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex. A.W. Hill, Magistarski rad, Tehnološki fakultet, Leskovac.

Stanojević Lj., Stanković M., Stanojević J. (2017). Praktikum iz biohemije, Tehnološki fakultet, Leskovac, Univerzitet u Nišu.

Stanojević, L. P., Milenković, A., Pejčić, M., Stojanović, R. Z. Z., Petrović, S., Nikolić, V., & Troter, D. Z. (2024). Ethanolic extracts from black (*Piper nigrum* L.) and cubeb pepper (*Piper cubeba* L.) fruits available in Serbia: Comparative study regarding phytochemical properties, antimicrobial and antioxidant activities. Advanced Technologies, 13(1), 42-49.

Stanojević, L. P., Stanković, M. Z., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B. (2008). Anti-oxidative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. extracts. Journal of the Serbian Chemical Society, 73(5), 531-540.

Stanojević, L. P., Zdravković, A. S., Stanković, M. Z., Cakić, M. D., Nikolić, V. D., & Ilić, D. P. (2013). Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). Savremene Tehnologije, 2(1), 51-59.

Stanojević, L., Stanković, M., Cakić, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ilić, D., Radulović, N. (2011). The effect of hydrodistillation techniques on yield, kinetics, composition and antimicrobial activity of essential oils from flowers of *Lavandula officinalis* L. Hemijska Industrija, 65(4), 455-463.

Stanojević, L., Zvezdanović, J., Danilović, B., Cvetković, D., Stanojević, J., Ilić, D., Cakić, M. (2018). The antioxidative and antimicrobial activity of the aqueous earth smoke (*Fumaria officinalis* L.): Extract. Advanced. Technologies, 7, 31–40.

Stanojević, L.P., Stanojević, J.S., Cvetković, D.J., Cakić, M.D., Ilić, D.P. (2015). Antioxidant activity of ethanolic extract from cultivated strawberries' leaves (*Fragariae folium*). Chemical Industry, 69, 567–576.

Stanojević, Lj., Stanković, B., Cakić, M., Nikolić, V., Ilić, D., Perić, M. (2014). The influence of extraction techniques on the yield, kinetics and composition of aqueous extracts from dill fruit (*Anethi fructus*). Savremene Tehnologije, 3(1), 23-29.

Stanojević, Lj.P., Stanković, M.Z., Cvetković, D.J., Cakić, M.D., Ilić, D.P., Nikolić, V.D., Stanojević, J.S. (2016). The effect of extraction techniques on yield, extraction kinetics, and antioxidant activity of aqueous-methanolic extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) leaves, Separation Science and Technology, 51(11), 1817-1829.

Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70(2), 235-242.

Stasiłowicz, A., Rosiak, N., Tykarska, E., Kozak, M., Jenczyk, J., Szulc, P., Kobus-Cisowska, J., Lewandowska, K., Płazińska, A., Płaziński, W., Cielecka-Piontek, J. (2021). Combinations of piperine with hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin as a multifunctional system. International Journal of Molecular Sciences, 22(8), 4195.

Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Reviews, 32(4), 579-606.

Stöhr, J. R., Xiao, P. G., Bauer, R. (2001). Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis *in vitro*. Journal of Ethnopharmacology, 75(2-3), 133-139.

Stojanović-Radić, Z., Čomić, L., Radulović, N., Blagojević, P., Mihajilov-Krstev, T., Rajković, J. (2012). Commercial Carlinae radix herbal drug: Botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. Pharmaceutical Biology, 50(8), 933-940.

Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Dimitrijević, M., Aleksić, A., V Anil Kumar, N., Salehi, B., Sharifi-Rad, J. (2019). Piperine-a major principle of black pepper: a review of its bioactivity and studies. Applied Sciences, 9(20), 4270.

Stuart, B. H. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Chichester: Wiley.

Subramanian, R., Subbramaniyan, P., Ameen, J. N., Raj, V. (2016). Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*. Arabian Journal of Chemistry, 9, S537-S540.

Sun, L. D., Wang, F., Dai, F., Wang, Y. H., Lin, D., Zhou, B. (2015). Development and mechanism investigation of a new piperlongumine derivative as a potent anti-inflammatory agent. Biochemical Pharmacology, 95(3), 156-169.

Suvarna, Y., Rahaman, S. A., & Madhavi, A. (2022a). A Novel Stability Indicating Method for Determination of Major Alkaloid in Black Pepper by RP-HPLC in Different Pharmaceutical Dosage Forms. Pharmacognosy Research, 14(2), 219-224.

Suvarna, V., Bore, B., Bhawar, C., Mallya, R. (2022b). Complexation of phytochemicals with cyclodextrins and their derivatives-an update. Biomedicine & Pharmacotherapy, 149, 112862.

Svoboda, K. P., Svoboda, T. G., & Syred, A. D. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants: A review and atlas of micrographs. Microscopix Publications, p.60.

Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. (2006). Inhibition of *α*-glucosidase and *α*-amylase by flavonoids. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 52(2), 149-153.

Tandy, S., Bossart, K., Mueller, R., Ritschel, J., Hauser, L., Schulin, R., Nowack, B. (2004). Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. Environmental Science & Technology, 38(3), 937-944.

Tasleem, F., Azhar, I., Ali, S. N., Perveen, S., Mahmood, Z. A. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7, S461-S468.

Tavares, C. S., Gameiro, J. A., Roseiro, L. B., Figueiredo, A. C. (2022). Hydrolates: A review on their volatiles composition, biological properties and potential uses. Phytochemistry Reviews, 21(5), 1661-1737.

Tchoumbougnang, F., Jazet, D. P. M., Sameza, M. L., Fombotioh, N., Vyry, W. N. A., Henri, A. Z. P., Menut, C. (2009). Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L., *Piper guineense* Schum. et Thonn., *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. African Journal of Biotechnology, 8(3), 424-431.

Temrangsee, P., Itharat, A., Sattaponpan, C., Pipatrattanaseree, W. (2019). Inhibitory effect on alpha-glucosidase activity of Benjakul, Soros Benjakul and their plant components. Thammasat Medical Journal, 19(4), 645-653.

Teneva, D., Denkova, Z., Denkova, R., Atanasova, T., Nenov, N., Merdzhanov, P. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and extracts from black pepper, cumin, coriander and cardamom against some pathogenic and saprophytic microorganisms. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 18, 373-377.

Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S., Schnitzler, J. P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. The Plant Journal, 45(4), 540-560.

Tipsrisukond, N., Fernando, L. N., Clarke, A. D. (1998). Antioxidant effects of essential oil and oleoresin of black pepper from supercritical carbon dioxide extractions in ground pork. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46(10), 4329-4333.

Tiwari, A., Mahadik, K. R., Gabhe, S. Y. (2020). Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. Medicine in Drug Discovery, 7, 100027.

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 71, 100-109.

Tiwari, G., Tiwari, R., & Rai, A. K. (2010). Cyclodextrins in delivery systems: Applications. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2(2), 72-79.

Tolić A. (1996). Operacija ekstrakcije tečno-tečno, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 8(2), 137-142.

Tomy, M. J., Sharanya, C. S., Dileep, K. V., Prasanth, S., Sabu, A., Sadasivan, C., Haridas, M. (2015). Derivatives form better lipoxygenase inhibitors than piperine: *in vitro* and *in silico* study. Chemical Biology & Drug Design, 85(6), 715-721.

Torres-Pelayo, V. R., Fernández, M. S., Carmona-Hernandez, O., Molina-Torres, J., & Lozada-Garcia, J. A. (2016). A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus piper: as a potent bio-insecticide. Research & Reviews: Research Journal of Biology, 4(2), 45-51.

Tran, T. H., Ha, L. K., Nguyen, D. C., Dao, T. P., Nhan, L. T. H., Nguyen, D. H., Nguyen, T. D., Vo, D.-V. N., Tran, Q. T., Bach, L. G. (2019). The study on extraction process and analysis of components in essential oils of black pepper (*Piper nigrum* L.) seeds harvested in Gia Lai Province, Vietnam. Processes, 7(2), 56.

Treybal, R. E. (1968). Mass Transfer Operations (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.

Trifan, A., Zengin, G., Brebu, M., Skalicka-Woźniak, K., Luca, S. V. (2021). Phytochemical characterization and evaluation of the antioxidant and anti-enzymatic activity of five common spices: Focus on their essential oils and spent material extractives. Plants, 10(12), 2692.

Tripathi, A. K., Ray, A. K., Mishra, S. K. (2022). Molecular and pharmacological aspects of piperine as a potential molecule for disease prevention and management: evidence from clinical trials. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 11(1), 16.

Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F. (2010). Natural products as α-amylase and α-glucosidase inhibitors and their hypoglycemic potential in the treatment of diabetes: An update. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 10(4), 315–331.

Turek, C., Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(1), 40-53.

Uekama, K. (2004). Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52(8), 900-915.

Valachovic, P., Pechova, A., Mason, T. J. (2001). Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 8(2), 111-117.

Van De Manakker, F., Vermonden, T., Van Nostrum, C. F., Hennink, W. E. (2009). Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. Biomacromolecules, 10(12), 3157-3175.

Veljković, V. B., Milenović, D. M. (2002). Extraction of resinoids from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L): II. Modeling of extraction kinetics. Hemijska Industrija, 56(2), 60-67.

Verpoorte, R., Schripsema, J., van der Leer, T. (1989). Cinchona alkaloids. In The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology (Vol. 34, pp. 331-398). Academic Press.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8(3), 303-313.

Vinson J.A., Su X., Zubik L., Bose P., (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(11), 5315–5321.

Vinturelle, R., Mattos, C., Meloni, J., Nogueira, J., Nunes, M. J., Vaz Jr, I. S., Rocha, L., Lione, V., Castro, H.C., Chagas, E. F. D. (2017). *In vitro* evaluation of essential oils derived from *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Citrus limonum* (Rutaceae) against the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). Biochemistry Research International, 2017(1), 5342947.

Volak, L. P., Greenblatt, D. J., Court, M. H. (2007). Curcumin, a component of turmeric, and piperine, a component of black pepper, inhibit human cytochrome P450 (CYP) enzymes in vitro, The Journal of Clinical Pharmacology, 47, 1183-1211.

Wafi, D. A. I., Purwanta, M., & Purwaningsih, S. (2025). In Vitro Antibacterial Activity Test of Black Pepper (*Piper nigri fruktus*) Extract Against *Escherichia coli* Using the Diffusion Method. International Journal, 6(1), 42-46.

Wang, J., Liu, Y. T., Xiao, L., Zhu, L., Wang, Q., Yan, T. (2014a). Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway. Inflammation, 37(6), 2085-2090.

Wang, M., Chittiboyina, A. G., Parcher, J. F., Ali, Z., Ford, P., Zhao, J., Avula, B., Wang, Y. H., Khan, I. A. (2019). *Piper nigrum* oil–determination of selected terpenes for quality evaluation. Planta Medica, 85(03), 185-194.

Wang, Y. H., Morris-Natschke, S. L., Yang, J., Niu, H. M., Long, C. L., Lee, K. H. (2014b). Anticancer principles from medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) plants. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 4(1), 8-16.

Wang, Y., Jiang, Z. T., Li, R. (2009). Composition comparison of essential oils extracted by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation from black pepper (Piper nigrum L.) grown in China. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 12(3), 374-380.

Wang, Y., Wang, L., Tan, J., Li, R., Jiang, Z. T., Tang, S. H. (2021). Comparative analysis of intracellular and in vitro antioxidant activities of essential oil from white and black pepper (*Piper nigrum* L.). Frontiers in Pharmacology. 12, 1344.

Wawrosch, C., Zotchev, S. B. (2021). Production of bioactive plant secondary metabolites through *in vitro* technologies—status and outlook. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(18), 6649-6668.

WHO (World Health Organisation), (2007). WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues. World Health Organ; Geneva, Switzerland.

WHO, (1996). Trace elements in humannutrition and health, Geneva.

Williams, N. C., O'Neill, LAJ. (2018). A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reproГраммing in innate immunity and inflammation. Nature Reviews Immunology, 18(10), 647–659.

Wojtunik-Kulesza, K. A., Cieśla, Ł. M., Waksmundzka-Hajnos, M. (2018). Approach to determination a structure-antioxidant activity relationship of selected common terpenoids evaluated by ABTS.+ radical cation assay, Natural Product Communications, 13(3), 295-298.

Wood, A. B., Barrow, M. L., James, D. J. (1988). Piperine determination in pepper (*Piper nigrum* L.) and its oleoresins—a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method. Flavour and Fragrance Journal, 3(2), 55-64.

Xia, F., Wang, C., Jin, Y., Liu, Q., Meng, Q., Liu, K., Sun, H. (2014). Luteolin protects HUVECs from TNF-α-induced oxidative stress and inflammation via its effects on the Nox4/ROS-NF-κB and MAPK pathways. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 21(8), 768-783.

Xu, L., Zhan, X., Zeng, Z., Chen, R., Li, H., Xie, T., Wang, S. (2011). Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(9), 1196-1211.

Yan, J., Zhang, G., Pan, J., Wang, Y. (2014). α-Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. International Journal of Biological Macromolecules, 64, 213-223.

Yang, L., Sun, X., Yang, F., Zhao, C., Zhang, L., Zu, Y. (2012). Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of proanthocyanidins from *Larix gmelini* bark. International journal of molecular sciences, 13(4), 5163-5178.

Yang, X., Shen, J., Liu, J., Yang, Y., Hu, A., Ren, N., Liu, W. (2022). Spray-drying of hydroxypropyl β-cyclodextrin microcapsules for co-encapsulation of resveratrol and piperine with enhanced solubility. Crystals, 12(5), 596.

Yılmaz-Düzyaman, H., Medina-Alonso, M. G., Sanz, C., Pérez, A. G., de la Rosa, R., León, L. (2023). Influence of genotype and environment on fruit phenolic composition of Olive. Horticulturae, 9(10), 1087.

Ying, X., Yu, K., Chen, X., Chen, H., Hong, J., Cheng, S., Peng, L. (2013). Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. Cellular Immunology, 285(1-2), 49-54.

Young F. V. K., Poot C., Biernoth E., Krog N., Davidson N. G. J., Gunstone F.D . (1994). Procesing of fat and oils, u "The Lipid handbook" urednici Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B.,Chapman & Hall, London, UK.

Zaini, E., Afriyani, Fitriani, L., Ismed, F., Horikawa, A., Uekusa, H. (2020). Improved solubility and dissolution rates in novel multicomponent crystals of piperine with succinic acid. *Scientia Pharmaceutica*, *88*(2), 21.

Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. Food Engineering Reviews, 8(1), 23-34.

Zarai, Z., Boujelbene, E., Ben Salem, N., Gargouri, Y., Sayari, A. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. LWT - Food Science and Technology, 50(2), 634–641.

Zhang L., Demain A. L. (2005). Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine, Humana Press Inc., Totowa, New York.

Zhang, J., Ye, K. P., Zhang, X., Pan, D. D., Sun, Y. Y., Cao, J. X. (2017). Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. Frontiers in Microbiology, 7, 2094.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Chinese Medical Journal, 13(1), 1-26.

Zheljazkov, V. D., Astatkie, T. and Schlegel, V. (2014). Hydrodistillation extraction time effect on essential oil yield, composition, and bioactivity of coriander oil. Journal of Oleo Science, 63(9), 857-865.

Zhou, X., Wang, F., Zhou, R., Song, X., Xie, M. (2017). Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. Journal of Food Biochemistry, 41(4), e12376.

Zhu, F., Mojel, R., Li, G. (2017). Structure of black pepper (*Piper nigrum*) starch. Food Hydrocolloids, 71, 102-107.

Zou, L., Hu, Y. Y., Chen, W. X. (2015). Antibacterial mechanism and activities of black pepper chloroform extract. Journal of Food Science and Technology, 52(12), 8196-8203.

БИОГРАФИЈА

Александра Миленковић рођена је 1994. године у Лесковцу, где и данас живи, ради и ствара. Средњу медицинску школу у Лесковцу завршила је на смеру фармацеутски техничар са одличним успехом, што је представљало први корак ка њеном даљем усавршавању у области технологије, фармације и биохемије. Основне академске студије на Технолошком факултету у Лесковцу на смеру Фармацеутско-козметичко инжењерство завршила је са просечном оценом 9,34, мастер академске студије са оценом 10,00. По завршетку мастер академских студија, школске 2018/2019. године, уписала је докторске академске студије на Технолошком факултету у Лесковцу Универзитета у Нишу, на студијском програму Технолошко инжењерство, где је положила све испите предвиђене наставним планом и програмом студија са просечном оценом 10,00. Од 2019. године стипендиста је Министарства просвете, науке и технолошког развоја. Као стипендиста учествовала је на пројекту „Биљни и синтетички биоактивни производи новије генерације“ (МНП, ев. бр. TR-34012).

У истраживачко звање истраживач-приправник изабрана је 22. 6. 2020. године на Технолошком факултету у Лесковцу. Од школске 2019/2020. године ангажована је на извођењу вежби на основним академским студијама на предметима Биохемија, Технологија природних органских производа и Технологија лековитог и зачинског биља. Током школске 2021/2022. године била је ангажована на извођењу лабораторијских вежби из предмета Биохемија и Технологија природних органских производа.

Школске 2022/2023. године Александра Миленковић уписала је трећу годину докторских академских студија, а 05.07.2022. године пријавила је тему докторске дисертације под називом „Екстракција, изолација и карактеризација биоактивних супстанци из плода црног бибера (*Piper nigrum* L.)“. Тема је прихваћена од стране Научно-наставног већа Технолошког факултета у Лесковцу (број одлуке: 04 бр. 4187-XII-A од 25.10.2022. године), као и одлуком Научно-стручног већа за техничко-технолошке науке Универзитета у Нишу, на седници одржаној 26.12.2022. године (НСВ 8/20-01-008/22-021), под менторством проф. др Љиљане Станојевић, редовног професора Технолошког факултета у Лесковцу (НСВ 8/20-01-008/22-022).

Од школске 2022/2023. године ангажована је на извођењу лабораторијских вежби из предмета Биохемија, Технологија природних органских производа, Технологија лековитог и зачинског биља, Хемија природних производа, Антиоксиданси и

Технологија тензида. Поред рада у настави, ангажована је на бројним иницијативама за популаризацију науке – учествовала је у Ноћи истраживача и пројекту Наук није баук, Са технологијом на ти, као и у промоцији Технолошког факултета.

Кандидаткиња се активно бави научноистраживачким радом у области технолошког инжењерства, посебно у области хемије и хемијских технологија, са посебним фокусом на фито-хемијска истраживања природних производа. Истраживачки рад Александре Миленковић усмерен је на изолацију, карактеризацију и биолошко испитивање биоактивних компоненти из биљних сировина, са освртом на њихову потенцијалну примену у фармацеутској, козметичкој и прехрамбеној индустрији. Аутор је и коаутор укупно 19 радова у међународним часописима (од чега 7 радова категорије М21а, 6 радова категорије М21, 5 радова категорије М22 и 1 рад категорије М23), као и 5 радова у националним часописима (4 рада категорије М24 и 1 рад категорије М53). Поред тога, аутор је и коаутор 50 саопштења на међународним научним скуповима (3 саопштења штампана у целини категорије М33 и 47 саопштења штампаних у изводу категорије М34), као и 12 саопштења на скуповима националног значаја категорије М64.

БИБЛИОГРАФИЈА

Рад у врхунском међународном часопису – M21a

1. **Milenković, A.,** Ilić, Z., Stanojević, L., Milenković, L., Šunić, L., Lalević, D., ... & Cvetković, D. (2022). Essential oil yield, composition, antioxidant and microbial activity of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Monte Negro Coast. Horticulturae, 8(11), 1015.
2. Lalević, D., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Milenković, L., Šunić, L., Kovač, R., Kovačević D., Danilović B., **Milenković A.**, Stanojević J., Cvetković, D. (2023). Shade-induced effects on essential oil yield, chemical profiling, and biological activity in some Lamiaceae plants cultivated in Serbia. Horticulturae, 9(1), 84.
3. Šunić, L., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Milenković, L., Stanojević, J., Kovač, R., **Milenković, A.**, Cvetković, D. (2023). Comparison of the essential oil content, constituents and antioxidant activity from different plant parts during development stages of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Horticulturae, 9(3), 364.
4. Milenković, L., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Šunić, L., **Milenković, A**., Stanojević, J., & Cvetković, D. (2025). Does photoselective netting influence yield, chemical composition and antioxidant activities of essential oils in cultivated sage?. Frontiers in Plant Science, 16, 1540520.
5. Ilić, Z. S., Kevrešan, Ž., Šunić, L., Stanojević, L., Milenković, L., Stanojević, J., **Milenković, A.**, Cvetković, D. (2023). Chemical profiling and antioxidant activity of wild and cultivated sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil. Horticulturae, 9(6), 624.
6. Stanojević, J., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Milenković, L., Kovač, R., Lalević, D., Šunić, Lj., **Milenković, A.**, Cvetković, D. (2023). Essential oil yield, composition, and antioxidant activity in two umbel maturity stages of wild carrot (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) from Montenegro. Horticulturae, 9(3), 328.
7. Ilić, Z., Stanojević, L., Milenković, L., Šunić, L., **Milenković, A.**, Stanojević, J., & Cvetković, D. (2022). The yield, chemical composition, and antioxidant activities of essential oils from different plant parts of the wild and cultivated oregano (*Origanum vulgare* L.). Horticulturae, 8(11), 1042.

Рад у врхунском међународном часопису – M21

1. Milenković, L., Ilić, Z. S., Stanojević, L., **Milenković, A.**, Šunić, L., Ćirković, B., ... & Kevrešan, Ž. (2025). Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Pot Marigold (*Calendula officinalis*): The Impact of Light Modification. Plants, 14(22), 3512.
2. Milenković, L., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Zvezdanović, J., Šunić, L., **Milenković, A.**, ... & Cvetković, D. (2024). Bioactive polyphenols of leaf biomass from sweet potato varieties under different fertilizers as a potential agri-food resource. Food Bioscience, 61, 104751.
3. **Milenković, A.,** Aleksovski, S., Miteva, K., Milenković, L., Stanojević, J., Nikolić, G., ... & Stanojević, L. (2025). The effect of extraction technique on the yield, extraction kinetics and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) ethanolic extracts. Horticulturae, 11(2), 125.
4. Ilić, Z. S., Milenković, L., Stanojević, L., **Milenković, A.**, Šunić, L., Ćirković, B., ... & Stanojević, J. (2026). Effect of Light Modification by Shading Nets on Yield, Composition, and Antioxidant Activity of *Lavandula angustifolia* Mill. Essential Oil. Plants, 15(3), 377.
5. Šunić, L., Ilić, Z. S., Stanojević, L., Milenković, L., Lalević, D., Stanojević, J., **Milenković, A.**, Cvetković, D. (2024). Essential oil content, composition and free radical scavenging activity from different plant parts of Wild Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) in Montenegro. Plants, 13(14), 2003.
6. Ilić, Z. S., Stanojević, L., Milenković, L., Šunić, L., **Milenković, A.,** Stanojević, J., & Cvetković, D. (2024). Chemical profiling of essential oils from main culinary plants—bay (*Laurus nobilis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Montenegro. Horticulturae, 10(12), 1249.

Рад у истакнутом међународном часопису – М22

1. Ilić, Z. S., Milenković, L., Stanojević, L., Danilović, B., Šunić, L., **Milenković, A.,** ... & Cvetković, D. (2023). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing in shading condition. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 26(6), 1397-1409.
2. **Milenković, A.,** Stanojević, J., Cvetković, D., & Stanojević, L. (2024). Chemical composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) fructus essential oil hydrodistillation fractions. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 27(1), 166-176.
3. Miteva, K., Aleksovski, S., Stanojevic, J., **Milenkovic, A.,** & Stanojevic, L. (2025). Valorisation of meat industry waste using pyrolysis. Mineral Processing and Extractive Metallurgy, 25726641251375304.
4. **Milenković, A. N.,** Stanojević, J. S., Troter, D. Z., Pejčić, M. G., Stojanović-Radić, Z. Z., Cvetković, D. J., & Stanojević, L. P. (2023). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils isolated from black (*Piper nigrum* L.) and cubeb pepper (*Piper cubeba* L.) fruits from the Serbian market. Journal of Essential Oil Research, 35(3), 262-273.
5. Ilić, Z. S., Stanojević, L., Milenković, L., Šunić, L., Lalević, D., **Milenković, A.,** & Kevrešan, Ž. (2025). Antioxidant Potential of Different Plant Part of *Allium roseum* L. from Montenegro. Phyton (0031-9457), 94(8).

Рад у часопису међународног значаја – М23

1. **Milenković, A.,** Stanojević, J., & Stanojević, L. (2022). Comparative analysis of chemical composition and antioxidant activity of essential oil and hydrolate from black pepper fruit (*Piper nigrum* L.). Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 41(2), 209-220.
2. Tasić M.S., Petrović S.M., Simonović N.M., Pavlović D.R., Milenković A.N., Stanojević Lj.P., Cvetković D.J., Stability, Bioactivity and Sun Protective Potential of Hydrogels Based on Silver Nanoparticles Stabilized by Aqueous Extracts of Blackberry (Rubus spp.) Leaves. Nanotechnology Russia 21(2), 219–242 (2026). https://doi.org/10.1134/S2635167625601494

Рад у националном часопису међународног значаја - М24

1. **Milenković, A. N.,** & Stanojević, L. P. (2021). Black pepper: Chemical composition and biological activities. Advanced technologies, 10(2), 40-50.
2. **Milenković, A.,** Stanojević, J., Stojanović-Radić, Z., Pejčić, M., Cvetković, D., Zvezdanović, J., Stanojević, L. Chemical composition, antioxidative and antimicrobial activity of allspice (*Pimenta dioica* (L.) Merr.) essential oil and extract. Advanced Technologies 2020, 9(1),27-36.
3. Stanojević, J. S., Stanojević, L. P., Bulatović, V. M., Zvezdanović, J. B., **Milenković, A. N.,** Simonović, N. M., Cvetković, D. J. Chemical composition and antioxidant activity of immortelle (*Helichrysum italicum*)(Roth) G. Don) and yarrow (*Achillea millefolium* L.) essential oils. Advanced Technologies 2022, 11(1), 93-103.
4. Stanojević, L., **Milenković, A.,** Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Petrović, S., Nikolić, V., & Troter, D. (2024). Ethanolic extracts from black (*Piper nigrum* L.) and cubeb pepper (*Piper cubeba* L.) fruits available in Serbia: Comparative study regarding phytochemical properties, antimicrobial and antioxidant activities. Advanced Technologies, 13, 42-49.

Рад у часопису националног значаја – М53

1. **Milenković, A.,** Petrović, S., Savić, S., Stanojević, J., & Stanojević, L. (2024). The effect of extraction techniques on the mineral content of black pepper fruit ethanolic extracts. Biologica Nyssana, 15(1).

Саопштење са међународног скупа штампано у целини – М33

1. Karmina Miteva, Slavcho Aleksovski, Jelena Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević. Valorization of meat industry waste using pyrolysis. 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy (GREEN CIRC 2025), Proceedings, pp 39-48. ISBN 978-9989-650-42-0. April 22–25, 2025, North Macedonia. https://congress.sctm.mk/event/6/book-of-abstracts.pdf
2. Slavcho Aleksovski, Igor Aleksovski, Karmina Miteva, Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, **Aleksandra Milenković**. Physicochemical characteristics of bio-oil obtained by catalytic pyrolysis of oak chips. 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy (GREEN CIRC 2025), Proceedings, pp 49-57. ISBN 978-9989-650-42-0. April 22–25, 2025, North Macedonia. Доступно на: https://congress.sctm.mk/event/6/book-of-abstracts.pdf
3. Goran S. Nikolić, Nataša Simonović, Aleksandra Milenković, Nada Nikolić, Aleksandar Zdravković, Dragana Marković Nikolić, Miljana Radović Vučić, Optimization of phosphate removal from aqueous solution by cationic modified *Lagenaria vulgaris* shell using RSM-CCD design, 2nd International Congress on Scientific Advances (ICONSAD'22), 21-24 December 2022, Turkey, online oral presentation, Proceedings Book, p. 846-847, ISBN 978-605-73639-5-4, Editors: M. Nuri Seyman.

Рад на скупу међународног значаја штампан у изводу – М34

1. Marijana Vladimirov, Vesna Nikolić, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević, Ljubiša Nikolić, Ana Dinić, Tatijana Mihajlov-Krstev. Total phenol and flavonoid content and antimicrobial activity of isolates from white birch (*Betula pendula* Roth). 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 57, ISBN 978-86-89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
2. Ivana Gajić, Ana Dinić, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević, Maja Urošević, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić. Antioxidant activity of rosemary leaf essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.). 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 58, ISBN 978-86-89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
3. Miloš Durmišević, **Aleksandra Milenković**, Jelena Stanojević, Dragana Marković Nikolić, Ivana Gajić, Jelena Zvezdanović, Goran Nikolić S. Valorization of a nasal formulation based on some herbal extracts incorporated by ultrasonic maceration into cold-pressed sunflower oil. 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 62, ISBN 978-86-89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
4. Natalija Tošić Mirković, Ljubiša Nikolić, Vesna Nikolić, **Aleksandra Milenković**, Ivana Gajić, Maja Urošević, Ana Dinić, Ljiljana Stanojević. Determination of antioxidant activity of commercial and isolated essential oil from frankincense resin. 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 71, ISBN 978-86-89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
5. **Aleksandra Milenković**, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Ljubiša Nikolić, Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević. The characterization of piperine and its inclusion complex with *β*- cyclodextrin using XRD analysis. 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 90, ISBN 978-86-89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
6. Slavcho Aleksovski, Ivana Nedelkovska, Karmina Miteva, Igor Aleksovski, Jelena Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Dragan Cvetković. Investigating the kinetics of essential oil extraction from *Juniperus communis* through hydro-distillation. 16th International Symposium - Novel

Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p. 111, ISBN 978-86-89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.

7. Slavcho Aleksovski, Ivana Nedelkovska, Karmina Miteva, Igor Aleksovski, Jelena Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević. Fractionation of essential oil from *Juniperus communis* by hydro-distillation. 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p.112, ISBN 978-86- 89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
8. Karmina Miteva, Slavcho Aleksovski, Gordana Bogoeva-Gaceva, Jelena Stanojević, **Aleksandra Milenković**. Comparative study for the kinetics of pyrolytic reaction using Coats–Redfern and the dynamic method. 16th International Symposium - Novel Technologies and Sustainable Development, Book of Abstracts, p.122, ISBN 978-86- 89429-60-2. October 17–18, 2025, Leskovac, Serbia.
9. **Aleksandra Milenković**, Vesna Nikolić, Ana Dinić, Ljubiša Nikolić, Jelena Stanojević, Marija S. Tasić, Ljiljana Stanojević. The characterization of piperine and its inclusion complex with *β*-cyclodextrin using DSC analysis. 3rd European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (3-EuSPMF), Book of Abstracts, p. 96, ISBN 978- 86-7834-453-4. 1-4. July, 2025, Belgrade, Serbia.
10. Ljiljana Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Goran Nikolić, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević. Chemical composition and antioxidant activity of *Geranium robertianum* L. leaves hydrolate. Book of Abstracts, p. 122, ISBN 978-86-6275-176-8 (FSM). May 23–25, 2025, Niš, Serbia. http://www.sfses.com/docs/15_SFSES_abstract_book.pdf
11. **Aleksandra Milenković**, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević. The reducing power of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil and hydrolate. 15th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions (SFSES), Book of Abstracts, p. 125, ISBN 978-86-6275-176-8 (FSM). May 23–25, 2025, Niš, Serbia. http://www.sfses.com/docs/15_SFSES_abstract_book.pdf
12. Katarina Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević, Dragana Pavlović, Jelena Matejić, Jelena Zvezdanović. Anti-inflammatory activity of *Geranium macrorrhizum* L. leaves hydrolate. 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy (GREEN CIRC 2025), STUDENT HACKATHON, April 25, Oral presentation, Book of Abstracts, p. 44. ISBN 978-9989- 650-41-3. April 22–25, 2025, North Macedonia.
13. **Aleksandra Milenković**, Slavčo Aleksovski, Karmina Miteva, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Vesna Nikolić, Ljiljana Stanojević. (2025). Antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) fruit essential oils and hydrolates obtained by modified Clevenger type hydrodistillation. 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy (GREEN CIRC 2025), STUDENT HACKATHON, April 25, Oral presentation, Book of Abstracts, p.43., ISBN 978-9989- 650-41-3. April 22–25, 2025, North Macedonia.
14. Karmina Miteva, Slavcho Aleksovski, Jelena Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević. Valorization of meat industry waste using pyrolysis. 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy (GREEN CIRC 2025), Book of Abstracts, p. 39. ISBN 978-9989-650-42-0. April 22–25, 2025, North Macedonia.
15. Slavcho Aleksovski, Igor Aleksovski, Karmina Miteva, Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, **Aleksandra Milenković**. Physicochemical characteristics of bio-oil obtained by catalytic pyrolysis of oak chips. 2nd Conference of Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy (GREEN CIRC 2025), Book of Abstracts, p.45. ISBN 978-9989-650-42-0. April 22–25, 2025, North Macedonia.
16. Katarina Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević, Vesna Nikolić, Dragana Pavlović, Jelena Matejić, Ivana Nikolić, antiinflamatorna aktivnost hidrolata listova lovora (*Laurus nobilis* L.). Anti-inflammatory activity of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves hydrolate, Book of abstracts of International Scientific Conference SANUS 2025, pp 167-168. ISBN 978-99997-956-1-6. International Scientific Conference SANUS 2025, Prijedor, September 18-20, 2025. https://sanusconference.org/.
17. **Aleksandra Milenković**, Ljiljana Stanojević, Slavčo Aleksovski, Karmina Miteva, Jelena Zvezdanović, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata

semena grožđa iz makedonskog vranca (*Vitis vinifera* L.), Antioxidant activity of grape seed ethanolicextracts from macedonian vranec (*Vitis vinifera* L.), Book of abstracts of International Scientific Conference SANUS 2025, pp 165-166. ISBN 978- 99997-956-1-6. International Scientific Conference SANUS 2025, Prijedor, September 18-20, 2025. https://sanusconference.org/.

18. Urošević, M., Nikolić, L. B., Nikolić, V. D., Gajić, I. Lj., Dinić, A. D., Tatjana M. Mihajilov Krstev, , Stanojević, L. P., & **Milenković, A. N.** (2024). Antioxidative and antimicrobial activity of curcumin and its inclusion complex. 3rd International UNIfood Conference - Book of Abstract. Belgrade : University of Belgrade - Faculty of Agriculture. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/932577
19. Tošić, N., Nikolić, L., Nikolić, V., Stanojević, L., Gajić, I., Urošević, M., Dinić, A., & **Milenković, A.** (2024). Analysis of the antioxidant potential of the frankincense resin methanolic extracts using different methods. XV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska - Book of Abstracts. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/944599
20. Gajić, I. Lj., Stanojević, L. P., **Milenković, A. N.**, Dinić, A. D., Nikolić, V. D., Urošević, M., Nikolić, L. B., & Stanković, M. V. (2024). Antioxidant activity of isolated and commercial laurel leaf essential oils (*Laurus nobilis* L.). The 3 Rd International UNIFood Conference - Book of Abstract. Belgrade : University of Belgrade - Faculty of Agriculture. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/932576
21. **Aleksandra Milenković,** Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Lidija Milenković, Goran Nikolić, ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PURPLE BASIL (*OCIMUM BASILICUM* L., VAR. *PURPURASCENS*) ESSENTIAL OIL AND HYDROLATE, Book of abstracts p.85-86, Eighth International Scientific Conference "June 5th - World Environment Day", University of Bihać, Biotechnical Faculty, Bihać 05-07.June, 2024., Bosnia and Herzegovina, ISSN 2303-5889.
22. **Aleksandra Milenković,** Ljiljana Stanojević, THE REDUCING POWER OF BLACK PEPPER (*PIPER NIGRUM* L.) ESSENTIAL OIL HYDRODISTILLATION FRACTIONS, Proceedings (Student section), p. 737-738, The 31st International Conference Ecological Truth & Environmental Research – EcoTER'24, UNIVERSITY OF BELGRADE TECHNICAL FACULTY IN BOR (SERBIA), Sokobanja, Serbia, 18-21 June 2024, ISBN 978-86-6305-152-2.
23. **Milenković, A.**, Savić, S., Nikolić, V., Stanojević, J., Cvetković, D., Nikolić, G., & Stanojević, L. (2023). *In vitro* antihyperglycemic activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) ethanolic extracts. 3rd SCIENTIFIC SYMPOSIUM OF THE PHARMACEUTICAL ASSOCIATION OF SERBIA with International Participation, 73(No. Suppl. 4). Beograd : Savez farmaceutskih udruženja Srbije, Beograd i Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876019
24. Stanojević, L., **Milenković, A.**, Stanojević, J., Danilović, B., Irena Raca, , & Ranđelović, V. (2023). Chemical composition and antimicrobial activity of wild carrot (*Daucus carrota* L.) seed essential oil from Southeastern Serbia. VIII International Congress Engineering, Environment And Materials In Process Industry EEM2023 - Book Of Abstracts. Zvornik : University Of East Sarajevo, Faculty Of Technology. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876299
25. **Milenković, A.**, Stanojević, L., Stanojević, J., Ranđelović, V., & Cvetković, D. (2023). Antioxidant activity of wild carrot (*Daucus carota* L.) fatty oil from Southeastern Serbia. EEM2023-VIII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Process Industry" - BOOK OF ABSTRACTS. Zvornik : UNIVERSITY OF EAST SARAJEVO, FACULTY OF TECHNOLOGY. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876010
26. Stanojević, L., Stanojević, K., Pavlović, D., Matejić, J., & **Milenković, A.** (2023). Waste material of wild carrot (*Daucus carota* L.) seeds as a source of natural antiinflammatory agents [Usak : Uşak University]. 13 Th International Conference On Agriculture, Animal Science And Rural Development. https://doi.org/10.5281/zenodo.10406033 https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876302

27. Stanojević, L., **Milenković, A.**, Stanojević, J., Danilović, B., & Nikolić, G. (2023). Comparative analysis of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of wild carrot (*Daucus carrota* L.) seed essential oil from Serbia and Greece. ISPEC-11 th International Conference On Agriculture, Animal Science And Rural Development. Muş/ türkiye : Muş Alparslan Üniversitesi. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876306
28. Stanojević, L., **Milenković, A.**, Stanojević, J., Nikolić, V., Pejčić, M., Stojanović Radić, Z., & Nikolić, G. S. (2023). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Oleoresin. 3rd International Symposium of Scientific Research and Innovative Studies - Proceedings Book. Balikesir / Türkiye : Bandirma Onyedi Eylul University. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/873343
29. Goran S. Nikolić, **Aleksandra Milenković**, Milorad Cakić, Stanojević, L., Miloš Durmišević, Marković, D. N., & Aleksandar Bojić, (2023). Evaluation Of Surfactant-Modified Lignocellulosic Gourd Shell As A Cheap Cationic Sorbent Of Water-Soluble Pollutants. 6. International Marmara Scientific Research And Innovation Congress. Istanbul : International Science And Art Research Center. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877293
30. **Milenković, A.**, Stanojević, L., Stanojević, J., Nikolić, V., Pejčić, M., Radić, S. Z., & Nikolić, G. S. (2023). Antioxidant and ntimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) oleoresin. ISSRIS'23, 3rd International Symposium of Scientific Research and Innovative Studies - PROCEEDINGS BOOK. Bandırma/Balıkesir : Bandırma Onyedi Eylül University. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876004
31. Stanojević, L., **Milenković, A.**, Stanojević, J., Zvezdanović, J., & Cvetković, D. (2023). Antioxidant activity of wild carrot (*Daucus carota* l.) Umbels ethanolic extracts from serbia and greece. 15th international symposium „Novel Technologies And Sustainable Development" - Book of Apstracts. Leskovac : Faculty of Technology. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876301
32. Nikolić, G., Zlatković, S., Nikolić, V., **Milenković, A.**, Durmišević, M., Nikolić, M. D., & Rančić, D. (2023). Phytotherapeutic potential assessment of the walnut and mint oil macerates combination in the prevention of viral infections. 15th International Symposium with International Participation "Novel Technologies and Sustainable Development" - BOOK OF ABSTRACTS , Leskovac, October, 20-21, 2023. Leskovac : Faculty of Technology. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/875790
33. **Milenković, A.**, Stanojević, J., & Stanojević, L. (2023). The ferrous ion chelating ability of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil hydrodistillation fractions. 2nd International Congress on Food Researches (ICONFOOD'23). Sivas,Türkiye : Sivas Cumhuriyet Üniversitesi 4 Eylül Kültür Merkezi. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877753
34. **Milenković, A.,** Stanojević, K., Pavlović, D., Matejić, J., Stanojević, J., & Stanojević, L. (2023). Anti-inflammatory activity of wild carrot (*Daucus carota* L.) seed hydrolate. ISPEC-13 Th International Conference On Agriculture, Animal Science And Rural Development -. Usak : Usak University (Uşak Üniversitesi). https://enauka.gov.rs/handle/123456789/875882
35. Stanojević, L., Simonović, N., **Milenković, A.**, Zvezdanović, J., Cvetković, D., & Stanojević, J. (2023). Comparative analysis of chemical composition and antioxidant activity of parsnip (*Pastinaca sativa* L.) aerial parts and root essential oil. VIII International Congress Engineering, Environment And Materials In Process Industry Eem 2023. Zvornik : University Of East Sarajevo, Faculty Of Technology. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877155
36. Stanojević, L., Nikolić, G. S., Rančić, D., Zlatković, S., Marković Nikolić, D., Durmišević, M., & **Milenković, A.** (2023). Herbal Macerates as Alternative to Nasal Decongestants: Effect of Some Plant Oils on the Livid Nasal Mucosa. 3rd International Symposium of Scientific Research and Innovative Studies - PROCEEDINGS BOOK. Bandırma/Balıkesir : Bandırma Onyedi Eylül University. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/873344
37. **Milenković, A.**, Stanojević, L., Pavlović, D., Matejić, J., & Zvezdanović, J. (2023). Anti-inflammatory activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) ethanolic extracts. 15th International Symposium „Novel Technologies and Sustainable Development". Leskovac : Faculty of Technology. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/875989
38. Stanojević, L., **Milenković, A.**, Ilić, Z., Stanojević, J., Cvetković, D., & Nikolić, G. (2023). Antioxidant activity of essential oil and hydrolate of small leaf basil (*Ocimum basilicum* L., var.

minimum). 2nd International Congress on Food Researches Held Online and In-Person. Sivas : Sivas Cumhuriyet University,Türkiye. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877310

39. Stanojević, L., Slavčo Aleksovski, **Milenković, A.**, Stanojević, J., Cvetković, D., & Karmina Miteva (2022). Antioxidant activity of black seed (*Nigella sativa* L.) fatty oil obtained by different isolation methods. 2nd International Conference on Advanced Production and Processing. Novi Sad : University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877203
40. Lazarević, A., Petrović, S., Stanojević, J., Cvetković, D., Zvezdanović, J., & **Milenković, A.** (2022). Photodegradation of protoporphyrin IX encapsulated in MLV liposomes, induced by UV-A and UV-B irradiation. International Scientific Conference GREDIT-2022 Green Development, Green Infrastructure, Green Technology. Skopje : Mašinski fakultet. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/971084
41. Lazarević, A., Petrović, S., Stanojević, J., Cvetković, D., Zvezdanović, J., & **Milenković, A.** (2022). Lipid peroxidation induced by UV-B irradiation of protoporphyrin dimethyl-ester in lipids mixture. TBA-MDA test. INTERNATIONAL Scientific Confrerence GREDIT 2022 ± Green Development, Green Infrastructure, Green Technology (2022; Skopje). Skopje : Mašinski fakultet. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/971085
42. **Milenković, A**., Stanojević, L., Stanojević, J., Zvezdanović, J., Cvetković, D., & Lazarević, A. (2022). The influence of the operation conditions on the yield, kinetics and composition of ethanol extracts from black pepper (*Piper nigrum* L.) fructus. INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE–GREDIT 2022. Skopje : Masinski fakultet. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876316
43. **Milenković A., Stanojević Lj., Stanojević J., Cvetković D.**, Comparative analysis of chemical composition and antioxidant activity of essential oil and hydrolate from black pepper fruit (*Piper nigrum* L.), Book of Abstracts, p.156., INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE–GREDIT2022, Skoplje, May 5-8, 2022. (ISBN 978-608-4624-34-9).
44. **Aleksandra Milenković**, Zvezdanović, J. B., Stanojević, J. S., Cvetković, D. J., & Stanojević, L. P. (2021). The antioxidant activity of ethanolic extracts from black pepper (*Piper nigrum* L.) fruits obtained by different extraction techniques. Book of Abstracts, SFRR-E 2021 Annual Meeting (Virtual) "Redox Biology in the 21st Century: A New Scientific Discipline". https://enauka.gov.rs/handle/123456789/215560
45. **Aleksandra Milenković,** Ljiljana Stanojević, Zoran Ilić, Lidija Milenković, Šunić Ljubomir, Jelena Stanojević, Dragan Cvetković, Essential oil composition and antioxidant activity from different plant part of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) growing in Monte Negro sea-side, Book of abstracts, I_PP2, p.37, 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, Belgrade, Serbia - September 7-9, 2022. https://1euspmf.rs/
46. **Aleksandra Milenković,** Jelena Stanojević, Ljiljana Stanojević, Zoran Ilić, Lidija Milenković, Chemical composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) fructus essential oil hydrodistillation fractions, Book of abstracts, VII_OP, p.33, 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, Belgrade, Serbia - September 7-9, 2022. https://1euspmf.rs/ (ISBN 978-86-7834-408-4).
47. Stanojević, L., **Milenković, A.,** Glišić, S., Stanojević, J., Cvetković, D., Milutinović, J., & Pavlović, D. (2022). Comparative analysis of the chemical composition of wild carrot (*Daucus carota* L.) essential oils obtained by steam and hydro-distillation. XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska,. Banja Luka : University in Banja luka, Faculty of Technology.https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876319
48. Ljiljana Stanojević, Jelena Stanojević, **Aleksandra Milenković**, Slobodan Glišić, Antioxidant activity of essential and fatty oil isolated from coriander (Coriandrum sativum L.) seeds, Book of Abstracts, p. 97, XIV Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska, Banja Luka, October 21-22, 2022. University in Banja luka, Faculty of Technology, Banja Luka, 2022. ISBN 978-99938-54-96-8. COBISS.RS-ID 137004033.

49. Stanojević, J., Simonovic, N., Stanojevic, L., **Milenkovic, A.**, Zvezdanovic, J., & Cvetkovic, D. (2022). Antioxidant activity of essential oil and hydrolate from anisi fructus (*Pimpinella anisum* L.). Book of Abstracts - XIV Conference of Chemists, Technologists, and Environmentalists of Republic of Srpska. Banja Luka : University in Banja Luka, Faculty of Technology. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/859986
50. **Aleksandra Milenković**, Milica Pejčić, Zorica Stojanović-Radić, Petrović, S. M., Zvezdanović, J. B., Stanojević, J. S., & Stanojević, L. P. (2021). Cubeb peper (*Piper cubeba* L.) extracts as a source of natural antioxidants, antimicrobial agents and minerals. Book of Abstracts of VII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry" EEM2021. UNIVERSITY OF EAST SARAJEVO FACULTY OF TECHNOLOGY, Jahorina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/468338
51. **Aleksandra Milenković**, Milica Pejčić, Stanojević, J. S., Savić, S. R., Zorica Stojanović-Radić, & Stanojević, L. P. (2021). Black pepper (*Piper nigrum* L.) fruit extract as a source of bioactive compounds. Abstract Book. Online Meeting on Phytomedicine and Phytochemistry (Phytomedicine-2021). https://enauka.gov.rs/handle/123456789/323730
52. **Aleksandra Milenković**, Savić, S. R., Zvezdanović, J. B., Petrović, S. M., & Stanojević, L. P. (2021). Analysis of macro- and microelements in the black pepper (*Piper nigrum* L.) fruit ethanolic extracts obtained by different extraction techniques. Book of Abstracts, 14th Symposium „Novel Technologies and Economic Development". Tehnološki Fakultet, Leskovac. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/215589
53. Stanojević, L. P., Željka Marjanović-Balaban, , Jelena Stanojević, , Cvetković, D. J., Nikolić, L. B., **Aleksandra Milenković**, & Vesna Gojković Cvjetković, . (2019). Chemical composition and antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) berries essential oil. VI International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry, EEM Proceedings (H-14). Faculty of Technology, Karakaj 34a, 75400 Zvornik, Jahorina. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/386939
54. Stanojević, L. P., Stanojević, J. S., Cvetković, D. J., Zvezdanović, J. B., & **Milenkovic, A.** (2019). Essential oils of black pepper (*Piper nigrum* L.) and cubeb (*Piper cubeba* L.) as a source of natural antioxidants. VI International Congress "Engineering, Environment and Materials in Processing Industry, EEM Proceedings (H-13). Faculty of Technology, Karakaj 34a, 75400 Zvornik, Jahorina. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/281461
55. Stanojević Lj., Stanojević J., **Milenković A.** The influence of the extraction techniques on the yield, composition and antioxidant activity of aqueous extracts from sour cherry pedicles (Prunus cerasus L.), PHCE-10, p. 74, 13th Symposium "Novel technologies and economic development", Leskovac, 18-19. October, 2019. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/322120

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу - M64

1. Vikttoria Fernandes, Anastasija Mateska, Marinela Meckaroska, Ana Nestoroska, Mila Sazdova, Stanojević, J., Stanojević, L., **Milenković, A.**, Slavcho Aleksovski, & Karmina Miteva, (2024). Hydro-distillation of caraway seeds, characterization and modeling. 1st Conference for Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy, GREEN CIRC 2024. University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, Faculty of Technology and Metallurgy. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/958851
2. Slavčo Aleksovski, , Stanojević, L., Karmina Miteva, **Milenković, A.,** & Stanojević, J. (2024). Antioxidant activity of grapeseed oil from Macedonian Vranec - *Vitis vinifera* L. 1st Conference for Green Engineering, Sustainable Materials and Technologies for Circular Economy, GREEN CIRC 2024. University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, Faculty of Technology and Metallurgy. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/958850
3. **Milenković, A.**, Slavčo Aleksovski, , Stanojević, J., Karmina Miteva, , & Stanojević, L. (2022). Chemical composition and antioxidant activity of Frankincense essential oil, Proceedings, p. 103. Serbian Biochemical Society, Eleventh Conference, Scientific meeting of an international

character, September 22nd and 23rd, 2022, Novi Sad, Serbia, “Amazing Biochemistry”. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876215
4. Stanojević, K., **Milenković, A.**, Pavlović, D., Matejić, J., Gajić, I., Dinić, A., & Stanojević, L. (2023). Anti-inflammatory activity of wild carrot (*Daucus carota* L.) umbels ethanolic extracts from serbia and greece. 3rd scientific symposium of the pharmaceutical association of serbia with International Participation, 73(NO. SUPPL. 4), S71–S72. Beograd : Savez farmaceutskih udruženja Srbije, Beograd i Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Beograd. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877177
5. **Milenković, A.**, Simonović, N., Zvezdanović, J., Stanojević, J., Cvetković, D., & Stanojević, L. (2022). The influence of the operation conditions on the yield, composition and antioxidant activity of ethanol extracts from cubeb pepper (*Piper cubeba* L.) fructus. 14th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kladovo, 26th to 29th June 2022 - Book of Abstracts. Niš : Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/877669
6. Stanojević, L., Cvetković, D., Nikolić, G., Stanojević, J., **Milenković, A.**, & Lazarević, A. (2022). The influence of the extracion technique on the yield, composition and antioxidant activity of the ethanolic extract from guelder-rose leaves (*Viburnum opulus* L.). Forestry Science for Sustainable Development FORS2D – Perspectives of Forestry and Related Sectors as Drivers of Sustainable Development in the Post-Covid Era. Banja Luka : Faculty of Forestry, University of Banja Luka. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876318
7. **Aleksandra Milenković,** Ljiljana Stanojević, Jelena Zvezdanović, Dragan Cvetković, Goran Nikolić, Jelena Stanojević, *Viburnum opulus* L. leaves - Promising source of phenolic compounds, macro- and microelements, Book of abstracts, p. 171. Forestry science for sustainable development FORS2D – Perspectives of forestry and related sectors as drivers of sustainable development in the post-Covid era, 29–30. September 2022. Banja Luka, https://forsd.sf.unibl.org/en
8. Lazarević, A., Stanojević, L., **Milenković, A**., Stanojević, J., Ilić, Z., Cvetković, D., & Milenković, L. (2022). Essential oils content, composition and antioxidant activity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) from Serbia. Forestry Science for Sustainable Development FORS2D – Perspectives of Forestry and Related Sectors as Drivers of Sustainable Development in the Post-Covid Era. Banja Luka : Faculty of Forestry, University of Banja Luka. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/876315
9. **Milenković Aleksandra**, Stojanović Radić, Z. Z., Pejčić M., Stanojević, L. P., & Stanojević Jelena, (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.), cubeb (*Piper cubeba* L.) and allspice (*Pimenta dioica* (L.) Merr) essential oils. Book of Abstracts. Department of Biology and Ecology, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš Institute for Nature Conservation of Serbia, Stara planina. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/301765
10. Stanojević, L. P., **Milenković, A.**, Cvetković, D. J., Stanojević, J. S., & Babić M., (2019). Antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.), cubeb (*Piper cubeba* L.) and allspice (*Pimenta dioica* (L.) Merr) extracts. 13 Th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Stara Planina, Srbija. Niš : Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš Institute for Nature Conservation of Serbia. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/334024
11. Stanojević, L. P., **Aleksandra Milenković**, Stanojević, J. S., & Bojana Danilović, (2019). The effect of the extraction techniques on the antioxidant and antimicrobial activity of ethanolic extracts from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) pedicles. Ninth Conference with International participation, Proceedings. Serbian Biochemical Society, Beograd. https://enauka.gov.rs/handle/123456789/421548

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Екстракција, изолација и карактеризација биоактивних супстанци из плода црног бибера (*Piper nigrum* L.)

која је одбрањена на Технолошком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица

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

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

_____

Александра Н. Миленковић

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов дисертације:

Екстракција, изолација и карактеризација биоактивних супстанци из плода црног бибера (*Piper nigrum* L.)

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу,** истоветан штампаном облику

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

_____

Александра Н. Миленковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Екстракција, изолација и карактеризација биоактивних супстанци из плода црног бибера (*Piper nigrum* L.)

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

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

_____

Александра Н. Миленковић