

## FITOHEMIJSKI PROFIL I BIOLOŠKI POTENCIJAL ČAJNOG NAPITKA DUDA (*MORUS NIGRA* L.)

*Sladana Čestić<sup>1</sup>, Marija Radojković<sup>1</sup>, Aleksandra Cvetanović<sup>1</sup>, Pavle Mašković<sup>2</sup>, Zoran Zeković<sup>1</sup>*

**Izvod:** Crni dud (*Morus nigra* L.) je medicinski važna biljka iz porodice *Morus*. U ovom radu ispitan je sadržaj ukupnih fenola i flavonoida kao i antioksidativna, antimikrobna i citotoksična aktivnost čajnih napitaka lista crnog duda. Čajni napitci su pripremani korišćenjem vode različite temperature (70, 80, 90°C i ključala voda). Ispitivanja koja su urađena su pokazala da čajni napitci poseduju visoku antioksidativnu, antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost. Najbolje osobine pokazali su napitci pripremani sa ključalom vodom. Čajni napici lista duda se mogu smatrati odgovarajućim izvorom prirodnih bioaktivnih komponenti, koji mogu naći primenu u vidu dodataka ishrani ili herbalnih lekova.

**Ključne reči:** *Morus nigra*, dud, čajni napitak, fitohemijski profil, biološka aktivnost

### Uvod

Rod *Morus* čini 24 vrste i više od sto poznatih varijacija (Ahmed i sar., 2011). U narodnoj medicini dud ima bogatu istoriju i značajno mesto u fitoterapiji, skoro svi delovi ove biljke pokazuju lekovita svojstva. Mnoge biohemijske komponente, kao što su: moranolin, albufuran, albanol, morusin, kuwanol, calystegin, hidrosimoricin, izolovane iz biljke duda danas igraju važnu ulogu u farmaceutskoj industriji (Bose, 1989). Ispitivanja duda, su sve učestalija i zanimljivija naučnicima zbog visokog sadržaja polifenolnih komponenti, a samim tim i izrazitog biopotencijala (Ercisli i sar., 2010; Radojković, 2012). Listovi duda se koriste za ishranu insekata u industriji svile i u azijskim zemljama nalaze široku primenu u fitoterapiji. U Kini se fitopreparati na bazi lista duda koriste hiljadama godina za lečenje povećanog šećera, različitih upalnih procesa, kašlja, visokog pritiska i raka (Ahmed i sar., 2011; Radojković, 2012). U Srbiji, i na Balkanu, dud je drvo koje je široko rasprostranjeno, ali nedovoljno iskorišćen prirodni resurs.

Čajevi čine najčešći oblik lekovitog biljnog preparata. Zbog svoje jednostavnosti pripreme, dostupnosti i ekonomičnosti ukazuju na niz prednost u konzumiranju (Yang i sar., 2000). U ovom radu je ispitan fotohemijski sadržaj i biološka aktivnost čajnog napitka lista crnog duda. Određen je ukupan sadržaj fenola i flavonoida u čajnom napitku u zavisnosti od temperature vode koja je korišćena u pripremi napitka. Takođe, određena je i antioksidativna, antimikrobna i citotoksična aktivnost čajnih napitaka.

<sup>1</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija ([ramarija@uns.ac.rs](mailto:ramarija@uns.ac.rs));

<sup>2</sup> Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija.

Ovim istraživanjem se pokazuje mogućnost iskorišćenja prirodnog resursa, lista crnog dudu u vidu fitopreparata koji nisu dostupni na tržištu.

### Materijal i metode rada

Biljni material korišćen u ovom radu je list crnog dudu, *Morus nigra folium*, komercijalna sirovina koja je dostupna na tržištu, proizvođača Adonis d.o.o., Sokobanja. List crnog dudu je usitnjen fabrički i upakovan u papirnu kesu. Materijal je čuvan u zatvorenom i tamnom prostoru, na sobnoj temperaturi i zaštićen od svetlosti. Tako usitnjena droga ( $d_{sr}=1,26\pm 0,07$  mm) korišćena je za sve dalje postupke i ispitivanja.

#### *Dobijanje čajnog napitka*

List dudu (2 g) prelišen je sa vodom određene temperature (200 ml), poklopljen i ostavljen da stoji određeno vreme. Nakon vremena od 10 minuta pripremljeni čajni napitak je profiltriran i kao takav korišćen u daljim analizama. Temperatura vode koja je služila za pripremu čajnog napitka je bila 70, 80, 90°C i ključala voda.

#### *Određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida*

Sadržaj ukupnih fenola u čajnim napicima i ekstraktima dudu određen je metodom po Follin-Ciocalteu (Singelton i Rosi, 1965). Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima i čajnim napicima određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (1989). Rezultati su izraženi za ukupan sadržaj fenola u mg ekvivalenta hlorogenske kiseline po jednom g droge (mg EHK g<sup>-1</sup> droge) tj. za ukupan sadržaj flavonoida mg ekvivalenta rutina po jednom gramu droge (mg ER g<sup>-1</sup> droge). Rezultati su prikazani i kao sadržaj adekvatnog ekvivalenta po 200 ml čajnog napitka što je uobičajena zapremina napitka koja se konzumira.

#### *Određivanje aktivnosti čajnog napitka*

Čajnim napicima lista dudu (*Morus nigra*), pripremljenim na različitim temperaturama, određena je antioksidativna, citotoksična i antimikrobna aktivnost. Antioksidativna aktivnost čajnih napitaka određena je primenom DPPH metode (Espin i sar., 2000). Upotrebom mikrodilucione metode određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) čajnih napitaka na mikrotitar pločama sa 96 udubljenja-bunarčića (Satyajit i sar., 2007) tj. antimikrobna aktivnost. Za ispitivanje citotoksičnog delovanja upotrebljena je jednostavna, ekonomična i brza MTT test metoda u *in vitro* uslovima (Mosmann 1983; Baviskar i sar. 2012). MTT test temelji se na redukciji tetrazolijevе soli MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolijum bromid] mitohondrijalnom reduktazom do formazina, kada iz svetložutog MTT nastaju tamno-ljubičasti kristali formazana. Pri određivanju citotoksičnog delovanja čajnih napitaka dudu korišćene su tumorske ćelije: Hep2c –humana ćelijska linija (*human larynx carcinoma*), podloga: MEM Eagle/5%FCS; RD –humana ćelijska linija (*rhabdomyosarcoma*), podloga: MEM

Eagle/10%FCS; L2OB – mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transefektovani neki geni, podloga: MEM Eagle/10%FCS.

Sva merenja su uradjena u tri ponavljanja i rezultati su prikazani određivanom vrednošću sa odstupanjem tj. standardnom devijacijom (SD).

### Rezultati istraživanja i diskusija

Čajnim napicima lista duda (*Morus nigra*) pripremljenim na različitim temperaturama, određen je sadržaj fenola i flavonoida, antioksidativna, citotoksična i antimikrobna aktivnost. U zavisnosti od temperature pripremljenog čajnog napitka, vrednost ukupnih fenola se kreće od 21,66 do 31,77 mg EHK g<sup>-1</sup> droge tj. od 45,40 do 63,40 mg EHK 200 ml<sup>-1</sup> čajnog napitka (tabela 1). Na osnovu izmerenih vrednosti može se приметiti da sa porastom temperature raste i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Najveći sadržaj ukupnih fenola uočen je u čajnom napitku pripremljenom sa ključalom vodom. Nešto niže, ali i dalje značajne vrednosti su dobijene pri temperaturi vode od 90°C. Istraživanja Hong i sar. (2013) ukazuju da je za pripremu vodenih ekstrakata (što se odnosi i na čajni napitak) najbolje koristiti temperaturu vode od 90°C do temperature ključanja, što je u skaldu sa dobijenim rezultatima ovog istraživanja. U pogledu sadržaja flavonoida rezultati ukazuju na nešto drugačije sadržaje u funkciji temperature vode, najveći sadržaj ukupnih flavonoida dobijen je korišćenjem vode od 80°C (tabela 2): 27,25 mg ER g<sup>-1</sup> droge tj. 54,40 mg ER 200 ml<sup>-1</sup> čajnog napitka. Nesumljivo je da temperatura vode utiče na sadržaj ukupnih polifenolnih komponenti, proces zagrevanja dovodi do povećanja sadržaja izdvojenih polifenola sve do određene temperature, temperature degradacije pojedinačnih komponenti (Lee i sar., 2005; Kim i sar., 2006). Predpostavlja se da je dobijena razlika u pogledu uticaja temperature posledica različite temperaturne stabilnosti komponentata koje su prisutne u čajnom napitku duda. Isto tako, izdvajanje određenih bioloških i farmakološki aktivnih komponenti, u koje spadaju i polifenolne komponente, dalje utiču i na biološku aktivnost pripremanog čajnog napitka što je dalje ispitano.

Tabela 1. Ukupan sadržaj fenola (USF) i ukupan sadržaj flavonoida (USFL) u čajnom napitku duda

Table 1. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of mulberry teas

Temperatura Temperature (°C)	USF (mg EHK g <sup>-1</sup> ) TPC (mg EHK g <sup>-1</sup> )	USF (mg EHK 200 ml <sup>-1</sup> ) TPC (mg EHK 200 ml <sup>-1</sup> )	USFL (mg ER g <sup>-1</sup> ) TFC (mg ER g <sup>-1</sup> )	USFL (mg EHK 200 ml <sup>-1</sup> ) TFC (mg EHK 200 ml <sup>-1</sup> )
70	21,66±2,03	45,40±2,03	24,46±0,40	48,80±0,40
80	26,55±0,84	53,20±0,84	27,25±0,45	54,40±0,45
90	29,22±2,54	58,40±2,54	22,02±0,38	44,00±0,38
Ključanja Boiling temperature	31,77±2,52	63,40±2,52	20,58±0,90	41,20±0,90

Primenom DPPH metoda ispitani su čajni napitci lista crnog dudu pripremani sa vodom različite temperature (tabela 2). Čajni napitak, pripremljen sa ključalom vodom, ima najnižu IC<sub>50</sub> vrednost (0,0724 mg/ml), što ukazuje na najveću antioksidativnu aktivnost. Sa opadanjem temperature opadaju i antioksidativne aktivnosti čajnih napitaka. Gazzani i sar. (1998) su došli do saznanja da se antioksidativna aktivnost mnogih biljnih sokova stabilizuje ključanjem, smatrajući da se početna prooksidativna aktivnost dešava zbog prooksidaza koje su neaktivne na visokim temperaturama. Castenmiller i sar. (2002) tvrde da antioksidativna aktivnost čajnih napitaka zavise od termalnog procesa (temperature) i vrsta bilja što je i ovde prikazano.

Tabela 2. IC<sub>50</sub> vrednosti čanog napitka dudu  
 Table 2. Radical scavenging activity of mulberry teas

Temperatura Temperature (°C)	IC <sub>50</sub> ± SD (mg ml <sup>-1</sup> )
70	0,1060 ± 0,004
80	0,0860 ± 0,004
90	0,0810 ± 0,002
Ključanja Boiling temperature	0,0724 ± 0,001

Tabela 3. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) čajnog napitka dudu  
 Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of mulberry teas

Mikroorganizam Microbial strains	MIK (µg ml <sup>-1</sup> ) MIC (µg ml <sup>-1</sup> )		
	Čajni napitak Tea	Amracin (standard)	Ketokonazol (standard)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	78,125	0,97	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	39,100	0,49	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	78,125	0,97	/
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	156,25	0,49	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	156,25	0,49	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	78,125	0,24	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19,530	/	1,95
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	78,125	/	0,97

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ukazuju da čajni napitak inhibira rast svih ispitivanih mikroorganizama. Minimalna inhibitorna koncentracija za bakterije se

kreće u intervalu od 39,1 do 156,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , a za gljivice od 19,53 do 78,125  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (tabela 3). Čajni napitak najveći uticaj pokazuje na *Candidu albicans* (MIK 19,53  $\mu\text{g/ml}$ ) i *Klebsiella pneumoniae* (MIK 39,1  $\mu\text{g/ml}$ ). Prikazani rezultati ukazuju dobar uticaj čajnog napitka na bakteriju *Staphylococcus aureus* (MIK 78,125  $\mu\text{g/ml}$ ). Ispoljena aktivnost značajna je za opštu karakterizaciju bioloških aktivnosti ispitanog čajnog napitka dudu, imajući u vidu da *Staphylococcus aureus* pokazuje visoku rezistenciju na antibiotike, pre svega na  $\beta$  laktame i makrolide koji se koriste u terapiji infekcija (Garrity i sar., 2005). U svojim publikacijama Fukai i sar. (2005) dokazali da jedinjenje chalcomoracin, izolovano iz lista dudu, ima izrazit antibakterijski učinak na *S. aureus* (MIC 0,78  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Citotoksična aktivnost čajnog napitka dudu određena je primenom MTT testa na tri ćelijske linije (*Hep2c* ćelije, *RD* ćelije i *L2OB* ćelije) u *in vitro* uslovima i prikazana kao  $\text{IC}_{50}$  vrednost (tabela 4). Dobijeni rezultati se porede sa rezultatima standardnog jedinjenja *cis*-diamminedichloroplatinum (*Cis*-DDP) sa izrazitom citotoksičnom aktivnošću. Analizirani čajni napitak pokazuje varijabilnost u sposobnosti inhibicije ćelijskih linija. Na osnovu rezultata u tabeli vidi se da čaj dudu pokazuje citotoksični učinak.  $\text{IC}_{50}$  vrednosti se kreću u intervalu od 22,25 do 101,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Osetljivost ćelija opada u nizu: *Hep2c* ćelije > *RD* ćelije > *L2OB* ćelije.

Tabela 4.  $\text{IC}_{50}$  vrednosti čajnog napitka dudu

Table 4.  $\text{IC}_{50}$  values of mulberry teas

Uzorak Sample	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		
	Hep2cćelije	RDćelije	L2OBćelije
Čajni napitak Tea	22,25±1,17	30,07±0,63	101,25±0,14
<i>cis</i> -diamminedichloroplatinum ( <i>Cis</i> -DDP)	0,94 ± 0,55	1,4 ± 0,97	0,72 ± 0,64

### Zaključak

Rezultati istraživanja pokazuju da se u čajnim napitcima lista crnog dudu nalazi visok sadržaj polifenolnih komponenti. Takođe, dokazano je da čajni napitci dudu poseduju izuzetnu antioksidativnu, antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost. Temperatura vode koja se preporučuje za pripremu čajnih napitaka je temperatura ključanja. Čajni napitak lista crnog dudu kao najjednostavnija forma fitopreparata je preporučljiva za primenu i dalja istraživanja radi plasiranja na tržište dijetetskih suplemenata i dodataka ishrani. Ovim istraživanjem je dokazano da čajni napitci lista dudu se mogu smatrati odgovarajućim izvorom prirodnih bioaktivnih komponenti.

### Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta „Farmakološki aktivne supstance na bazi lekovitog/aromatičnog bilja za primenu u farmaciji (TR31013)“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

**Literatura**

- Ahmed M.A.Abd. El-Mawia, Khaled M. M., Ashraf M.M. (2011). Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of *Morus nigra* and Testing their Hypoglycemic Efficacy, *Sci Pharm*, 79(4): 951-961.
- Baviskar B.A., Khadabadia S.S., Deore S.L., Shiradkar M.R. (2012). Synthesis of clubbed Triazolyl Indeno[1,2-C]Isoquinolines as an Novel Anticancer Agent. *Der Pharmacia Sinica*, 3:24–30
- Bose P.C. (1989). Genetic resources of mulberry and utilization. CSR and TI, Mysore, India, 183–190.
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. (2005) Class III. Gammaproteobacteria class. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Objavljeno u The Proteobacteria, part B (The Gammaproteobacteria), Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (eds. 2, vol 2), 1-3, New York, Springer.
- Castenmiller J.J.M., Linssen J.P.H., Heinonen I.M., Hopia A.I., Schwarz K., Hollmann P.C.H., West C.E. (2002). Antioxidant properties of differently processed spinach products, *Nahrung/Food* 46 (4): 290-293
- Ercisli S., Tosun M., Duralija B., Voća S., Sengul M., Turad M. (2010). Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) mulberry genotypes, *Food Technology and Biotechnology*, 48:102–106.
- Espin J.C., Soler-Rivas C., Wichers H.J. (2000). Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 648-656.
- Fukai T., Kiyoshi K., Terada S. (2005). Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 76:708–711.
- Gazzani G., Papetti A., Massolini G., Daglia M. (1998). Antioxidative and pro-oxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *Food Chemistry*, 6: 4118–4122.
- Hong H.C., Li S.L., Zhang X.Q., Ye W.C., Zhang Q.W. (2013). Flavonoids with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*. *Chinese Medicine*, 8:19.
- Kim E.O., Lee J.Y., Choi S.W. (2006). Quantitative changes in phenolic compounds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds during growth and processing. *Food Science and Nutrition*, 11: 311-317.
- Lee J.Y., Park K.S., Choi S.W. (2005). Changes in flavonoid contents of safflower leaf during growth and processing. *Food Science and Nutrition*, 10:1-5.
- Markham K.R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. U: Harborne, J.B., Dey, P.M. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 193-237.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55–63
- Radojković M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp. *Moraceae*), sastav, delovanje i primena, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

- Satyajit D, Sarker L.N., Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate based antibacterial assay incorporating resazurin as indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42:321–324
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Yang C.S., Landau J.M. (2000). Effects of Tea Consumption on Nutrition and Health. *Journal of Nutrition*, 130: 2409-2412.

## PHYTOCHEMICAL PROFILE AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF MULBERRY TEAS (*MORUS NIGRA* L.)

*Slađana Čestić<sup>1</sup>, Marija Radojković<sup>1</sup>, Aleksandra Cvetanović<sup>1</sup>, Pavle Mašković<sup>2</sup>, Zoran Zeković<sup>1</sup>*

### Abstract

Black mulberry is the most medicinally important plant of the genus *Morus*. This study examines the chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of mulberry leaves tea. The tea drinks were prepared in water (70, 80, 90 ° C and boiling temperature). This study has shown that mulberry teas have high antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity. Experimental investigation has shown that the best conditions for preparing mulberry tea are with boiling water. Mulberry teas could be regarded as a promising source of bioactive natural compounds, which can be used both as a food supplement and a herbal remedy.

**Key words:** *Morus nigra*, mulberry, tea, phytochemical profile, biological potential

---

<sup>1</sup> Univerziteti of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad, Serbia ([ramarija@uns.ac.rs](mailto:ramarija@uns.ac.rs));

<sup>2</sup> University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia.