Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka (Taraxacum officinale weber) u ruralnim sredinama

Ivanac, Igor

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:304434

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije; istraživački smjer

Igor Ivanac

Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) u ruralnim sredinama

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije; istraživački smjer

Igor Ivanac

Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) u ruralnim sredinama

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Vlatka Gvozdić

Komentorica: doc. dr. sc. Lidija Begović

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka *(Taraxacum officinale* Weber) u ruralnim sredinama

Igor Ivanac

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju i Odjelu za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Mentorica: doc. dr. sc. Vlatka Gvozdić

Komentorica: doc. dr. sc. Lidija Begović

Sažetak: Maslačak (*Taraxacum officinale* Weber) je samonikla biljna vrsta sjeverne polutke. Zbog visoke sposobnosti akumulacije kemijskih elemenata, ispunjava sve uvjete za ispitivanje utjecaja zagađenja te se smatra dobrim bioindikatorom. U ovom radu opisano je istraživanje utjecaja poljoprivrednog zagađenja na biokemijske parametre maslačka što uključuje koncentraciju proteina, klorofila i karotenoida, sadržaj askorbinske kiseline i ukupnih topivih polifenola. Povećana koncentracija proteina u uzorcima prikupljenim na zagađenim lokacijama bila je popraćena smanjenjem ukupnih topivih polifenola i askorbinske kiseline te koncentracije karotenoida i klorofila. Nadalje, došlo je do povećanja ukupne antioksidativne aktivnosti kod uzoraka prikupljenih na zagađenim lokacijama. Metode analize glavnih komponenata i infracrvene spektroskopije Fourierovim transformacijama (FT-IR) potvrdile su razlike rezultata dobivenih biokemijskim analizama. To ukazuje da su poljoprivredni zagađivači negativno utjecali na produkciju sekundarnih metabolita unatoč dobrom fiziološkom odgovoru te je maslačak pogodna biljna vrsta za ispitivanje utjecaja poljoprivrednog zagađenja i abiotičkog stresa.

Diplomski rad obuhvaća: 31 stranicu, 9 slika, 1 tablicu, 48 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antioksidativna aktivnost / askorbinska kiselina / polifenoli / karotenoidi / proteini / FTIR spektroskopija

Rad prihvaćen: 26.10.2020.

Stručno povjerenstvo: 1. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc.dr.sc. Vlatka Gvozdić, mentorica i članica
3. doc.dr.sc. Selma Mlinarić, članica
4. doc.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION VARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department od Chemistry

Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

Physiological condition of dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) in rural areas assessed by biochemical parameters

Thesis completed at: Department of Chemistry and Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Assist. Prof. Vlatka Gvozdić, PhD

Co-mentor: Assist. Prof. Lidija Begović, PhD

Abstract: Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) is a wild plant species of the northern hemisphere. Due to its high ability to accumulate chemical elements, it is a good species for the investigation of the impact of pollution and is considered a good bioindicator. This paper describes the impact of agricultural pollution on the biochemical parameters of dandelion, which include the concentration of proteins, chlorophyll and carotenoids, the content of ascorbic acid and total soluble polyphenolics. The increased protein concentration in samples collected at contaminated areas was accompanied by a decrease in total soluble polyphenolics, ascorbic acid, carotenoid and chlorophyll concentrations. Furthermore, there was a significant increase in total antioxidant activity in samples collected at contaminated sites. The principal component analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) confirmed the differences in the results obtained by biochemical analyses. This indicates that agricultural pollutants have negatively affected the production of secondary metabolites despite the good physiological condition of the plants and that a dandelion is a suitable plant species for investigation of the impact of agricultural pollution and abiotic stress.

Original in: Croatian

Key words: antioxidant activity / ascorbic acid / polyphenolics / carotenoids / proteins / FTIR spectroscopy

Thesis includees: 31 pages, 9 figures, 1 tables, 48 references

Reviewers: 1. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD; chair
2. Assist. Prof. Vlatka Gvozdić, PhD; supervisor and member
3. Assist. Prof. Selma Mlinarić, PhD; member
4. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić, PhD; substitute member

Thesis accepted: 26.10 2020.

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Sadržaj

1. Uvod ... 1

2. Literaturni pregled ... 2

2.1. Maslačak ... 2

2.2. Utjecaj zagađivača poljoprivrednog porijekla ... 2

2.2.1. Poljoprivreda i zagađenje zraka ... 2

2.2.2. Utjecaj poljoprivredne djelatnosti na tlo ... 3

2.2.3. Utjecaj poljoprivredne proizvodnje na podzemne i površinske vode ... 3

2.3.4. Utjecaj poljoprivrednog zagađenja na zdravlje ... 4

2.3. Oksidativni stres ... 4

2.4. Antioksidativna aktivnost ... 6

2.4.1. Askorbinska kiselina ... 6

2.4.2. Karotenoidi ... 7

2.4.3. Polifenoli ... 7

3. Materijal i metode ... 8

3.1. Uzorkovanje ... 8

3.2. Priprema biljnog materijala ... 11

3.3. Kemikalije ... 11

3.4. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata ... 12

3.5. Određivanje koncentracije proteina ... 12

3.6. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline (AA) ... 13

3.7. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola ... 13

3.8. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti ... 14

3.8.1. FRAP-metoda ... 15

3.8.2. iRAC-metoda (*Iron (III) reducing antioxidant capacity assay)* ... 15

3.9. FTIR (*engl. Fourier-transform infrared spectroscopy*) spektroskopija ... 15

3.10. Statistička analiza biokemijskih parametara ... 15

3.11. Analiza glavnih komponenata (eng. Principal Component Analysis; PCA) ... 15

4. Rezultati ... 17

4.1. Koncentracija proteina ... 17

4.2. Ukupna koncentracija fotosintetskih pigmenata ... 18

4.3. Koncentracija askorbinske kiseline i sadržaj ukupnih topivih polifenola ... 19

4.4. Ukupna antioksidativna aktivnost (FRAP i iRAC metode) ... 20

4.5. FT-IR spektri 21
4.6. Analiza glavnih komponenata 22
5. Rasprava 23
6. Zaključak 27
7. Literatura 28
8. Dodaci 31
8.1. Popis kratica 31

1. Uvod

Biljke se tijekom cijelog životnog ciklusa suočavaju sa stresom kojeg uzrokuju biotički i abiotički čimbenici koji negativno utječu na njihov rast, razvoj i produktivnost. Biotički čimbenici uključuju insekte, gljivice i korov, dok u abiotičke ubrajamo utjecaj visokih i niskih temperatura, salinitet, teške metale, pesticide, sušu, ultraljubičasto (UV) zračenje. Oba tipa čimbenika pospješuju nastanak slobodnih radikala. Reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive oxygen species* - ROS) uključuju radikalne i neradikalne oblike. Takve čestice su vrlo reaktivne i mogu nanijeti veliku štetu biomolekulama kao što su proteini, DNA ili lipidi te na kraju dovesti do stanične smrti. Pod utjecajem stresnih faktora povećana razina ROS-a uklanja se pomoću biljnog antioksidacijskog sustava [1]. Amplituda abiotičkih stresova znatno se povećala posljednjih godina, uglavnom zbog antropogenih aktivnosti. U takvim okolnostima kod biljaka se aktivira skup učinkovitih mehanizama koji pomažu održati narušenu ravnotežu metabolizma [2]. Zaštitni mehanizmi uključuju i antioksidanse, molekule koje inhibiraju ili zaustavljaju reakcije slobodnih radikala i odgađaju ili inhibiraju stanično oštećenje. Iako se antioksidacijski sustavi razlikuju od vrste do vrste, prisutnost antioksidacijskog sustava je univerzalna. Pa tako razlikujemo enzimatske i neenzimatske oblike unutarstaničnih i izvanstaničnih antioksidansa [3].

Poljoprivreda se može smatrati izvorom egzistencije i ekonomskog razvoja zbog proizvodnje potrebne hrane, no popratno zagađenje nastalo poljoprivrednom djelatnošću može prouzročiti niz okolišnih i zdravstvenih problema. Vrlo je važno poznavati prirodu i ponašanje takvih zagađivača u okolišu, stoga je potrebno istražiti sastav i svojstva raznih poljoprivrednih zagađivača te njihov način djelovanja kako bi se razumjele opasnosti onečišćenja nastalog uslijed poljoprivredne proizvodnje [4].

Cilj ovog rada je uvidjeti učinak poljoprivrednog zagađenja i abiotički stresora na fiziološko stanje maslačka, odrediti koncentracije karotenoida, proteina, polifenola, askorbinske kiseline i odrediti ukupnu antioksidativnu aktivnost usporedbom rezultata mjerenja sa zagađenih mjesta uzorkovanja u odnosu na mjesta uzorkovanja gdje nije bilo zagađenja.

2. Literaturni pregled

2.1. Maslačak

Maslačak (*Taraxacum officinale L.*) je višegodišnja livadna biljka iz porodice Asteraceae koja raste i cvate od ranog proljeća do kasne jeseni. To je zeljasta biljka sa snažnim vretenastim korijenom i listovima promjenjiva oblika združenim u prizemnu rozetu. Žuti cvjetovi su združeni u karakteristične cvatne glavice, a nakon oplodnje stvara se plod roška koja se rasprostranjuje vjetrom. Maslačak je samonikla biljka čitave sjeverne polutke, od nizinskih do predplaniniskih područja, a dolazi često u većem broju na travnatim površinama, djetelištima, napuštenim njivama i vrtovima. Mladi listovi maslačka su jestivi i ljekoviti, obiluju vitaminom C i mineralima kao što su kalij, željezo, natrij i fosfor te eteričnim uljima i masnim kiselinama i inulinom koji se može koristiti kao zamjena za kavu dok se cvjetovi koriste za pripremu meda [5]. Maslačak je posebno atraktivan kandidat za biološko praćenje zagađenja kako na lokalnoj, tako i na globalnoj razini. Mnoga istraživanja pokazala su povezanost između razine zagađenja određenog elementa u okolišu i koncentracije istog elementa u tkivima ove biljke [6].

2.2. Utjecaj zagađivača poljoprivrednog porijekla

Poljoprivredno zagađenje je onečišćenje koje se ispušta u okoliš kao nusprodukt poljoprivredne proizvodnje. Obično se dijeli u dvije kategorije: onečišćenje koje dolazi od uzgoja životinja i onečišćenje od uzgoja usjeva, uključujući stočnu i ljudsku hranu te usjeve za biogorivo [7]. Poljoprivredni zagađivači također se mogu razvrstati na one tvari koje se namjerno unose u okoliš (pesticidi, umjetna gnojiva, genetski modificirani usjevi), otpadne tvari proizvedene poljoprivrednim postupcima (otpadne vode od silaže i gnojnica stoke) te tvari proizvedene pojačavanjem/modifikacijom prirodnih procesa u poljoprivrednoj djelatnosti kao što su plastenici s kontroliranim uvjetima [8].

2.2.1. Poljoprivreda i zagađenje zraka

Zagađenje zraka je izraz koji opisuje onečišćenje nekim neželjenim čvrstim, tekućim ili plinovitim materijalima prisutnim u zraku. Poljoprivredno zemljište sa zagađenjem zraka povezano je na dva načina, preko nepoljoprivrednih izvori (promet, industrija) i poljoprivrednih aktivnosti. Nepoljoprivredni izvori povećavaju koncentraciju zagađivača zraka koji mogu imati loš utjecaj na poljoprivredne usjeve dok poljoprivredne aktivnosti mogu povisiti koncentraciju zagađivača koji mogu loše utjecati na zrak, okoliš i ostala područja. Takvi zagađivači mogu biti

razne toksične kemikalije, staklenički plinovi kao što su: ozon, sumporov dioksid, fluorid, ugljikov dioksid, dušikov oksid [4].

2.2.2. Utjecaj poljoprivredne djelatnosti na tlo

Poljoprivredna zemljišta se koriste za uzgoj usjeva kako bi se zadovoljila sve veća potreba za hranom. No, zbog neprikladne uporabe istih, događa se degradacija zemljišta uzrokovana povećanom kultivacijom, industrijalizacijom, krčenjem šuma i prekomjernom uporabom gnojiva. Pretjerana ispaša, dezertifikacija, uklanjanje hranjivih sastojaka, povećanje koncentracije soli u tlu te erozija tla vodom ili vjetrom mogu dovesti do degradacije tla. Degradacija tla utječe na uzgoj usjeva i biološku raznolikost [9]. Vjetar ili voda sa sobom nose male čestice (hranjive tvari, minerale) koje bi se inače razgradile pod zemljom. Takve pojave dovode do promjene strukture tla, smanjenja produktivnosti usjeva i smanjuje njihovu kvalitetu [4].

Zagađenje poljoprivrednih površina u različitim zemljama posljedica je prekomjerne upotrebe gnojiva i pesticida. Sve veća količina kemikalija se primjenjuje na tlima, što rezultira povećanjem razine teških metala poput kadmija, arsena i olova [10]. Pesticidi mogu biti bilo koja tvar ili kombinacija različitih tvari koja je namijenjena prevenciji, uništavanju ili odbijanju bilo koje štetočine kako bi se osigurala što veća produktivnost. No, pesticidi i njihovi nusprodukti nastali njihovom razgradnjom mogu dospjeti u okoliš, tlo ili rijeke te dovesti do nakupljanja štetnih tvari [4]. Umjetna gnojiva koja sadrže velike koncentracije kalija i natrija snižavaju pH tla i narušavaju strukturu tla. Nadalje, gnojiva koja sadrže fosfate glavni su uzrok nakupljanja kadmija u tlu u usporedbi s ostalim gnojivima. Izvori teških metala, osim gnojiva, su i druge agrokemikalije poput stočnog gnojiva i upotrebe zagađene vode za navodnjavanje [11].

2.2.3. Utjecaj poljoprivredne proizvodnje na podzemne i površinske vode

Svojstva tla i vode usko su povezana, zdravo tlo održava vodu čistom, isto tako nezagađena voda održava pogodna svojstva tla [4]. Mnogo je potencijalnih izvora zagađenja vode koji potječu od poljoprivredne proizvodnje. Jedan od njih je sediment od erozije tla, koji nije specifičan samo za poljoprivredu, jer velik dio sedimenta dolazi iz kanala uz cestu, kućanstava i tvornica. Hranjive tvari na bazi dušika i fosfora primarno dolaze iz umjetnih gnojiva koja se primjenjuju za poboljšanje prinosa. Životinjski otpad se prenosi površinskim otjecanjem, ispire se izravno u potoke iz hranilišta, odljeva s usjeva nakon nanošenja stajskog gnoja ili procjeđuje u rezervoare podzemnih voda. Ovaj tip zagađenja je u potpunosti poljoprivrednog porijekla. Važno je spomenuti i pesticide koji se također ispiru sa zemljišta na kojima su primijenjeni za

suzbijanje insekata i korova [12]. Proteklih godina, salinizacija vodenih površina je rasprostranjenija i više zabrinjava od salinizacije tla zbog prisutnost nekih metala u tragovima u poljoprivrednim odvodnim sustavima, kao što su selen, molibden, arsen, koji uzrokuju zagađenje [4].

2.3.4. Utjecaj poljoprivrednog zagađenja na zdravlje

Zbog toksičnosti za biljke i ljude, uporaba agrokemikalija koje se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji regulirana je postupcima registracije i procjenama rizika te im je cilj zaštiti tla i vodene resurse (ekosustav), ali i proizvođače i potrošače [13]. Pretpostavlja se da je porast određenih neoplazmatskih bolesti u Aziji povezan s kancerogenim tvarima koje se oslobađaju raspadom i razgradnjom umjetnih gnojiva i pesticida. Također se smatra da je u Indiji povećana stopa ljudi oboljelih od karcinoma uzrokova izloženosti agrokemikalijama. Provedeno je istraživanje koje povezuje velike količine pesticida koju poljoprivrednici koriste na usjevima s čestim slučajevima karcinoma želuca, kože, mozga te leukemije i limfoma [14].

2.3. Oksidativni stres

Poljoprivredno zagađenje, bilo organskog ili anorganskog porijekla koje apsorbiraju živi organizmi dovode do nastanka osmotskog stresa zbog povećane količine soli, teških metala ili zbog nedostatka vode. Solni stres često stvara i osmotski i ionski stres u biljkama što za posljedicu ima akumulaciju ili pad specifičnih sekundarnih metabolita u biljkama [15]. Stanica gubi vodu iz citoplazme, što rezultira smanjenjem količine vode u citosolu i vakuolama [16]. Kao odgovor na povećani salinitet može doći do povećanja količine antocijanina i polifenola [17]. Deficit vode i salinitet su najveći globalni problemi kod osiguravanja zadovoljavajućih prinosa poljoprivrednih kultura [18]. U tom slučaju se kod biljaka često povećava količina flavonoida i fenolnih kiselina [19], može doći do promjene omjera klorofila *a* i *b* i karotenoida [20] te do akumulacije antocijana [21].

Reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive oxygen species* - ROS) su nezaobilazni nusprodukti aerobnog metabolizma u svim fotosintetskim organizmima. ROS su vrlo reaktivne i nastaju u različitim staničnim odjeljcima biljnih stanica, kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi. U normalnim uvjetima okoline, ROS nemaju štetno djelovanje jer se neprestano uklanjaju nizom antioksidativnih reakcija. No, osjetljivu ravnotežu između proizvodnje ROS-a i njihovog uklanjanja narušavaju različiti biotički i abiotički stresori, kao što su salinitet, suša, UV zračenje, teški metali, ekstremne temperature, nedostatak hranjivih tvari, pesticidi i

infekcija patogenima. Ti poremećaji dovode do povećane proizvodnje ROS-a u stanicama što može uzrokovati znatna oštećenja staničnih komponenti [1]. Reaktivne kisikove vrste mogu biti u obliku slobodnih radikala (superoksidni, hidroksilni, perhidroksilni, alkoksi) te neradikalnog oblika (vodikov peroksid, singletni kisik).

Superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$) nastaje djelomičnom redukcijom O_2 tijekom prijenosa elektrona u lancu transporta elektrona u kloroplastima i drugim dijelovima biljne stanice [23]. Superoksidni radikal je ROS koja prva nastaje u biljnoj stanici, a budući da ima kratak poluživot od 2-4 μs, obično ne uzrokuje veliku štetu. No, može se pretvoriti u reaktivnije i toksičnije oblike poput hidroksilnog radikala ili singletnog kisika koji mogu uzrokovati peroksidaciju lipida u membranama stanice [24].

Singletni kisik ($^1O_2$) je rijetka ROS koji nastaje reakcijom molekule klorofila u tripletnom stanju (^3Chl) s O_2 u antenskom sustavu kloroplasta. Takve ^3Chl reagiraju s dioksigenom ($^3O_2$) nakon čega nastaje izuzetno reaktivan $^1O_2$, koji ima snažan negativan učinak na fotosustav I (PSI) i fotosustav II (PSII) te može dovesti do oštećenja cijelog fotosintetskog aparata [20]. Životni vijek singletnog kisika je kratak, 3 μs, ali određene količine mogu difundirati kroz membranu i oštetiti velik broj biomolekula kao što su proteini, pigmenti, nukleinske kiseline i lipidi. Smatra se da je singletni kisik glavna reaktivna kisikova vrsta koja inaktivira PSII te tako pokreće staničnu smrt [1].

Hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$) je najreaktivniji te uzrokuje najveću štetu u usporedbi s ostalim ROS. Nastaje reakcijom H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$ kataliziranom prijelaznim metalom poput Fe (Fe^{2+}, Fe^{3+}) pri neutralnom pH. Oštećuje biomolekule poput DNA, proteina i lipida, a nakupljanje istog u stanici vodi do stanične smrti [25]. Ne postoji enzimatski sustav za uklanjanje ovog ROS-a, stoga organizam koristi različite neenzimske antioksidanse (omega-3 masne kiseline, polifenoli) za smanjenje štetnog učinka [26].

Vodikov peroksid je umjereno reaktivna ROS koji nastaje protoniranjem superoksidanog radikala. Može nastati neenzimski u uvjetima niskog pH ili enzimski pomoću enzima superoksid dismutaze (SOD) [25]. Glavni izvori stvaranja H_2O_2 u biljnim stanicama su lanci prijenosa elektrona, a osim u normalnim uvjetima nastaje i kada se biljka izloži stresnim uvjetima [27]. U malim količinama ponaša se kao regulatorna signalna molekula za ključne fiziološke procese poput starenja, fotosinteze, pokretanje puči, staničnog ciklusa, procese rasta i razvoja [23]. U visokim koncentracijama zbog poluživota od oko 1 ms može preći znatne udaljenosti, proći kroz membrane te tako oksidirati cisteinske (-SH) i metioninske ($-SCH_3$)

ostatke [23]. Kao i $O_2^{\bullet}$, H_2O_2 je umjereno reaktivan, a njegovo oštećenje se prepoznaje tek kada se transformira u reaktivnije intermedijere [1].

2.4. Antioksidativna aktivnost

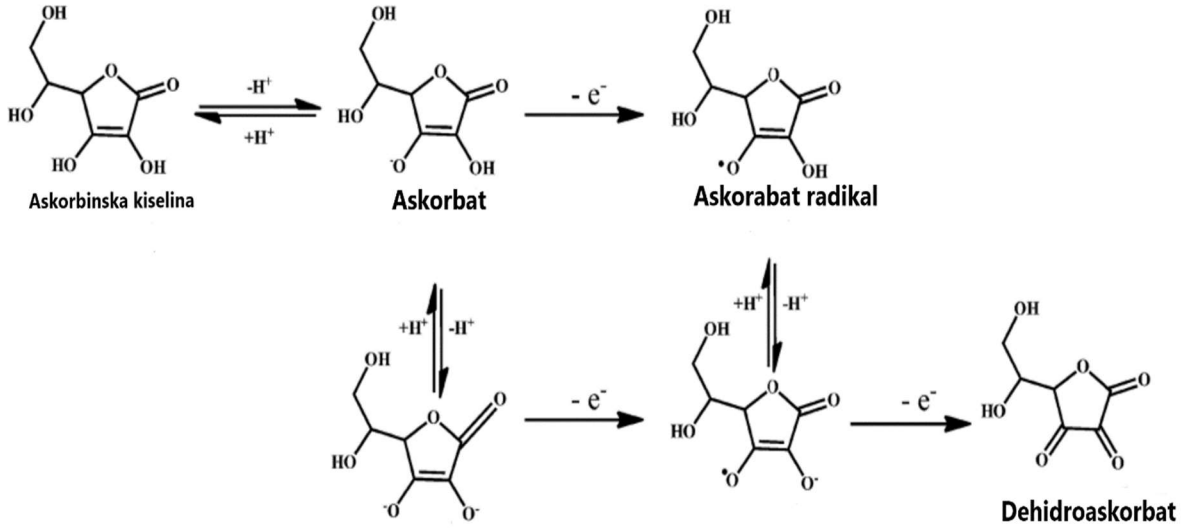
Antioksidansi imaju važnu ulogu u očuvanju kvalitete hrane i ljudskog zdravlja. Pojam antioksidans se odnosi na bilo koju tvar u niskim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksidira, a značajno odlaže ili sprječava oksidaciju tog supstrata [28]. Klasifikacija antioksidansa ovisi o vrsti katalitičkog djelovanja pa ih tako dijelimo na enzimatske i neenzimatske antioksidanse. Enzimatski antioksidansi posjeduju određene kofaktore i obično su vrlo specifični za supstrat reaktivne vrste. Neki od najčešćih enzimskih antioksidansa su SOD (superoksid dimutaza), CAT (katalaza), APX (askorbat peroksidaza), GPx (glutation peroksidaza). Za razliku od enzimskih, neenzimatski antioksidansi nemaju specifičan supstrat i, prema tome, mogu poništiti negativne učinke reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta a djeluju tako da prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala [29]. Neki primjeri neenzimatskih antioksidansa su askorbinska kiselina (vitamin C), vitamin E, biljni polifenoli, karotenoidi i glutation.

Drugi način kategoriziranja neenzimskih antioksidansa temelji se na njihovoj topljivosti u vodi ili lipidima. Antioksidansi topivi u vodi (askorbinska kiselina) nalaze se u citosolu. Antioksidansi topivi u lipidima (vitamin E, karotenoidi i lipolinska kiselina) pretežno su smješteni u staničnim membranama [27]. Neenzimatski antioksidansi mogu biti svrstani u metaboličke antioksidanse i antioksidanse iz hrane. Metabolički antioksidanski, pripadaju endogenim antioksidansima, produkt su metaboličkih reakcija u tijelu, a oni su lipoična kiselina, glutation, koenzim Q10, mokraćna kiselina, bilirubin, melantonin, L-arginin [30]. Antioksidansi iz hrane pripadaju egzogenim antioksidansima, a to su spojevi koji se ne mogu proizvesti u organizmu stoga moraju biti uneseni putem hrane ili dodataka prehrani, kao što su vitamin E, C, karotenoidi, metali u tragovima (selen, magnezij, cink) i flavonoidi [29].

2.4.1. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina (AA) je snažan antioksidans niske molekularne mase, topiv u vodi. Ima ulogu u zaštititi organizma od oksidativnog stresa uzrokovanog povećanom razinom ROS-a jer lako donira elektrone velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija. Nastaje u mitohondrijima biljaka Smirnoff-Wheeler reakcijom kataliziranom gama-lakton dehidrogenazom (***Slika 1***). Većina AA koncentrirana je u citoplazmi, no značajna količina se

nalazi i u apoplastu, pa je tako prva linija obrane od ROS-a [1]. Također, čuva aktivnost enzima koji sadrže ione prijelaznih metala.



Slika 1. Mehanizam uklanjanja radikala askorbinske kiseline; prilagođeno iz [3]

2.4.2. Karotenoidi

Karotenoidi su lipofilni antioksidansni pigmenti koji se nalaze u biljkama i mikroorganizmima te posjeduju sposobnost uklanjanja ROS-a, a najefikasnije uklanjaju peroksilne radikale. Apsorbiraju svjetlost na 450-570 nm i prenose energiju na molekulu klorofila. Štite fotosintetske komponente reakcijom s produktima lipidne peroksidacije te prekidaju lančane reakcije, a kao nusprodukt stvara se toplina. Dugi nezasićeni alkilni lanci pospješuju lipofilnost što olakšava zaštitu staničnih membrana i lipoproteina [1].

2.4.3. Polifenoli

Polifenoli su polihidroksilirani spojevi koje se sintetiziraju u biljkama. To su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju se fenilpropanoidnim putom, a maju sposobnost hvatanja i uklanjanja slobodnih radikala doniranjem vodikova iona kako bi se stabilizirali slobodni radikali. Dvije glavne skupine polifenola su fenolne kiseline i flavonoidi [29]. Polifenole karakterizira prisutnost velikog broja višestrukih strukturnih jedinica, fenola, a broj i karakteristike ovih fenolnih struktura temelj su jedinstvenih fizikalnih, kemijskih te bioloških svojstava pojedinih pripadnika svake skupine.

3. Materijal i metode

3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno u listopadu 2019. godine (unutar tjedan dana). Vremenske prilike su bile ujednačene. Uzorkovani su listovi maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) nakon čega su pohranjeni u plastične vrećice i držani na ledu. Prikupljeno je 30 uzoraka na 30 različitih lokacija u ruralnim područjima oko grada Osijeka (***Tablica 1***). Odabrane su dvije vrste lokacija: one koje nisu bile izložene onečišćivačima (***Slika 2***) i one na kojima su listovi maslačka bili izloženi antropogenim utjecajima kao što su tretiranje pesticidima, umjetnim gnojivima ili izložene djelovanju prometa (***Slika 3***). Listovi su oprani destiliranom vodom i osušeni, brzo smrznuti tekućim dušikom te su pohranjeni u hladnjak na -80 ºC do daljnjih analiza.

Tablica 1. Lokacije na kojima su brani uzorci za analizu (* označava nezagađena mjesta uzorkovanja)

Uzorak	**Lokacija**	**Izloženost onečišćivačima**
S1*	Tenja, sporedna ulica, iza kuće na livadi	Čisto
S2	Benzinska crpka pored oranice i prometnice (prema Bizovcu)	Zagađeno
S3	Josipovac, kanal na glavnoj ulici, uz prometnicu	Zagađeno
S4	Vinkovačka cesta oko oranice	Zagađeno
S5	Tenja, ulazak u selo uz prometnicu	Zagađeno
S6*	Valpovačka Satnica, napušteno nogometno igralište	Čisto
S7*	Livada udaljena od prometnice, prema Bizovcu	Čisto
S8*	Samatovci, ranč	Čisto
S9	Oranica iza Filipovice, uz prometnicu	Zagađeno
S10	Valpovačka Satnica, uz oranice	Zagađeno
S11*	Valpovačka Satnica, voćnjak koji se ne prska	Čisto
S12	Valpovačka Satnica voćnjak koji se prska	Zagađeno

S13	Bilje, put uz velike oranice	Zagađeno
S14*	Biljsko jezero	Čisto
S15 *	Bilje, oko privatnih vrtova i plastenika, udaljeno od prometnice	Čisto
S16 *	Bilje, livada udaljena od prometnice	Čisto
S17*	Nemetin, livada oko firme Ratar	Čisto
S18*	Nemetin, livada, dugo neobrađivana zemlja, daleko od prometnice	Čisto
S19	Bilje uz glavnu cestu koja vodi za Baranju	Zagađeno
S20*	Satnica Valpovačka, oranica koja se ne obrađuje uz voćnjak koji se ne šprica	Čisto
S21	Osijek, velika oranica iza Metroa	Zagađeno
S22	Cerovac , zemlja obrađena	Zagađeno
S23	Samatovci uz veliku oranicu i prometnicu	Zagađeno
S24*	Jug 2, Osijek, periferija	Čisto
S25*	Tenja, ulica Drinska	Čisto
S26	Tenje, Osječka ulica kod NTL-a	Zagađeno
S27	Tenjska cesta, Benzinska crpka Luk	Zagađeno
S28*	Valpovačka Satnica , voćnjak koji se ne šprica	Čisto
S29*	Satnica Valpovačka, ekološki voćnjak lješnjaka	Čisto
S30	Tenjska cesta uz Benzinsku	Zagađeno



Slika 2. Mjesto uzorkovanja bez poljoprivrednog zagađenja, S29*-ekološki voćnjak lješnjaka



Slika 3. Mjesto uzorkovanja pod utjecajem zagađenja, S21- Velika oranica iza Metroa, Osijek

3.2. Priprema biljnog materijala

Listovi maslačka samljeveni su pomoću tučka i tarionika uz dodatak tekućeg dušika. Usitnjeni uzorci su odvagani i za svaku analizu uzeto je pet replika. Za određivanje askorbinske kiseline i koncentracije proteina odvagano je oko 0,5 g usitnjenog svježeg uzorka te oko 0,1 g tkiva za određivanje koncentracije pigmenata. U Petrijeve zdjelice odvagano je oko 25 g svježeg tkiva. Tkivo se sušilo 24 sata na 40 ºC te 10 dana na sobnoj temperaturi. Iz suhog tkiva određena ukupna antioksidativna aktivnost, sadržaj ukupnih topivih polifenola i FTIR spektar.

3.3. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

Bakrov sulfat, $CuSO_4$

Sumporna kiselina, H_2SO_4

Etanol, C_2H_5OH

Folin-Ciocalteuov reagens, FC

Natrijev karbonat, Na_2CO_3

Bradfordov reagens

Goveđi serumski albumin, BSA

Trikloroctena kiselina

2,4,-Dinitrofenilhidrazin, DNPH

Tiourea, CH_4N_2S

Ferozin i amonij Fe (III) sulfat

iRAC reagens, (20 mg ferozina otopljeno je u 18 mL 0,1 M Tris pufera pH 7,0)

Kalije bromid, KBr

Tekući dušik

Aceton, C_3H_6O

Galna kiselina, $C_7H_6O_5$

Željezov 2,4,6-tripiridil-s-tirozin, Fe III TPTZ

Željezov klorid heksahidrat, $FeCl_3x6H_2O$

Acetatni pufer, CH_3COOH/CH_3COONa

Trolox, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroamn-2-karbonska kiselina

Metanol, CH_3OH

Magnezijev hidrogenkarbonat, $Mg(HCO_3)_2$

Kalij-fosfatni pufer

3.4. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Ukupna koncentracija pigmenata, karotenoida i klorofila, određena je metodom prema Lichenthaleru [30]. U prethodno izvagane tubice stavljeno je oko 0,1 grama uzorka te je dodano 1 mL 100 % acetona i $Mg(HCO_3)_2$ na vrhu spatule. Uzorci su ekstrahirani tijekom 24 sata na -20 ºC. Nakon ekstrakcije smjesa se centrifugira 15 min na 18000 *g* i 4 ºC. Nakon centrifugiranja, apsorbancije su određene na spektrofotometru (Specord 40, Analytic Jena) na tri različite valne duljine 470 nm, 645 nm i 662 nm. Koncentracija pigmenata određena je prema formulama (1):

$$\text{Chl } a = (11.24 \times A\,(661.6\text{ nm}) - 2.04 \times A(644.8\text{ nm})) \times V/(m \times 1000)$$

$$\text{Chl } b = (20.13 \times A(644.8\text{ nm}) + 18.09 \times A(644.8\text{ nm})) \times V/(m \times 1000) \quad (1)$$

$$\text{Chl } a{+}b = (7.05 \times A(661.6\text{ nm}) + 18.09 \times A(644.8\text{ nm})) \times V/(m\ 1000)$$

$$\text{Car} = (1000 \times A(470\text{ nm}) - 1.90 \times (11.24 \times A(661.6\text{ nm}) - 2.04 \times A(644.8\text{ nm})) - 65.14 \times (20.13 \times A(644.8\text{ nm}) - A(644.8\text{ nm}) - 4.19 \times A(661.6\text{ nm}) \times (214 \times m \times 1000)$$

Gdje je: Chl *a*- koncentracija klorofila a u mg/g mase svježe tvari uzorka

Chl *b*- koncentracija klorofila b u mg/g mase svježe tvari uzorka

Chl *a* + *b*- koncentracija ukupnog klorofila u mg/g mase svježe tvari uzorka

Car koncentracija karotenoida u mg/g mase svježe tvari uzorka

A - apsorbancija pri određenoj valnoj duljini

V - volumen ekstrakta

m - masa svježeg tkiva

3.5. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određena je metodom po Bradfordu [31]. Metoda se bazira na reakciji proteina s bojom Coomassie Briliant blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno s bočnim skupinama Arg, a u manjoj mjeri i s bočnim skupinama His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Pri

tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče s 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Ova metoda je u širokoj upotrebi zbog svoje jednostavnosti, brzine i širokog opsega proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina.

Biljni materijal (listovi maslačka) se ekstrahira dodatkom 1 mL kalij-fosfatnog pufera (pH=7,0). Uzorci se inkubiraju na ledu 5 minuta i centrifugiraju 15 minuta na 18 000 *g* pri 4 ºC. Nakon toga, supernatanti se odvoje. Postupak se ponovi, a supernatanti se spoje. Reakcijska smjesa sastojala se od 5 µL uzorka i 250 µL Bradford reagensa. Slijepa proba je sadržavala ekstrakcijski pufer. Mjerenja su provedena na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) pri 595 nm. Koncentracija proteina određena je iz baždarne krivulje. Za izradu baždarne krivulje korištena je standardna otopina albumina iz goveđeg seruma (2 mg/mL).

3.6. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline (AA)

Sadržaj askorbinske kiseline (AA) određen je po Bendritteru [32]. U prethodno izvagane i označene tubice s čepom na navoj dodano je oko 0,5 g tkiva i 10 mL destilirane vode pomoću pipete, a zatim su se tubice centrifugirale 15 minuta na 3000 g pri 4 ºC. Nakon centrifugiranja, u tubice od 2 mL odpipetira se 300 µL vodenog ekstrakta. Vodenom ekstraktu doda se 100 µL 13, 3% trikloroctene kiseline, 25 µL destilirane vode te 75 µL DNPH reagensa. DNPH reagens se priprema otapanjem 230 mg tiouree i 270 mg $CuSO_4$ u 100 mL 5M sumporne kiseline. Dobivena otopina se izmiješa. Nakon dodavanja reagensa, reakcijske smjese potrebno je inkubirati sat vremena u vodenoj kupelji na 37 ºC. Istim postupkom pripremljene su slijepe probe za svaki uzorak bez dodavanja DNPH reagensa. Po završetku inkubacije u sve slijepe probe dodaje se DNPH reagens a nakon toga 500 µL 65 % sumporne kiseline u sve uzorke. Sve smjese se još jednom izmiješaju. Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski (Specord 40, Analytic Jena) pri 520 nm, dok je koncentracija askorbinske kiseline određena iz baždarne krivulje s poznatim koncentracijama AA.

3.7. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

Koncentracija ukupnih topljivih polifenola određena je Folin-Ciocalteau metodom [33]. U prethodno izvaganu tubicu od 12 mL doda se oko 0,5 grama i 2,5 mL 96% etanola. Ukupni topljivi fenoli se ekstrahiraju u etanolu 24 sata na temperaturi od -20 ºC. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4 ºC pri 10 000 *g*. Nakon toga se odvoje supernatanti. Za analizu koristi se Folin-Ciocalteuov reagens (FC) koji je razrijeđen vodom u omjeru 1:2 u korist vode. U tubicu od 2

mL doda se 100 µL uzorka, 700 µL deionizirane vode i 50 µL FC reagensa. Dobivena smjesa se izmiješa te se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u tubicu se doda 150 µL zasićene otopine Na_2CO_3 i dobro se izmiješa. Zasićena otopina Na_2CO_3 dobivena je otapanjem 100 g natrijeva karbonata (Na_2CO_3) u 400 mL deionizirane vode i zagrijavanjem do vrenja. U jažice mikrotitarske pločice doda se 10 µL prethodno razrijeđenog ekstrakta, 190 µL deionizirane vode i 25 µL FC reagensa. Smjesa je promiješana i ostavljena na inkubaciji pri sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, a zatim je u jažice dodano 75 µL zasićene otopine Na_2CO_3. Uzorci su inkubirani 60 minuta pri temperaturi od 37 °C. Na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Baždarna krivulja izrađena je pomoću razrjeđenja galne kiseline čija je koncentracija bila 5g/L. Koncentracija ukupnih topljivih fenola prikazana je kao ekvivalent galne kiseline po masi (g) suhe tvari, a izračunata prema formuli (2).

$$c\left(\frac{mgGAE}{gFW}\right) = \frac{(A_{765} - b)\ x\ V}{a\ x\ m_{FW}} x\ df$$

$$c\left(\frac{mgGAE}{gDW}\right) = \frac{(A_{765} - b)\ x\ V}{a\ x\ m_{DW}} x\ df \quad (2)$$

Gdje je: A – apsorbancija uzorka

V- volumen uzorka

df – faktor razrijeđenja

m_{dw} – masa suhog tkiva

m_{fw} – masa svježeg tkiva

3.8. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Supernatant dobiven ekstrakcijom ukupnih topivih polifenola iskorišten je i za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti koristeći FRAP (eng. *Ferric reducing antioxidant power assay*) i iRAC (eng. *Iron (III) reducing antioxidant capacity assay)* metode. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) je korišten kao standard za izradu baždarne krivulje. Ukupna antioksidativna aktivnost izražena je u ekvivalentima Troloxa (µmol/g suhe tvari).

3.8.1. FRAP-metoda

Metoda je temeljena na reakciji ispitivanog uzorka s Fe III TPTZ (željezo 2,4,6-tripiridil-s-triazina) pri čemu nastaje Fe II TPTZ [34]. U 290 µL reakcijske smjese, koja se sastojala od 0,5 mM TPTZ i 1mM $FeCl_3$ x $6H_2O$ u acetatnom puferu (pH=3,6), doda se 10 µL uzorka, promiješa se te inkubira na sobnoj temperaturi. Razrjeđenja troloksa napravljena su u metanolu od 0,25-2 mM. Za mjerenje apsorbancije pri 593 nm korišten je čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark).

3.8.2. iRAC-metoda (*Iron (III) reducing antioxidant capacity assay)*

Metoda se temelji na uporabi reagensa koji se sastoji od ferozina i amonij željezo III sulfata [35]. U jažice mikrotitarske pločice doda se 20 µL prethodno razrijeđenog uzorka i 280 µL iRAC reagensa (20 mg ferozina otopljeno je u 18 mL 0,1 M Tris pufera pH 7,0). Smjesa se inkubira 30 min na 37 ºC. Izmjerena je apsorbancija pri 562 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Razrjeđenja troloksa su bila od 20-100 µg/mL.

3.9. FTIR (*engl. Fourier-transform infrared spectroscopy*) spektroskopija

Listovi maslačka koji su poslužili za pripremanje uzoraka za snimanje FTIR spektroskopije su najprije osušeni na zraku. Nakon toga su usitnjeni u struji dušika te je 3 mg uzorka pomiješano s 100 mg kalijeva bromida (KBr). Snimanje se izvodilo na sobnoj temperaturi i u spektralnom rasponu od 500 do 4000 cm^{-1}, a korak je iznosio 2 cm. Učinjeno je 20 snimanja i napravljena je korekcija bazne linije. Mjerenje je vršeno na Instrumentu FTIR 8400S Shimadzu.

3.10. Statistička analiza biokemijskih parametara

Eksperimentalni podaci su analizirani koristeći T-test. Statističke analize provedene su pomoću Microsoft Excela. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razina značajnosti je određena na $p \leq 0,05$.

3.11. Analiza glavnih komponenata (eng. Principal Component Analysis; PCA)

Matematički algoritam koji smanjuje dimenzionalnost podataka zadržavajući veći dio varijacija u podatkovnoj matrici naziva se analiza glavnih komponenata (PCA). Smanjenje se postiže

određivanjem novih osi koji se nazivaju glavnim komponentama, a uz njih su varijacije u podatcima maksimalne. Prednost metode je ta da se uz pomoć manjeg broja komponenata svaki uzorak može predstaviti s manjim brojem varijabli. Rezultat analize glavnih komponenata moguće je prikazati u obliku bi-plota, što omogućuje vizualnu procjenu sličnosti i razlika među uzorcima, njihovo grupiranje i korelacije s varijablama [36].

Postupak analize glavnih komponenata može se podijeliti na nekoliko osnovnih koraka:

1. Standardizacija varijabli u svrhu postizanja jednake razine za analizu.
2. Izračuna matrice korelacije između svih izvornih standardni varijabli.
3. Pronalaženje svojstvenih vrijednosti glavnih komponenata.
4. Odbacivanje komponenata koje sadrže proporcionalno mali udio varijance.

Za neku podatkovnu matricu X vrijedi:

$$PC_i = l_{1i}X_1 + l_{2i}X_2 + \ldots + l_{ni}X_n \qquad (3)$$

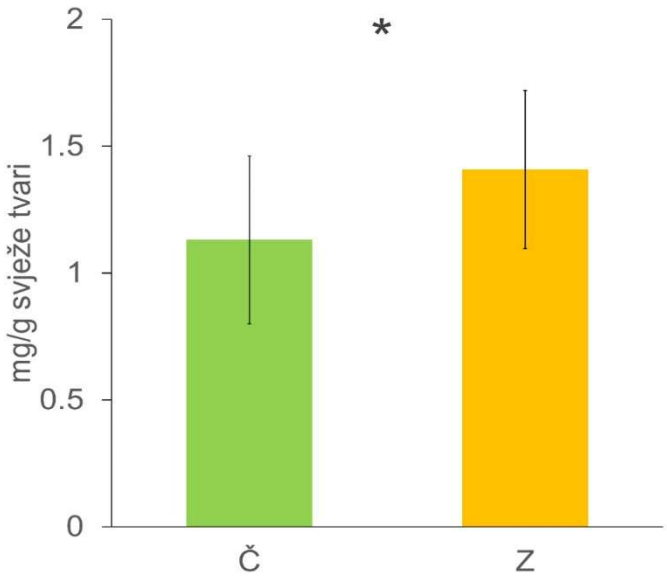
Gdje oznaka PC_i predstavlja *i*-tu glavnu komponentu, a l_{ii} je opterećenje promatrane varijable X_l.

Glavne komponente se poredaju na način da prva komponenta sadrži najveći postotak varijance u podatcima, a posljednja komponenta najmanji. Analiza glavnih komponenata je učinkovita metoda za istraživača koji ima potrebu smanjiti velik broj varijabli na manji broj komponenata, a korisna je i kao stupanj koji prethodi regresijskoj analizi [37,38,39]. Podaci su obrađeni u programu Statistica 13.3.

4. Rezultati

4.1. Koncentracija proteina

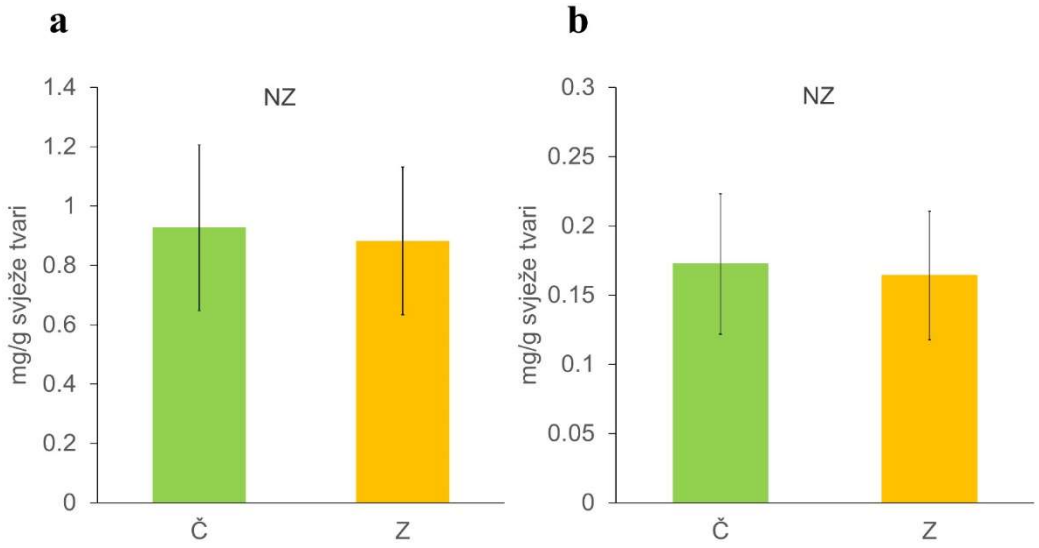
Statistička analiza pokazala je razlike u koncentracijama proteina kod uzoraka koji su sakupljeni na zagađenim, odnosno nezagađenim mjestima uzorkovanja (***Slika 4***). Iz rezultata je vidljivo da je koncentracija proteina veća na zagađenim lokacijama nego li na nezagađenim.



Slika 4. Koncentracija proteina na nezagađenim (Č) i zagađenim lokacijama (Z). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između skupina testirane su T-testom. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.2. Ukupna koncentracija fotosintetskih pigmenata

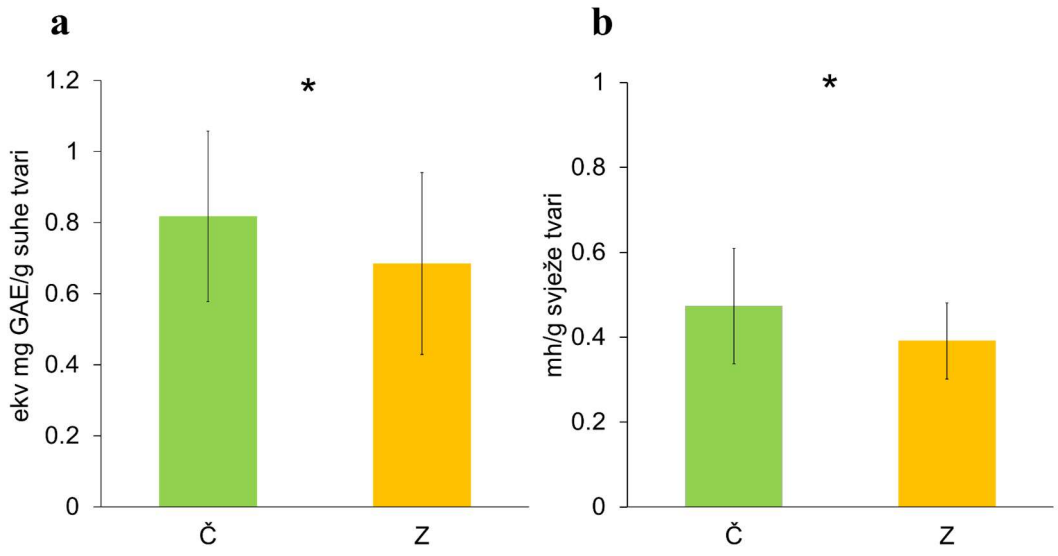
Statističkom analizom utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u koncentraciji fotosintetskih pigmenata između uzoraka prikupljenih na zagađenim lokacijama u odnosu na mjesta uzorkovanja gdje nije bilo zagađenja. Ukupna koncentracija klorofila (***Slika 5a***) jednaka je kod uzoraka s nezagađenih i uzoraka sa zagađenih mjesta. Koncentracija karotenoida ***(Slika 5b***) također je veća na nezagađenim lokacijama u usporedbi sa zagađenim mjestima uzorkovanja.



Slika 5. Koncentracije ukupnog klorofila (a) i karotenoida (b) u uzorcima maslačka na zagađenim (Z) i nezagađenim (Č) mjestima uzorkovanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su T – testom. Kratica NZ označava da ne postoji statistički značajna razlika.

4.3. Koncentracija askorbinske kiseline i sadržaj ukupnih topivih polifenola

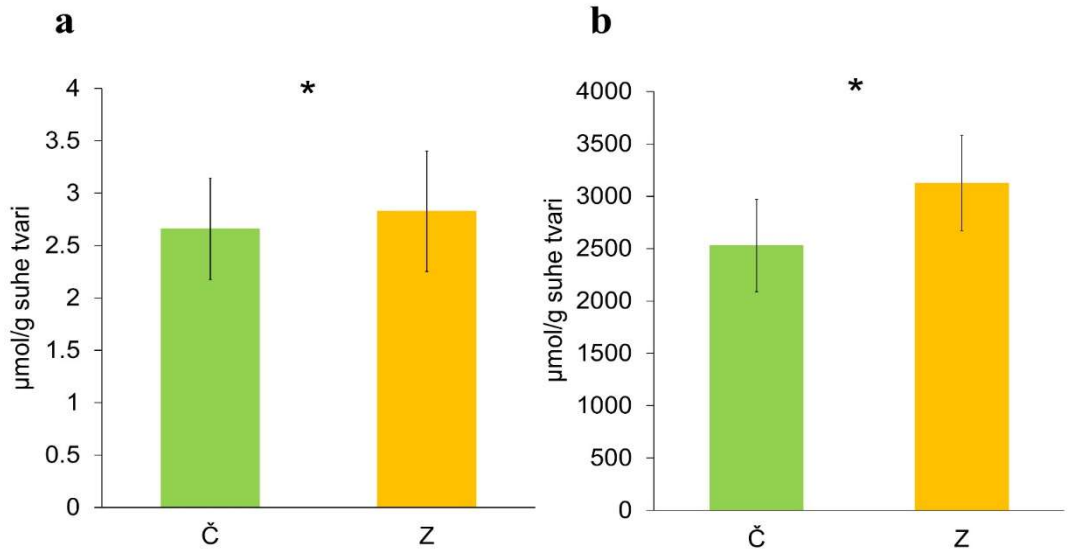
Nakon statističke obrade podataka utvrđeno je da postoji razlika u sadržaju ukupnih topivih polifenola (***Slika 6a***) na zagađenim i nezagađenim lokacija. Također, vidljiva je razlika u koncentraciji askorbinske kiseline (***Slika 6b***) na čistim i zagađenim mjestima uzorkovanja. Rezultati pokazuju kako je koncentracija askorbinske kiseline te sadržaj ukupnih topivih polifenola veći na mjestima uzorkovanja gdje nije bilo zagađenju u usporedbi sa zagađenim lokacijama.



Slika 6. Sadržaj ukupnih polifenola (a) i askorbinske kiseline (b) u uzorcima maslačka na zagađenim (Z) i nezagađenim (Č) lokacijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između skupina testirane su T-testom. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.4. Ukupna antioksidativna aktivnost (FRAP i iRAC metode)

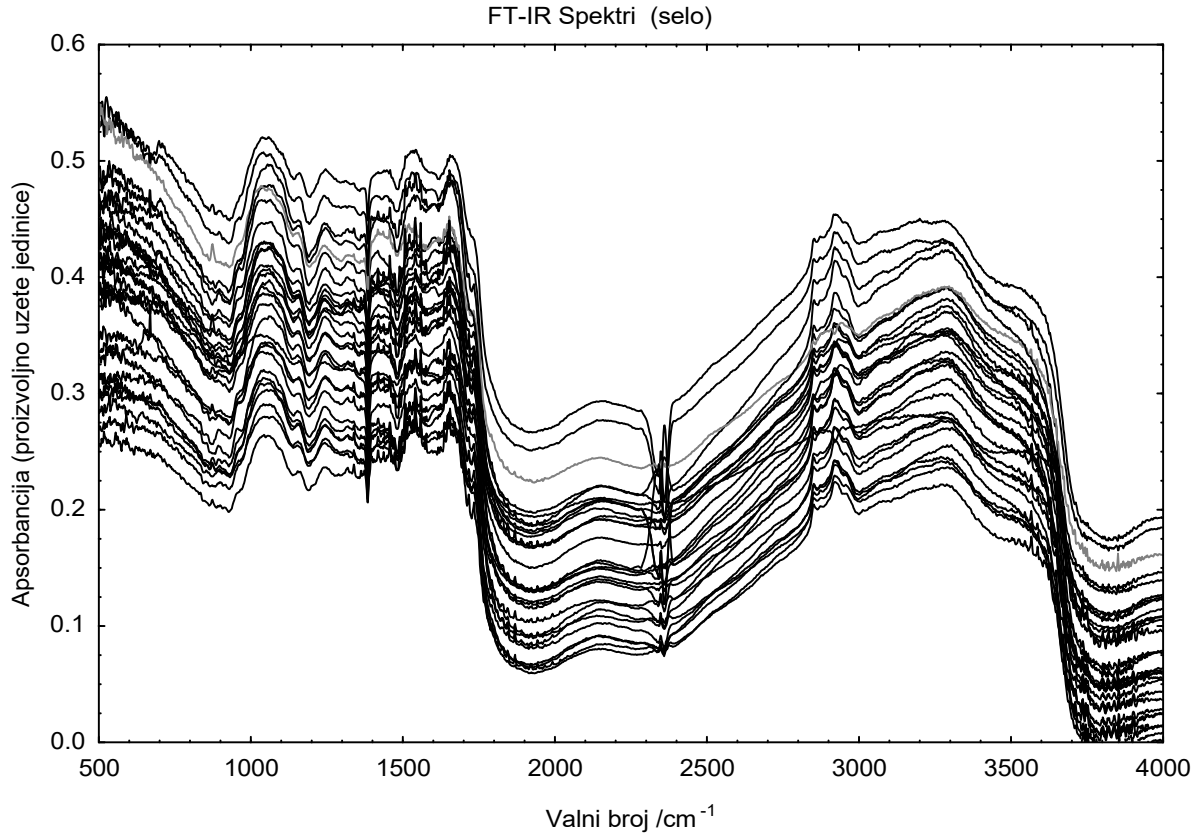
Statističkom obradom podataka pokazano je da postoji značajna razlika ukupne antioksidativne aktivnosti između uzoraka s mjesta uzorkovanja koji su bili pod utjecajem zagađenja i nezagađenih mjesta uzorkovanja određenih FRAP metodom (***Slika 7a***) i iRAC metodom (S***lika 7b***). Rezultati pokazuju da je kod zagađenih lokacija ukupna antioksidativna aktivnost veća u odnosu na mjesta uzorkovanja gdje nije bilo zagađenja.



Slika 7. Ukupna antioksidativna aktivnost u uzorcima maslačka na nezagađenim (Č) i zagađenim (Z) mjestima uzorkovanja izmjerena FRAP (a) i iRAC (b) metodom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između skupina testirane su T-testom. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0{,}005$).

4.5. FT-IR spektri

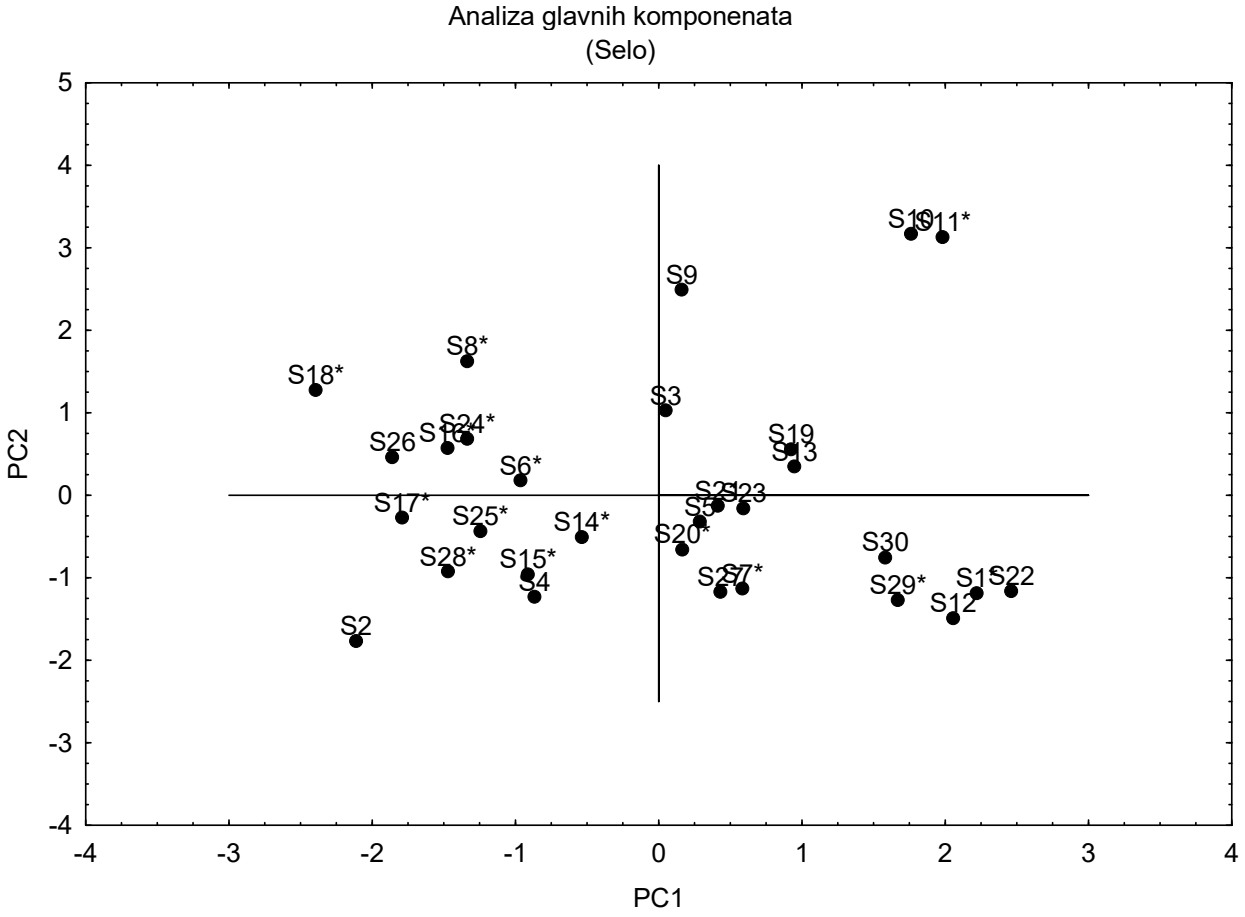
Na ***slici 8*** prikazani su spektri 30 uzoraka maslačka. Na spektrima su vidljiva slijedeća područja: područje manje od 1000 cm^{-1} odgovara vibracijama savijanja CH od izoprenoida, područje od 997 do 1130 cm^{-1} karakteriziraju vibracije istezanja CO mono-, oligo-ugljikohidrata. Vibracije istezanja karbonilnih CO ili OH skupina vidljive su na području od 1150 do 1270 cm^{-1}. Područje koje odgovara vibracijama rastezanja C-O (amid) i C-C istezanja fenilnih skupina nalazi se u intervalu od 1300-1450 cm^{-1}, dok područje od 1500-1600 cm^{-1} odgovara vibracijama aromatičnih spojeva i N-H vibracijama savijanja. Područje od 1600 do 1760 cm^{-1} je složeno, odgovara vibracijama savijanja N-H iz aminokiselina, C=O istezanja aldehida i ketona i estera te slobodnih masnih kiselina (1710 cm^{-1}) i glicerida (1740 cm^{-1}). Područje od 2800 do 2900 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja C-H specifičnim za CH_3 i CH_2 iz lipida, metoksi derivata, C-H aldehida uključujući *cis* dvostruke veze. Područje 3350-3600 cm^{-1} odgovara vibracijama istezanja OH skupina iz vode, alkohola, fenola, ugljikohidrata, peroksida, kao i amida (3650 cm^{-1}) [40].



Slika 8. FT-IR spektri 30 uzoraka maslačka

4.6. Analiza glavnih komponenata

Rezultat primijenjene multivarijantne metode analize glavnih komponenata prikazan je na ***Slici 9.*** uz pomoć dvije glavne komponente. Umjesto od podataka cijelih spektara snimljenih u rasponu od 500 do 4000 cm^{-1}, podatkovna je matrica priređena na način da su za varijable (stupci) podatkovne matrice upotrijebljeni pomaci maksimuma vrpci pri: 901 cm^{-1}, 1153 cm^{-1}, 1240 cm^{-1}, 1660 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} i 3300 cm^{-1}, a retke je činilo 30 uzoraka maslačka prikupljenog na različitim lokacijama.



Slika 9. Rezultat analize glavnih komponenata

Na ***slici 9.*** uzduž prve komponente, koja nosi 40% informacija o podatcima vidljivo je grupiranje uzoraka koji su prikupljeni na lokacijama koje nisu izložene onečišćenju (simbol *) od onih koje to jesu. Prve dvije glavne komponente sadrže skupa 65 % informacije.

5. Rasprava

Bioindikatori su organizmi s visokom sposobnošću akumulacije kemijskih elemenata. Među biljnim indikatorima, maslačak (*Taraxacum officinale,* Weber), ispunjava gotovo sve uvjete za ispitivanje utjecaja poljoprivrednog zagađenja i abiotičkog stresa na biokemijske parametre te biljke [41]. Kada su uvjeti u okolišu nepovoljni i utječu na rast biljaka, u biljkama se pokreče niz reakcija koji signalizira, vrši fiziološku i obrambenu regulaciju, a istodobno daje povratne informacije o utjecaju stresa na biosintezu, koncentraciju, transport i skladištenje primarnih i sekundarnih metabolita, proteina te fotosintetskih pigmenata [28]. Takve molekule nazivaju se antioksidansima te uz NADPH, sudjeluju u antioksidacijskim reakcijama s nastalim slobodnim radikalima koji su rezultat metaboličkih procesa u samoj biljci te djelovanja abiotičkih čimbenika i štetnih tvari u okolišu. Slobodni radikali, od kojih su glavne reaktivne kisikove i dušikove vrste, štetno djeluju na većinu biomolekula, najčešće DNA, polinezasićene masne kiseline, proteine i ugljikohidrate [3]. Reaktivne kisikove vrste mogu oštetiti DNA oksidacijom deoksiriboznih ostataka, promjenom sekvence nukleotidnih baza, razaranjem ili umrežavanjem DNA te reakcijom s dvostrukim vezama purinskih i pirimidinskih baza. DNA je genetski materijal i svako oštećenje može dovesti do promjena u količini i ekspresiji proteina što u konačnici može rezultirati neispravnošću ili potpuno nefunkcionalnim proteinima. Nadalje, lipidi su glavne komponente membrana koje obavijaju stanice [1]. Oksidativno oštećenje polinezasićenih masnih kiselina (eng. polyunsaturated fatty acids,PUFAs) koje se nalaze u staničnim membranama, poznato kao lipidna peroksidacija, posebno je destruktivno jer se odvija u obliku lančane reakcije [3]. Jednom kada taj proces započne u staničnim ili membranama organela, pokreće se lančanu reakciju, što dodatno pogoršava oksidativni stres stvaranjem lipidnih radikala koji oštećuju druge biomolekule kao što su DNA ili proteini. Dvije temeljne mete ROS napada u membranskim lipidima su dvostruke veze između dva atoma ugljika i esterska veza između glicerola i masnih kiselina. PUFA poput linlone i linolenske kiseline, koje su bitne komponente plazma membrane, osobito su osjetljive na oštećenje uzrokovano $^1O_2$ i $OH^{\bullet}$ s kojima tvore smjesu lipidnih hidroperoksida. Povećanje peroksidacije PUFA smanjuje fluidnost membrana i povećava njihovu propusnost za tvari koji inače mogu proći samo kroz određene kanale i rezultira sekundarnim oštećenjem membranskih proteina [1].

Herbicidima se smatra široka paleta kemijskih spojeva koji različitim mehanizmima djelovanja služe suzbijanju nepoželjnih biljnih vrsta, alga, mahovina te lišajeva. Primarni mehanizmi djelovanja herbicida su inhibicija sinteze aminokiselina, inhibicija fotosinteze, biosinteze lipida, karotenoida, celuloze te folne kiseline, kao i inhibicija stanične diobe. Od ukupne

količine primijenjenih pesticida u Europi, čak 35% se odnosi na herbicide. Stoga se smatra da imaju najveći udio u zagađenju voda u područjima s intenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom te su često prisutni u visokim koncentracijama čak i u podzemnim vodama. Prisustvo herbicida u okolišu ovisi o učestalosti primjene, postojanosti herbicida u tlu, njihovoj mobilnosti, oborinama te topografiji i klimi. Svojstva pojedinog herbicida određuju dužinu trajanja njegovog aktivnog djelovanja i zadržavanja u tlu te ovise o intenzitetu ispiranja i unosu u površinske i podzemne vode [42].

Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju značajan porast koncentracije proteina (***Slika 4.***) kod uzoraka prikupljenih na mjestima gdje je bilo poljoprivredne aktivnosti u odnosu na mjesta uzorkovanja gdje nije bilo zagađenja djelovanjem pesticida i umjetnih gnojiva. Cai i sur. 2009 [43] pokazali su kako anorganski dušik iz umjetnih gnojiva utječe na porast koncentracije proteina kod žitarica. Proteini imaju važnu ulogu u odgovoru na abiotički stres te štetno djelovanje poljoprivrednog zagađenja. Funkcija proteina ovisi o njihovoj strukturi, ali i o poziciji u stanici, posttranslacijskim modifikacijama i interakcijskim molekulama [28]. Nakupljanje proteina uključuje dinamiku odgovora na stres, zajednički učinak više stresora kao i genotipsku pozadinu koja se temelji na različitoj ekspresiji gena između genotipa koji podnose stres i onih osjetljivih na stres [44].

Prisutnost fotosintetskih pigmenata klorofila određuje njihovu zelenu boju. Biljni pigmenti, poput klorofila i karotenoida, sudjeluju u reakcijama fotosinteze gdje prenose svjetlosnu energiju te kataliziraju stvaranje ugljikohidrata. Karotenoidi su pomoćni pigmenti te zajedno s klorofilom stvaraju bitne strukturne komponente fotosintetskih antena i reakcijskih središta u višim biljkama. Kao neenzimski antioksidansi, glavna ima je uloga zaštiti fotosintetski sustav rasipajući energiju kako bi se izbjegli štetni fotooksidativni procesi [45]. Kemijski sastav i svojstva klorofila i karotenoida sprječavaju oksidaciju lipida u hrani te zbog toga sudjeluju u prevenciji oksidativnog stresa [46]. Karotenoidi, osobito β-karoten, izrazito su pogodni za uklanjanje singletnog kisika koji u reakciji s nezasićenim masnim kiselinama dovodi do peroksidacije [19]. Rezultati ovog rada pokazuju kako se sadržaj klorofila (***Slika 5a***) i karotenoida (***Slika 5b***) nije razlikovao između uzoraka prikupljenih na mjestima oko poljoprivrednih zemljišta gdje su primjenjivani pesticidi i umjetna gnojiva u usporedbi s lokacijama gdje nije bilo zagađenja.

Askorbinska kiselina (vitamin C) ima važnu ulogu u mnogim aspektima kontrole staničnog redoks stanja i antioksidativnog djelovanja u biljnim stanicama te tijekom diobe stanica, razvoja i rasta biljaka kao značajan kofaktor različitih enzima. U biljkama je prisutna u koncentraciji

koja varira od 300 mM u stromama kloroplasta, do 20 mM u ostalim organelima. Strukturno je askorbinska kiselina slična heksoznim šećerima i ima konjugiranu strukturu laktonskog prstena s 5 ugljikovih atoma, koji sadrže endiolnu skupinu na C2 i C3. Delokalizacija π-elektrona između C2 i C3 endiolnim skupinama stabilizira molekulu i uzrokuje disocijaciju vodika C3 hidroksilne skupine te postaje monovalentni anion pri fiziološkoj pH vrijednosti (pH=7,35-7,45) [47]. Vitamin C prelazi u askorbatni radikal doniranjem elektrona lipidnom radikalu kako bi prekinuo lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Par askorbat radikala reagira te nastaje molekula askorbata i dehidroaskorbata koji nema antioksidacijsku sposobnost. Nadalje, dehidroaskorabat se prevodi natrag u askorbat pomoću oksidoreduktaze uz utrošak dva elektrona (***Slika 1***). Osim važne uloge u uklanjanju H_2O_2 radikala u enzimskim reakcijama, može izravno reagirati sa singletnim kisikom, superoksidnim te hidroksilnim radikalom koji nastaju u većoj mjeri pod utjecajem zagađivača poput pesticida. U ovom radu, izmjerena koncentracija askorbinske kiseline bila je veća kod uzoraka s čistih lokacija u odnosu na uzorke s mjesta gdje je bilo zagađenja (***Slika 6b***). Stoga se može zaključiti kako kod maslačka dolazi do inhibicije sinteze askorbinske kiseline kada je pod utjecajem raznih pesticida i umjetnih gnojiva uz ostale abiotičke čimbenike.

Obzirom da polifenoli značajno doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti bilo je važno odrediti njihov ukupan sadržaj te utvrditi utjecaj poljoprivrednog zagađenja i abiotičkih čimbenika na ispitivane uzorke maslačka. Fenoli su spojevi koji sadrže aromatični prsten s bar jednom hidroksilnom skupinom, a njihova struktura može varirati od jednostavne do složenih polimera. Beskonačne kombinacije funkcijskih skupina, to jest hidroksila, alkohola, aldehida, alkila, benzenskiih prstena i steroida, dovode do velike raznolikosti biljnih spojeva, od kojih svaka ima posebne karakteristike. Kod biljaka koje rastu u otežanim uvjetima kao što su nedostatak hranjivih tvari, visoke i niske temperature, nedostatak vode ili tretiranje pesticidima, nakupljanje fenolnih spojeva obično se povezuje s pojačanom tolerancijom na stres [16]. Abiotički stresori aktiviraju proces signalizacije stanica, što rezultira transkripcijskom up-regulacijom fenilpropanoidnog puta. Povećanje otpornosti biljaka povezano je s višestrukom funkcijom polifenola u biljkama, što se uglavnom sastoji od njihove sposobnosti uklanjanja ROS-a. Rezultati ovog rada su pokazali kako se sadržaj ukupnih polifenola smanjio pod utjecajem zagađivača poljoprivrednog porijekla i abiotičkih čimbenika (***Slika 6a***) što ukazuje na to da poljoprivredni zagađivači inhibiraju sintezu polifenola koji mogu dovesti do povećane otpornosti na stres.

Antioksidansi se također mogu kategorizirati po obrambenim linijama: preventivni antioksidansi kao početna obrambena linija, antioksidansi koji uklanjaju radikale se smatraju drugom linijom obrane i popravni i de novo enzimi kao treća obrambena linija. Ukupna antioksidativna aktivnost određena je iRAC i FRAP metodama. Iz dobivenih rezultata (***Slika 7***) vidljivo je kako je ukupna antioksidativna aktivnost veća kod uzoraka uz poljoprivredne površine tretirane raznim herbicidima, insekticidima te umjetnim gnojivima. Stoga se može zaključiti da poljoprivreda kao izvor štetnih tvari (pesticidi, umjetna gnojiva) te abiotički stresori (suša, salinitet tla) zbog kojih dolazi do stvaranja ROS-a utječu na komponente koje služe za obranu biljke od utjecaja štetnih tvari iz okoliša i slobodnih radikala. Slične rezultate pokazalo je i istraživanje provedeno na različitim vrstama povrća tretirano raznim insekticidima, herbicidima i gnojivima. Pokazano je da količina sekundarnih metabolita, kao što su fenoli i karotenoidi, može varirati tijekom uzgoja s obzirom da stresni uvjeti mogu utjecati na bilo koju komponentu tijekom njihovog metaboličkog ciklusa te dovesti do njihovog većeg ili manjeg nakupljanja [48].

Rezultati dobiveni biokemijskim analizama, odnosno razlike u uzorcima prikupljenim na različitim lokacijama, dodatno su potvrđeni primjenom jedne od najpoznatijih multivarijantnih metoda, analizom glavnih komponenata. Kako bi se izbjegle pogreške i pojednostavio račun, podatkovna je matrica konstruirana na način da su u obzir uzeti samo pomaci najvažnijih vrpci, a ne cjelokupni spektri snimljeni u rasponu od 500 do 4000 cm^{-1}. Dodatna rotacija faktora ili smanjenje broja varijabli nisu doprinijeli boljem prikazu rezultata, stoga je analiza glavnih komponenata primijenjena na pomake slijedećih maksimuma: 901 cm^{-1}, 1153 cm^{-1}, 1240 cm^{-1}, 1660 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} i 3300 cm^{-1}. Na ***slici 9.*** zamjetno je određeno grupiranje uzoraka koji nisu bili izloženi onečišćenju u odnosu na one koji jesu (promet, pesticidi, herbicidi, benzinska crpka i sl.), iako su prve dvije komponente sadržavale manje od 70% informacije u podatcima. Analiza glavnih komponenata pokazala se uspješnom u istraživanju utjecaja antropogenih faktora na biljke na temelju razlika u snimljenim FT-IR spektrima te ujedno potvrdila rezultat dobiven biokemijskim analizama.

6. Zaključak

Poljoprivredna proizvodnja i ostali abiotički čimbenici uzrokovali su povećanje koncentracije proteina, smanjenje sadržaja ukupnih topivih polifenola i askorbinske kiseline dok se koncentracije karotenoida i klorofila nisu značajno razlikovale. To ukazuje da su poljoprivredni zagađivači negativno utjecali na produkciju sekundarnih metabolita unatoč dobrom fiziološkom odgovoru. Poljoprivredna djelatnost dovela je do povećanja ukupne antioksidativne aktivnosti kod uzoraka prikupljenih na zagađenim lokacijama. Metodom analize glavnih komponenata potvrđene su razlike u rezultatima dobivenim biokemijskim analizama, te je potvrđeno kako je maslačak pogodna biljna vrsta za ispitivanje utjecaja poljoprivrednog zagađenja i abiotičkog stresa.

7. Literatura

[1] M. I. Dar, M. I. Naikoo, F.A. Khan, F. Rehman, I. D. Green, F. Naushin, A. A. Ansari, An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants. U: Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: Role and Regulation under Abiotic Stress 2017 (pp. 25-52). Springer, Singapore.

[2] A. Sharma, B. Shahzad, A. Rehman, R. Bhardwaj, M. Landi, B. Zheng, Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. Molecules 24 (2019), 2452.

[3] N. Satish Balasaheb, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, Rsc. Advances 5.35 (2015), 27986-28006.

[4] A. Abbasi, A. Sajid, N. Haq, S. Rahman, Z. T. Misbah, G. Sanober, A. G. Kazi Agricultural pollution: an emerging issue. In Improvement of crops in the era of climatic changes, Springer, New York (2014), 347-387

[5] R. Erhatić, M. Vukobratović, S. Dudaš i M. Mužić, "Kemijske karakteristike populacija maslačka s križevačkog i riječkog područja", Agronomski glasnik 76 (2014), 127-136. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/136498. [08.07.2020.]

[6] A. Giacomino, M. Malandrino, M. L. Colombo, S. Miaglia, P. Maimone, S. Blancato, O. Abollino, Metal content in dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves: influence of vehicular traffic and safety upon consumption as food, J. Chem. (2016).

[7] https://www.nrdc.org/stories/industrial-agricultural-pollution-101 6.9.2020.

[8] G. Merrington, R. Parkinson, M. Redman, L. Winder, Agricultural pollution; Environmental problems and practical solutions, Spon press, London i New York 2002.

[9] M. A. Maqsood, S. Hussain, T. Aziz, M. Ashraf , Sustainable agriculture through integrated soil fertility management on degraded lands, Developments in Soil Salinity Assessment and Reclamation, Springer, Dordrecht (2013), 759–776.

[10] Z. Atafar, A. Mesdaghinia, J. Nouri, M. Homaee, M. Yunesian, M. Ahmadimoghaddam, A. H. Mahvi, Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration, Environ. Monit. Assess. 160 (2010), 83–89.

[11] Y. Luo, L. Wu, L. Liu, C. Han, Z. Li, Heavy metal contamination and remediation in Asian agricultural land. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci. NIAES (2009).

[12] W. M. Edwards, H. L. Lloyd, Agricultural pollution of water bodies (1970).

[13] R. P. Schwarzenbach, T. Egli, T. B. Hofstetter, U. Von Gunten, B. Wehrli, Global water pollution and human health. Annu. Rev. Environ. Resour. 35 (2010), 109-136.

[14] Pandey S, Joshi N, Kumar M. Agrochemicals and human well-being: A review in context of Indian agriculture. IJCS. (2020), 1539-43.

[15] S. Mahajan, N. Tuteja, Cold, salinity and drought, stresses: An overview, Arch. Biochem. Biophys. 444 (2005), 139-58.

[16] R. Akula, G. A. Ravishankar, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, Plant Signal. Behav. (2011), 1720-1731.

[17] A. K. Parida, A. B. Das, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol Environ. Saf . 60 (2005), 324-49

[18] S.S. Gosal, S. H. Wani, M. S. Kang, Water and agricultural sustainability strategies, Kang MS, Ed. CRC Press (2010), 259.

[19] R. A. Larson, The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 27 (1988), 969-978

[20] F. Anjum, M. Yaseen, E. Rasul, A. Wahid, S. Anjum, Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.), Effect on chemical composition and chlorophyll contents. Pak. J .Agric. Sci. 40 (2003), 45-49.

[21] L. Chalker-Scott, Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses, Photochem. Photobiol. 70 (1999), 1-9.

[23] S. S. Gill, N. Tuteja, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, Plant Physiol. Biochem. 48 (2010), 909–930.

[24] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, Plant. Physiol .141 (2006), 312–322.

[25] K. Das, A. Roychoudhury, Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, Front. Environ. Sci. 2 (2014), 53.

[26] B. Lipinski, Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease, Oxid. Med. Cell. Longev. 2011 (2011),809696.

[27] P. Sharma, A. B. Jha, R. S. Dubey, M. Pessarakli, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, J. Bot. 2012; 2012: 1–26

[28] S. Sehwag, M. Das, Antioxidant Activity: An Overview, Int. J. Food Sci. Technol. 2 (2013), 1-10.

[29] H. Zainol, M. Hakiman, A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities, Food Sci. Nutr. vol. 7,5 (2019), 1555-1563.

[30] H. K. Lichtenthaler, Methods Enzymol. 148 (1987), 350-382.

[31] M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254.

[32] M. Bendritter, V. Maupil, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, L. Rochette, Fund. Clin. Pharmacol. 12 (1998), 510-516.

[33] V. L. Singleton, J. A. Rosi, Am. J. Enol. Vitic. 16 (1965), 144–158.

[34] I. F. F. Benzie, J. J. Strain, Meth. Enzymol. 299 (1999), 15-27.

[35] H. C. Wan, B. Sultana, P. Singh Nigam, R. Owusu-Apenten, Beverages. 4 (2018), 1-10.

[36] M. Ringnér, What is principal component analysis?, Nat. Biotechnol. 26 (2008), 303-304.

[37] E. Kovač-Andrić, J. Brana, V. Gvozdić, Impact of meteorological factors on ozone concentrations modelled by time series analysis and multivariate statistical methods, Ecol. Inform. 4 (2009), 117-122.

[38] V. Gvozdić, E. Kovač-Andrić, J. Brana, Influence of meteorological factors NO 2, SO 2, CO and PM 10 on the concentration of O 3 in the urban atmosphere of Eastern Croatia, Environ. Model. Assess., 16(2011), 491-501.

[39] N. Sakač, V. Gvozdić, M. Sak-Bosnar, Determination of the botanical origin of starch using direct potentiometry and PCA, Carbohydr. Polym. 87 (2012), 2619-2623.

[40] S. Zavoi, F. Fetea, F. Ranga, A. Baciu, C. Socaciu, Comparative fingerprint and extraction yield of medicinal herb phenolics with hepatoprotective potential, as determined by UV-Vis and FT-MIR spectroscopy. Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj-Napoca 39 (2011), 82-89.

[41] L. H. Bean, L. N. Kabata-Pendia, A. Krakowiak, Useful phytoindicator (Dandelion) for trace metal pollution, Institute of Soil Science and Plant Cultivation (I"NG) Pulawy, Poland (1997).

[42] D. Špoljarić, Oksidacijski stres u stanicama alga Chlorella kessleri uzrokovan toksičnim zagađivalima u vodama, (2013), doktorska disertacija.

[43] H. Cai, Y. Zhou, J. Xiao, X. Li, Q. Zhang, X. Lian, Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice, Plant cell Rep., 28(2009), 527-537.

[44] K. Kosová, P. Vítámvás, M. O. Urban, I. T. Prášil, J. Renaut, Plant Abiotic Stress Proteomics: The Major Factors Determining Alterations in Cellular Proteome, Front. Plant Sci. 9 (2018), 122.

[45] S. Petrova, K. Todorova, M. Dakova, E. Mehmed, B. Nikolov, I. Denev, L. Firkova, Photosynthetic Pigments as Parameters/Indicators of Tree Tolerance to Urban Environment (Plovdiv, Bulgaria). Ecol. Balk. 9 (2017).

[46] B. Ozola, I. Augspole, M. Duma, Pigments content in different processed edible wild plants, Food, Nutr., Well-Being, Jelgava, Latvia (2019), 204-209.

[47] A. Ortiz-Espín, A. Sánchez-Guerrero, F. Sevilla, A. Jiménez, The role of ascorbate in plant growth and development. In Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance, Springer, Cham. (2017), 25-45.

[48] C. Hu, Factors affecting phytochemical composition and antioxidant activity of Ontario vegetable crops (doktorska disertacija) (2012).

8. Dodaci

8.1. Popis kratica

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kisikove jedinke (engl. *reactive oxygen species*)
AA	askorbinska kiselina (engl. *ascorbic acid*)
Z	onečišćena područja
Č	nezagađena područja
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrozin
$CuSO_4$	bakrov sulfat
FC	Folin-Ciocalteuov reagens
Na_2CO_3	natrijev karbonat
FRAP	engl. *Ferric reducing antioxidant power assay*
iRAC	engl. *Iron (III) reducing antioxiant capacity assay*
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroamn-2-karbonska kiselina
SD	standardna devijacija
PCA	analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Components Analysis*)
FTIR	engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*
PUFA	polinezasićene masne kiseline