Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka (Taraxacum officinale Weber) u urbanoj sredini

Boršćak, Denis

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:182:951754

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer

Denis Boršćak

PROCJENA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA FIZIOLOŠKOG STANJA MASLAČKA (*Taraxacum officinale* Weber) U URBANOJ SREDINI

Diplomski rad

Osijek, 2020 godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer

Denis Boršćak

PROCJENA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA FIZIOLOŠKOG STANJA MASLAČKA (*Taraxacum officinale* Weber) U URBANOJ SREDINI

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Vlatka Gvozdić

Komentorica: doc. dr. sc. Selma Mlinarić

Osijek, 2020 godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

TEMELJNA DOKUMETACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) u urbanoj sredini

Denis Boršćak

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. Selma Mlinarić

Sažetak: Maslačak (*Taraxacum officinale* Weber) rasprostranjena je višegodišnja biljka koja može reagirati na razna onečišćenja pa je zato dobar bioindikator. U ovom radu ispitivan je utjecaj antropogenih zagađivala na maslačak odnosno na sadržaj ukupnih topivih polifenola i askorbinske kiseline, koncentraciju proteina, klorofila i karotenoida te ukupnu antioksidativnu aktivnost. Kod uzoraka prikupljenih na prometnim lokacijama dolazi do smanjenja svih parametara u odnosu na uzorke prikupljene na lokacijama bez djelovanja prometa. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da antropogena zagađivala negativno djeluju na ukupnu antioksidativnu aktivnost, pa samim time dolazi i do smanjenja sadržaja polifenola i askorbinske kiseline, koncentracije proteina, klorofila i karotenoida. Rezultat metode analize glavnih komponenata primijenjene na spektre dobivene metodom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) ukazao je na razlike između uzoraka prikupljenih na prometnim i neprometnim lokacijama.

Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: antioksidativna aktivnost / askorbinska kiselina / FTIR spektroskopija / karotenoidi / klorofil / polifenoli / proteini
Diplomski rad obuhvaća: 34 stranice, 13 slika, 1tablicu, 33 literaturna navoda i 3 priloga
Stručno povjerenstvo: 1. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc.dr.sc. Vlatka Gvozdić, mentorica i članica
3. doc.dr.sc. Lidija Begović, članica
4. doc.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić, zamjena člana
Rad prihvaćen: 31.8.2020.
Rad je pohranjen : Knjižnica Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

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

Denis Boršćak

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. Selma Mlinarić, PhD

Abstract: Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) is a widespread perennial plant that can react to various contaminants and therefore is a good bioindicator. In this paper, the influence of anthropogenic pollutants on dandelion, including the content of total soluble polyphenols and ascorbic acid, the concentration of proteins, chlorophyll and carotenoids and the total antioxidant activity was investigated. There is a decrease in all parameters in the samples collected at the location with the traffic in comparison to those collected at the location without traffic. From the obtained results we can conclude that anthropogenic pollutants have a negative effect on the overall antioxidant activity, and there is a decrease in the content of polyphenols and ascorbic acid, the concentration of protein, chlorophyll and carotenoids. The result of the principal component analysis method applied to the spectra obtained by the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) indicated differences between the samples collected at traffic and non-traffic locations.

Original in: Croatian
Key words: antioxidant activity / ascorbic acid / carotenoids / chlorophyll / FTIR spectroscopy / polyphenols / proteins
Thesis includes: 34 pages, 13 figures, 1 table, 33 references and 3 appendices
Reviewers: 1. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD; chair
2. Assist. Prof. Vlatka Gvozdić, PhD; supervisor and member
3. Assist. Prof. Lidija Begović, PhD; member
4. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić, PhD; substitute member
Thesis accepted: 31.8.2020.
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. Antropogeni učinak 2

2.2.1. Zagađenje tla 3

2.2.2. Zagađenje zraka 4

2.3. Utjecaj zagađivača na biokemijske parametre u biljkama 5

2.3.1. Antioksidativna aktivnost 5

2.3.2. Askorbinska kiselina 6

2.3.3. Proteini 7

2.3.4. Sekundarni metaboliti 8

2.3.5. Karotenoidi i klorofili 9

3. Materijali i metode 11

3.1. Biljni materijal 11

3.2. Kemikalije 14

3.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata 14

3.4. Određivanja koncentracije proteina 15

3.5. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline 16

3.6. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola 16

3.7. Ukupna antioksidativna aktivnost 17

3.8. Statistička analiza biokemijskih parametara 18

3.9. FTIR (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*) spektroskopija 18

3.10. Analiza glavnih komponenata 18

4. REZULTATI 20

4.1. Koncentracija klorofila i karotenoida 20

4.2. Koncentracija proteina 20

4.3. Sadržaj ukupnih polifenola i askorbinske kiseline 21

4.4. Ukupna antioksidativna aktivnost 22

4.5. Analiza glavnih komponenata 23

5. RASPRAVA 26

6. ZAKLJUČAK 29

7. LITERATURA 30

8. DODACI 32

8.1 Popis kratica 32

9. ŽIVOTOPIS 34

1. UVOD

Urbanizacija utječe na staništa životinja, biljaka i ljudi. Ona obuhvaća razvoj industrije, stambenih, trgovačkih objekata i prometa. Kvaliteta vode, zraka i tla ima važnu ulogu u kvaliteti biljnih i životinjskih staništa. Zagađenje je jedno od najutjecajnijih parametara tla koje negativno utječe na zdravlje ljudi i rast te razvoj biljaka i životinja [1].

Nakon industrijske revolucije došlo je do nastanka mnogih ekoloških problema zbog rasta i razvoja urbanih sredina. Urbane sredine koje uključuju okoliš, životinje, biljke i čovjeka izložena su visokim koncentracijama toksičnih kemikalija koje se mogu akumulirati, a upravo to utječe na ljudsko zdravlje, rast i razvoj biljaka i životinja te kvalitetu okoliša [2].

Maslačak (*Taraxacum officinale* Weber) je vrlo rasprostranjena višegodišnja biljka porodice Asteraceae, a može rasti i u urbanim sredinama. Dokazano je da maslačak može reagirati na onečišćenje zraka, tla i vode [3]. To onečišćenje dovodi do pojave oksidativnog stresa kod biljaka koji uzrokuje oštećenje stanica. Biljke mogu akumulirati tragove metala što dovodi do inhibicije rasta [1].

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti štetan utjecaj antropogenih zagađivala na fiziološko stanje maslačka, njihov utjecaj na koncentracije polifenola, karotenoida, proteina, askorbinsku kiselinu i ukupnu antioksidativnu aktivnost.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Maslačak

Maslačak (*Taraxacum officinale* Weber) je biljka trajnica. Njegovi listovi čine prizemnu rozetu, duguljasti su i različito nazubljeni. Sama biljka visoka je oko 15-20 cm i ima jednu žutu cvatnu glavicu. Pripada našim najraširenijim korovima i livadnim biljkama [4]. Zemljopisno je široko rasprostranjen, stoga se smatra idealnom biljkom za proučavanje akumulacije antropogenog zagađenja. Također je dobar bio-indikator zagađenja uzrokovana teškim metalima [5]. Raste na travnjacima, parkovima, livadama, oranicama uz prometnice. U ovim krajevima se koristi u prehrani ljudi i domaćih životinja, ali i kao tradicionalni lijek za mnoge bolesti [4].

2.2. Antropogeni učinak

Urbani ekosustavi se sastoje od industrijskih, trgovačkih, stambenih, prometnih, rekreacijskih i drugih područja. To određuje različita staništa biljaka, životinja i ljudi. Abiotički i biotički čimbenici kao što su kvaliteta zraka, tla i vode te vegetacija utječu na kvalitetu urbanih staništa biljaka i životinja. Zagađenje je najznačajnija karakteristika urbanog tla, a to može negativno utjecati na ljudsko zdravlje [1].

Čovjek je sklon razaranju okoliša i živih bića na Zemlji te na taj način stvara monotona staništa i osiromašuje živi svijet na Zemlji. Postao je jedan od najvažnijih ekoloških čimbenika zato što nastoji promijeniti osnovna zbivanja u biosferi. U odnosu na druga živa bića, u najvećoj je mjeri u vrlo kratkom periodu utjecao na promjenu svoje okoline. Zato ima veliki utjecaj na daljnji razvoj biosfere. Mijenjajući okolinu čovjek može izazvati promjene koje utječu i na njega samog. Čovjekovo djelovanje biotički je čimbenik. On svjesno i organizirano iskorištava prirodu oko sebe na način da štetno djeluje na životinje, biljke, vodu, zrak i tlo. Neki od tih načina su: gradnja prometnica, krčenje šuma, urbanizacija, industrija, fosilna goriva [6].

Rast gradova i širenje urbanih područja stvaraju brojne ekološke probleme u posljednjih nekoliko desetljeća. Urbana područja izložena su kumulativnom utjecaju mnogih štetnih čimbenika prvenstveno visokim koncentracijama štetnih kemikalija [2].

2.2.1. Zagađenje tla

Zagađenje tla nastalo je zbog djelovanja čovjeka. Ono dovodi do oštećenja tla, ali također može dovesti i do oštećenja života na tlu, ali i u tlu. Do oštećenja može doći zbog; krčenja šuma, erozije, zakiseljavanja i niza drugih čimbenika. Oštećenja mogu izazvati i toksične tvari koje se mogu akumulirati u samome tlu, ali se ne mogu razgraditi prirodnim procesima. Do onečišćenja tla dolazi zbog urbanizacije, pa se izvori mogu naći u industriji, poljoprivredi, prometu, odlagalištima otpada. Svaka od tih djelatnosti je na svoj način uzrokovala zagađenje [7].

U onečišćenju tla prvo mjesto zauzima industrija, a poslije nje su odmah odlagališta otpada i postrojenja za dobivanje energije. Najčešće anorganske onečišćujuće tvari su: SO_2, NH_3, CO_2, CH_4, HCl, teški metali, fluoridi i radioaktivne tvari, a organske: benzen, fenoli, policiklički aromatski ugljikovodici (PUA). Teški metali su najzastupljenije i najštetnije tvari koje potječu iz industrijskih procesa jer mogu lako doprijeti do tla.

Onečišćenje tla teškim metalima vidljivo narušava njegovu plodnost ili pak utječe na rast i razvoj biljaka. Veliki utjecaj na kvalitetu samog tla imaju tzv. nepokretni izvori: dimnjaci industrije teških metala, termo elektrane i kemijska industrija. Najčešća onečišćenja tla u gradovima izazvana su metalima poput olova, cinka, kroma, bakra, željeza, arsena i žive. Osim iz industrijskih izvora ti metali mogu doći do tla preko prometnica, odnosno vozila na način da se pomoću gravitacijske sile talože ili ispiru pomoću oborina [7].

Policiklički aromatski ugljikovodici (PUA) nastaju nepotpunim izgaranjem ili pirolizom organskih tvari. U okolišu se mogu naći kao posljedica ljudske djelatnosti ili prirodnim putem, šumskim požarima ili vulkanskim erupcijama. U okoliš dospijevaju emisijom iz industrije. Jedan on važnih izvora su i kućna ložišta, ali emisije iz industrije i šumski požari su ipak glavni. PUA su otrovni, kancerogeni i mogu se akumulirati u tlu [7].

Postojani organski spojevi (POP) su organoklorni spojevi koji u gradove dospijevaju taloženjem iz zraka i emisijama iz industrijskih postrojenja. Ovi spojevi su postojani, lipofilni, toksični i imaju sposobnost bioakumulacije i transporta pomoću zraka [7].

Pesticidima se smatraju sredstva za zaštitu biljka, a mogu biti kemijskog ili biološkog podrijetla. Koriste se za suzbijanje bolesti i nametnika. Najčešće upotrebljavani su organoklorni i organofosforni pesticidi zato što su jeftini i učinkoviti, ali se sporo razgrađuju pa uzrokuju onečišćenje tla [7].

2.2.2. Zagađenje zraka

Zagađenjem zraka smatra se prisutnost tvari u zraku koji imaju štetan utjecaj na zdravlje ljudi, rast i razvoj biljaka te životinja. Može se podijeliti na prirodne i antropogene izvore. U prirodne izvore zagađenja zraka spadaju vulkanske erupcije, šumski požari, geotermalni izvori i snažni vjetrovi. Antropogeni izvori zagađenja mogu se podijeliti na pokretne i nepokretne izvore. Pokretnim izvorima smatraju se prijevozna sredstva koja ispuštaju štetne tvari u okoliš, a to su: motorna vozila, vozila za obradu poljoprivrednih zemljišta, vlakovi, brodovi i zrakoplovi. Nepokretni izvori mogu se podijeliti na difuzne i točkaste izvore zagađenja. Difuznim izvorima smatraju se oni oblici kod kojih se štetne tvari ispuštaju bez ispusta odnosno dimnjaka (uređaji, površine), a točkasti izvori ispuštaju štetne tvari u zrak preko oblikovanih ispusta (industrijska postrojenja, građevine, uređaji) [7].

U štetne tvari koje dospiju u zrak zbog djelovanja čovjeka ubrajaju se: plinovi, lebdeće čestice, metali, radioaktivne tvari i otpadna toplina. Najčešći plinovi u zraku su ugljikovi oksidi, sumporovi oksidi i dušikovi oksidi. Halogeni elementi poput fluora, klora, broma, joda, klorovodika također imaju štetno djelovanje na zrak. Važno je spomenuti i prizemni ozon koji pri povišenim koncentracijama ima štetan utjecaj na kvalitetu zraka. Metali, organometalni spojevi i radionuklidi su vrlo važne štetne tvari koje također mogu biti prisutne u zraku [7].

Dušikovi oksidi su spojevi dušika i kisika opće formule NO_x. Nastaju oksidacijom dušika iz atmosfere pri velikim temperaturama izgaranja ili pod utjecajem elektromagnetskog naboja. Oni spadaju u skupinu jako značajnih zagađivala u zraku, a mogu stvoriti kisele kiše i fotokemijski smog. Veće količine dušikovih oksida ne nastaju iz prirodnih izvora nego iz antropogenih izvora u koje spadaju ložišta na fosilna goriva, pogoni za proizvodnju energije i mobilni izvori (automobili). Dušikovi oksidi imaju štetan utjecaj na biljke, životinje i ljude te na tlo i vodu [7].

Sumporovi oksidi obično nastaju oksidacijom elementarnog ili organskog sumpora, a opća formula im je SO_x. Aktivni vulkani i šumski požari su najveći prirodni izvori oksida sumpora. Antropogeni izvori su razna industrijska postrojenja raznih namjena, najčešće postrojenja za dobivanje energije (električne i toplinske) iz fosilnih goriva. Također sumporovi oksidi se mogu vezati s vodom u atmosferi i na taj način izazvati kisele kiše koje mogu izazvati štetne učinke na ljudsko zdravlje, biljke i životinje, ali mogu uzrokovati i zakiseljavanje tla [7].

Koncentracija teških metala u zraku raste zbog povećanja metalurške industrije. Od teških metala najčešće se pojavljuju olovo, cink, živa, kadmij, arsen, željezo, bakar, nikal, krom.

Prometnice također mogu biti izvor zagađenja teškim metalima. Teški metali su vrlo postojani pa zato nakon emisije oni dospijevaju u tlo ili vodu. Kadmij, živa i olovo koji su prioritetni metali, u zrak dolaze zbog procesa izgaranja goriva u raznim postrojenjima. Kadmij dolazi zbog izgaranja lož ulja, a živa zbog izgaranja zemnog plina. Olovo u zrak dolazi iz cestovnog prometa, ali može se pojaviti i iz industrijskih postrojenja. Izvori arsena, kroma, bakra, nikla, selena i cinka mogu biti različiti. Arsen i nikal se nalaze u krutom gorivu i lož ulju. Bakar u zrak dospijeva zbog trošenja kočnica i guma automobila, cink zbog izgaranja biomase, a selen zbog proizvodnje stakla. Teški metali imaju veliku sposobnost akumulacije, otrovni su i postojani pa su zato jako štetni za sva živa bića [7].

2.3. Utjecaj zagađivača na biokemijske parametre u biljkama

Zagađivala se akumuliraju u raznim dijelovima biljke i imaju štetan utjecaj na njih. To dovodi do nekoliko funkcionalnih poremećaja kod biljaka zbog oksidacijskog djelovanja zagađivača. Zagađivala mogu reagirati s raznim ključnim staničnim komponentama kao što su: DNA, proteini, stanične membrane i enzimi [8]. Stanične membrane su prve pogođene, a kao rezultat dolazi do povećanja njihove propusnosti [9]. Zatim slijedi lom lanaca DNA, defragmentacije proteina i oštećenja fotosintetskih pigmenata [8]. Rezultati tih oštećenja su usporavanje rasta biljke, inhibicija fotosinteze i indukcija ili inhibicija enzima koji sudjeluju u odgovoru na stres [9]. Stoga, da bi se suprotstavile ovom oštećenju, biljne stanice deaktiviraju stres izazvan utjecajem zagađivača na način da aktiviraju obrambene mehanizme. Antioksidativne tvari i antioksidativni enzimi imaju važnu ulogu u obrani stanica od slobodnih radikala nastalih oksidativnim stresom [8].

2.3.1. Antioksidativna aktivnost

Oksidacijski stres može izazvati oštećenja važnih biomolekula. Nastaje zbog neravnoteže između oksidansa i antioksidansa. Oksidansi mogu nastati aerobnim metabolizmom, kao međuprodukti oksidacije vode do molekularnog kisika. Oksidacijski stres se kod biljaka može javiti zbog raznih vanjskih čimbenika kao što su: antropogeni utjecaj, temperatura, suša i dr. U takvim uvjetima pojačano se stvaraju reaktivne kisikove jedinke (engl. *reactive oxygen species* - ROS) koje dovode do oštećenja proteina, DNA i lipida, a samim time dolazi do poremećaja razvojnih procesa i metabolizma u biljaka [10]. ROS se kod biljaka stvara u mitohondrijima,

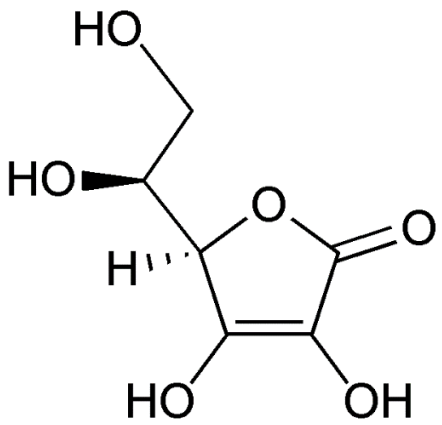
kloroplastima i peroksisomima [8]. ROS se mogu podijeliti na slobodne radikale (hidroksilni, peroksilni i superoksidni radikal) i reaktivne neradikalne derivate (singletni kisik i vodikov peroksid) [10].

Antioksidansi su redukcijski agensi koji sprečavaju oksidaciju drugih molekula zato što oksidacijske reakcije stvaraju slobodne radikale koji uzrokuju oštećenja stanica [8]. Biljke sadrže sustav antioksidativnih enzima poput superoksid-dismutaze, askorbat peroksidaze. Također biljke posjeduju i neenzimske antioksidanse koji sprečavaju oštećenja stanice izazvanih oksidacijom. U njih ubrajamo askorbinsku kiselinu (AA), karotenoide i klorofil, proteine i polifenole [10]. Pod utjecajem stresnih uvjeta kod nekih biljaka dolazi do povećanja ukupne antioksidativne aktivnosti [3]. Također, kod nekih biljaka može doći i do inhibicije antioksidativne aktivnosti pod utjecajem tehnogenog stresa [2].

2.3.2. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina (engl. *Ascorbic Acid* - AA) ili vitamin C molekulske formule $C_6H_8O_6$ (***Slika 1***) kemijski gledano jedan je od najjednostavnijih vitamina pa je zbog toga među prvim izoliran, okarakteriziran te mu je određena struktura [11].

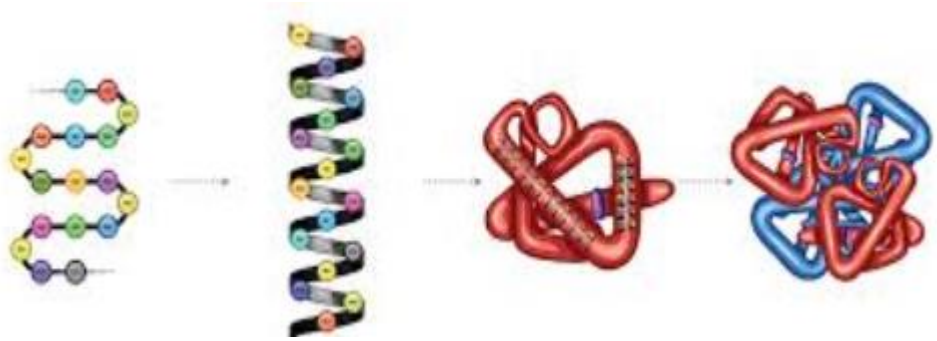
Askorbinska kiselina, koja je topiva u vodi, ne enzimski je antioksidans koji se nalazi u kloroplastu i svim staničnim organelima pa tako i u staničnoj membrani. Tijekom stresa AA ima značajnu ulogu u rastu i razvoju biljaka. Prolil hidroksilaza, koja pripada skupini hidroksilaza, koristi askorbat kao kofaktor. Djelovanje AA je takvo da nastoji smanjiti ili izbjeći oštećenja izazvana djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Askorbat može uništiti nekoliko oblika ROS kao što su: singletni kisikovi, superoksidni i hidroksilni radikali. Također on štiti i stanične membrane od oksidativnog oštećenja. AA također održava α-tokoferol u njegovom reduciranom stanju i indirektno uklanja vodikov peroksid kroz askorbat peroksidazu. Istraživanja su pokazala da se sadržaj askorbinske kiseline u biljkama povećao nakon nekoliko dana izlaganja metalima [8].



Slika 1. Struktura askorbinske kiseline [12]

2.3.3. Proteini

Proteini su jedne od najsvestranijih molekula u živim stanicama i oni obavljaju jako važne funkcije u svim biološkim procesima. Jedna od uloga im je katalitička uloga, prijenos i pohrana ostalih molekula, osiguravanje mehaničke potpore, imunološka zaštita, prijenos živčanih impulsa, kontrola rasta i diferencijacija. Oni su linearni polimeri koji su izgrađeni od monomernih jedinica aminokiselina. Postoje četiri razine strukture proteina (***Slika 2)***. Primarna struktura se odnosi na slijed aminokiselina, sekundarna obuhvaća konformacije koje poprimaju lokalni dijelovi polipeptidnog lanca, tercijarna struktura opisuje smatanje polipeptidnih lanaca u prostoru, a kvaterna se struktura odnosi na specifično udruživanje polipeptidnih lanaca koji tvore komplekse napravljene od više podjedinica. Proteini mogu sadržavati vrlo različite funkcijske skupine. One mogu biti alkoholi, tioli, tioeteri, karboksilne kiseline i druge bazne skupine. Većina je tih skupina kemijski reaktivna, a njihove različite kombinacije omogućuju proteinima širok raspon djelovanja. Njihova su reaktivna svojstva važna za djelovanje raznih enzima [13]. Koncentracija proteina kod biljaka smanjuje se pod antropogenim utjecajem [9].



Slika 2. Primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina [14].

2.3.4. Sekundarni metaboliti

Biljke imaju mogućnost stvaranja alkaloida, fenola, flavonoida, karotenoida i mnogih drugih. Svi ti spojevi pripadaju sekundarnim metabolitima. Oni igraju jako bitnu ulogu u raspadanju reaktivnih kisikovih vrsta, ali nemaju nikakvog utjecaja na fotosintetske mehanizme, oksidaciju supstrata, transport topivih tvari, apsorpciju hranjivih tvari i staničnu diferencijaciju. Također su jako bitni za preživljavanje biljaka u stresnim uvjetima. Sekundarni metaboliti se mogu sintetizirati u reakcijama poput glikolize. Fenoli su za razliku od drugih sekundarnih metabolita pokazali najbolje antioksidativno djelovanje. Sekundarni metaboliti mogu se pojavljivati u pasivnom i aktivnom obliku. U pasivnom obliku sekundarni metaboliti već postoje unutar tkiva, a dok aktivni nastaju kao odgovor na stres. Postoje dvije vrste sekundarnih metabolita. Jedna vrsta sadrži dušik i u njih spadaju spojevi poput purinskih i indolskih alkaloida. Druge vrste ne sadrže dušik u koje ubrajamo terpenoide i fenole [8].

Fenoli su organski spojevi koji se sastoje od benzenskog prstena na koji je vezana hidroksilna skupina. Njihov najjednostavniji predstavnik je fenol opće formule C_6H_5OH (***Slika 3***). Kod biljaka se mogu podijeliti u različite skupine kao što su: fenolne kiseline, flavonoidi, lignin i tanini. Antioksidacijska sposobnost fenolnih spojeva raste s povećanjem broja hidroksilnih skupina i njihovom konjugacijom s bočnim lancima aromatskih prstena. Od svih fenola, flavonoidi su biljni glavni aktivni sekundarni metaboliti koji djeluju kao antioksidansi u stresnim uvjetima. Široko rasprostranjeni u biljci, a najčešće se nalaze u listu, dijelovima cvijeta i u peludi. Flavonoidi se uglavnom koncentriraju u vakuoli biljaka u obliku glikozida. Djeluju

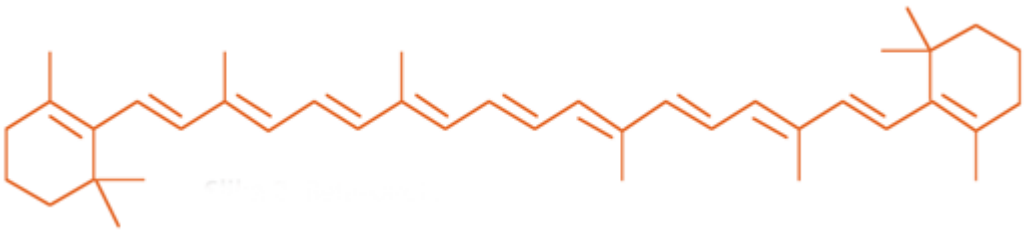
kao sekundarna sredstva u uklanjanju ROS-a unutar biljnih tkiva na način da neutraliziraju slobodne radikale prije nego li oni oštete stanice. Također imaju sposobnost modifikacije reakcije peroksidacije mijenjajući raspored lipida. Stabiliziraju stanične membrane na način da smanjuju njezinu fluidnost [8].



Slika 3. Strukturna i molekulska formula fenola [15].

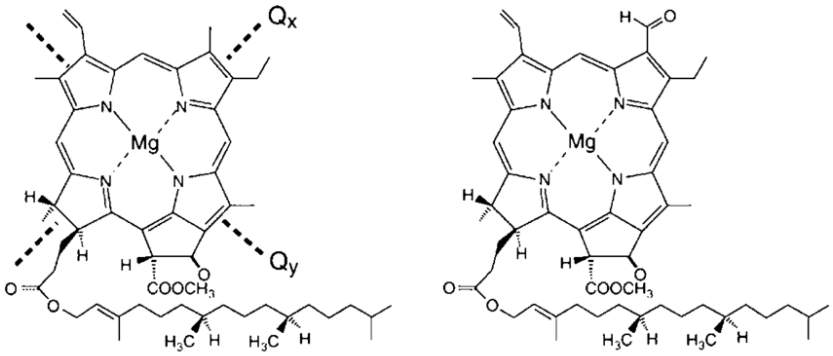
2.3.5. Karotenoidi i klorofili

Karotenoidi su organske molekule topive u lipidima, a glavni prekursor vitamina A je beta karoten [8]. Posjeduje acikličku strukturu koja se sastoji od dugog lanca s konjugiranim dvostrukim vezama, a opća formula mu je $C_{40}H_{56}$ (***Slika 4***). Njegovom razgradnjom dobivaju se dvije molekule vitamina A [16]. Kod viših biljaka ti se pigmenti nalaze u cvijetu, plodu i korijenu u obliku crvene, žute ili narančaste boje [17]. Visoka temperature potiče izomerizaciju dvostrukih veza što rezultira smanjenjem intenziteta boje [16]. U tkivima nekih vrsta zelenih biljaka karotenoidi postaju vidljivi tijekom jeseni uslijed degradacije klorofila [17]. Apsorbiraju svijetlost u području valne duljine od 450 do 570 nm i prenose energiju do klorofilnog pigmenta. Jedna od najznačajnijih osobina karotenoida je njihova sposobnost da djeluju kao antioksidansi čime sprečavaju oštećenje stanične membrane. Dokazano je da se koncentracija karotenoida u biljci smanjuje pod utjecajem antropogenih zagađivala [32].



Slika 4. Strukturna formula beta karotena [18].

Klorofil jedan je od najvažnijih pigmenata koji biljkama i algama daje zelenu boju. Biljke koriste klorofil za hvatanje svijetlosti koja im je potrebna za fotosintezu [19]. Svjetlosna energija pretvara se u kemijsku sintezom organskih spojeva [20]. Kod zelenih biljaka nalazi se u membranskim organelima koji se nazivaju kloroplasti. Osnovna struktura klorofila je porfirinski prsten koji je sličan onome hema u hemoglobinu, osim što je središnji atom kod klorofila magnezij, a kod hema željezo. Klorofil je topiv u vodi i mastima zbog dugog uljikovodičnog lanca koji je pričvršćen na porfirinski prsten [19]. Pojavljuje se u nekoliko oblika, a najvažniji oblici su klorofil *a* i klorofil *b* (***Slika 5***) koji se nalaze u višim biljkama i zelenim algama [20]. Mala razlika u jednom od bočnih lanaca omogućava svakoj vrsti klorofila da apsorbira svijetlost pri različitim valnim duljinama [19].



Slika 5. Strukturna formula klorofila *a* (lijevo) i klorofila *b* (desno) [21]

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

U svrhu ovog istraživanja kao uzorci korišteni su listovi maslačka (*Taraxacum officinale* Weber). Biljni materijal sakupljen je u mjesecu listopadu unutar sedam dana na 30 različitih lokacija na području grada Osijeka (***Tablica 1***). Uzorci su nakon prikupljanja smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 °C. Uzorci su podijeljeni u dvije skupine, jedna skupina obuhvaća prometna područja (P) (***Slika 6***) dok druga skupina uzoraka obuhvaća neprometna područja (NP) (***Slika 7***).

Tablica 1. Lokacije uzoraka s podjelom na prometna i neprometna područja

Uzorak	Lokacija	Područje
G1	Kampus Parking, zagrađen dio	NP
G2	Saponia, južna strana	P
G3	Pampas, točno uz ogradu gradilišta	NP
G4	Čepinska ulica od pruge prema Avenue Mall-u	P
G5	50m od ulice cara Hadrijana i tramvajske pruge	NP
G6	Saponia, zapadna strana	P
G7	Saponia, istočna strana	P
G8	Saponia, sjeverna strana	P
G9	Uz tramvajsku prugu, Ulica cara Hadrijana	P
G10	Benzinska crpka Tifon na Vukovarskoj	P
G11	Željeznička stanica OLT	P
G12	20m od željezničke stanice Branjaski most	NP
G13	Željeznička pruga na Vukovarskoj	P
G14	Parking uz gradilište Kampusa	NP
G15	Gradilište u Kampusu, unutar ograde gradilišta	NP

G16	5m od tramvajske pruge, Ulica cara Hadrijana	P
G17	Gradilište u kampusu, vanjska strana ograde prema cesti	NP
G18	Oko tornja HEP-a i ispod mosta koji vodi prema Baranji	NP
G19	Tvrđa, maslačak pod zidom	NP
G20	Vukovarska ulica, uz cestu	P
G21	Dvorište Vukovarska, zaštićeno od prometa	NP
G22	Crodux, benzinska pumpa na Strossmayerovoj	P
G23	Ulica cara Hadrijana, 15m od pruge	NP
G24	Park kulture	NP
G25	Ulica cara Hadrijana, 10m od pruge	NP
G26	Benzinska pumpa kod Kauflanda	P
G27	Ulica cara Hadrijana, uz prugu	P
G28	50 metara od gradilišta na Pampasu prema Zapadu	NP
G29	Željeznički kolodvor	P
G30	Benzinska pumpa na čepinskoj	P



Slika 6: Primjer lokacije prometnog područja, G 29 Željeznički kolodvor.



Slika 7: Primjer lokacije neprometnog područja, G 19 Tvrđa (maslačak pod zidom).

3.2. Kemikalije

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije:

Tekući dušik

Aceton, C_3H_6O

Magnezijev hidrogenkarbonat, $Mg(HCO_3)_2$

Kalij-fosfatni pufer

Bradfordov reagens

Albumin goveđeg seruma, BSA

Trikloroctena kiselina

2,4,-Dinitrofenilhidrazin, DNPH

Tiourea, CH_4N_2S

Bakrov sulfat, $CuSO_4$

Sumporna kiselina, H_2SO_4

Etanol, C_2H_5OH

Folin-Ciocalteuov reagens, FC

Natrijev karbonat, Na_2CO_3

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

Ferozin i amonij Fe (III) sulfat

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

Kalijev bromid, KBr

3.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

U prethodno izvagane tubice stavljeno je oko 0,1 g tkiva prethodno usitnjenog uz pomoć električnog mlinca uz dodatak tekućeg dušika. Na uzorak je dodano 1 mL 100% acetona i $Mg(HCO_3)_2$. Pigmenti su ekstrahirani na temperaturi od -20 °C tijekom 24 sata. Nakon ekstrakcije, tubice su centrifugirane na 4 °C pri 18000 *g* u trajanju od 15 minuta. Nakon

centrifugiranja na spektrofotometru (Specord 40, Analytik Jena) su izmjerene apsorbancije na tri različite valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm. Kao slijepa proba korišten je 100% aceton. Koncentracije pigmenta određene su prema Lichenthaleru (1987) [22] koristeći slijedeće formule:

$$\text{Chl } a = (11.24 \times A(661.6\text{nm}) - 2.04 \times A(644.8\text{nm})) \times V / (m \times 1000) \quad (1)$$

$$\text{Chl } b = (20.13 \times A(644.8\text{nm}) - 4.19 \times A(661.6\text{nm})) \times V / (m \times 1000)$$

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

$$\text{Car} = (1000 \times A(470\text{nm}) - 1.90 \times (11.24 \times A(661.6\text{nm}) - 2.04 \times A(644.8\text{nm})) - 63.14 \times (20.13 \times A(644.8\text{nm}) - 4.19 \times A(661.6\text{nm})) \times V / (214 \times m \times 1000)$$

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

3.4. Određivanja koncentracije proteina

Listovi maslačka (0,5 g) samljeveni su u prah u tekućem dušiku koristeći električni mlinac i ekstrahirani uz dodatak 1 mL kalij-fosfatnog pufera (pH=7,0). Uzorci su inkubirani na ledu 5 minuta i centrifugirani na 18 000 *g* pri 4 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon centrifugiranja supernatanti su odvojeni i postupak je ponovljen, a potom su supernatanti spojeni. Za mjerenje koncentracije proteina korištena je metoda po Bradfordu (1976) [23]. Reakcijska smjesa sastojala se od 5µL 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 u uzorcima izračunata je iz baždarne krivulje pripremljene razrjeđenjem standardne otopine albumina iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) koncentracije 2 mg/mL.

3.5. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline

Sadržaj askorbinske kiseline (AA) određivan je prema Bendritter (1998) [24]. Oko 0,5 grama tkiva prethodno usitnjenog u tekućem dušiku koristeći električni mlinac, stavljeno je u tubice od 12 mL. Dodano je 10 mL destilirane vode, a zatim su tubice centrifugirane na 3000 *g* pri 4 °C u vremenu od 15 minuta. Za određivanje AA na 300 µL vodenog ekstrakta dodano je 100 µL 13,3 % trikloroctene kiseline i 25 µL destilirane vode te 75 µL DNPH reagensa te je smjesa izmiješana. DNPH reagens pripremljen je na način da se 2 g DNPH, 230 mg tiouree i 270 mg $CuSO_4$ otopi u 100 mL 5M sumporne kiseline. Slijepe probe su napravljene na isti način za svaki uzorak bez dodatka DNPH reagensa. Reakcijske smjese su inkubirane na 37 °C u vodenoj kupelji u vremenu od 1 sata. Nakon inkubacije dodan je DNPH reagens u sve slijepe probe, a zatim je dodano 500 µL 65% sumporne kiseline u sve uzorke i sve smjese su promiješane. Apsorbancija je mjerena spektrofotometrijski (Specord 40, Analytik Jena) na 520 nm, a koncentracija AA dobivena je iz baždarne krivulje s poznatim koncentracijama AA.

3.6. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

Sadržaj ukupnih topljivih polifenola određen je pomoću Folin-Ciocalteau reagensa [25].Uzorci su samljeveni u prah pomoću tekućeg dušika i osušeni na sobnoj temperaturi. Na 0,5 g dodano je 2,5 mL etanola (96%). Ukupni topljivi polifenoli ekstrahirani su tijekom 24 sata na -20 °C. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10 000 *g* pri -4 °C. Zatim su supernatanti odvojeni. Folin-Ciocalteuov reagens (FC) razrijeđen je vodom u omjeru 1:2 (v/v). Otapanjem 100 g natrijeva karbonata (Na_2CO_3) u 400 mL deonizirane vode i zagrijavanjem do vrenja dobivena je zasićena otopina Na_2CO_3. Nakon što se ohladila, otopina je profiltrirana, a odmjerena tikvica volumena 500 mL nadopunjena je do oznake.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 10 µL prethodno razrijeđenog ekstrakta, 190 µL deionizirane vode i 25 µL FC reagensa. Smjesa je izmiješana 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 na masu (g) svježe 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 ekstrakta

df - faktor razrjeđenja

m_{DW} - masa suhog tkiva

m_{FW} - masa svježeg tkiva

3.7. Ukupna antioksidativna aktivnost

Ukupna antioksidativna aktivnost određena je korsiteći FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power assay*) i iRAC (engl. *Iron (III) reducing antioxidant capacity as*say) metode. Za mjerenje ukupne antioksidativne aktivnosti korišten je supernatant dobiven prilikom ekstrakcije ukupnih topljivih polifenola.

FRAP test temelji se na reakciji željeznog 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe III TPTZ) s uzorkom pri čemu nastaje Fe II TPTZ prema Benzie (1999) [26]. Reakcijska smjesa sastojala se od 0,5 mM TPTZ i 1 mM $FeCl_3x6H_20$ u acetatnom puferu (pH 3,6). Na 290 µL reakcijske smjese dodano je 10 µL uzorka i promiješano te inkubirano na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je izmjerena na 593 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Za izradu baždarne krivulje korišten je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) kao standard. Napravljena su razrjeđenja Troloxa u metanolu od 0,25-2 mM. Ukupna antioksidativna aktivnost izražena je u ekvivalentima Troloxa (µmol/g suhe tvari).

iRAC metodom izmjerena je antioksidativna aktivnost koristeći ferozin i amonij Fe (III) sulfat prema Wan i sur. (2018) [27]. U jažice mikrotitarskih pločica dodano je 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 je inkubirana 30 minuta na 37 °C. Apsorbancija je očitana na 562 nm

koristeći čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Za izradu baždarne krivulje korišten je Trolox kao standard. Razrjeđenja Troloxa (20-100 µg/mL) napravljena su u etanolu. Ukupna antioksidativna aktivnost izražena je u ekvivalentima Troloxa po gramu suhe tvari (µmol/g suhe tvari).

3.8. Statistička analiza biokemijskih parametara

Dobiveni podaci su analizirani su koristeći T-test. Statističke analize izvedene su pomoću Microsoft Excela. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD).

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

Uzorci za snimanje FTIR spektroskopije priređeni su na način da su listovi osušeni na zraku, zatim su usitnjeni u struji dušika, a nakon toga uzeto je 3 mg uzorka te je on pomiješan s 100 mg kalijeva bromida (KBr). Spektri su snimljeni pri sobnoj temperaturi i u spektralnom rasponu od 500 do 4000 cm^{-1}, pri koraku od 2 cm. Učinjeno je 20 skenova i korekcija bazne linije.

3.10. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Components Analysis* - PCA) je jedna od najčešće korištenih multivarijantnih metoda obrade velikog broja podataka Glavni cilj analize glavnih komponenata je analiza povezanosti većeg broja koreliranih varijabli i smanjenje njihovog broja u smislu njihovog „sažimanja“ u manji broj komponenata. Nove su varijable međusobno nekorelirane i u sebi zadržavaju većinu informacije sadržanu u izvornoj podatkovnoj matrici. [28].

Metoda analize glavnih komponenata sastoji se od nekoliko osnovnih faza:

1. Standardizacija varijabli u svrhu postizanja njivo jednakosti čime se analiza pojednostavljuje.
2. Izračun matrice korelacije između svih izvornih varijabli.
3. Pronalaženje svojstvenih vrijednosti.

4. Određivanje matrica skorova (engl. *score*) i faktorskih opterećenja (engl. *factor loadings*).

5. Odbacivanje komponenata sa malim udjelom varijance.

Svojstveni vektori služe pri interpretaciji glavnih komponenata, a njihove su vrijednosti u prvoj glavnoj komponenti ravnomjerno raspoređene po svim izvornim varijablama [28].

Skorovi glavnih komponenti služe za:

1. Prikaz rezultata grafičkim putem, pri čemu se na najjednostavniji način može ispitati njihov međusobni položaj, korelacije s varijablama i utvrditi postajanje mogućih sličnosti/različitosti

2. Kao ulazne varijable služe u drugim multivarijantnim metodama, npr. regresijska analiza nad glavnim komponenatama (engl. *Principal Component Regression* - PCR).

Faktorska su opterećenja jednostavne korelacije između bilo koje izvorne varijable i faktora čime ujedno pridonose njegovom razumijevanju [28]. U grafičkom prikazu (biplot) prikazani skupa sa vrijednostima scora pridonose lakšoj interpretaciji podataka.

Ukoliko rezultate analize glavnih komponenata nije moguće interpretirati moguće ih je pojasniti nekom od metoda faktorske rotacije (varimax, quartimax, orthomax itd.) [29].

Za neku podatkovnu matricu X općenito vrijedi:

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

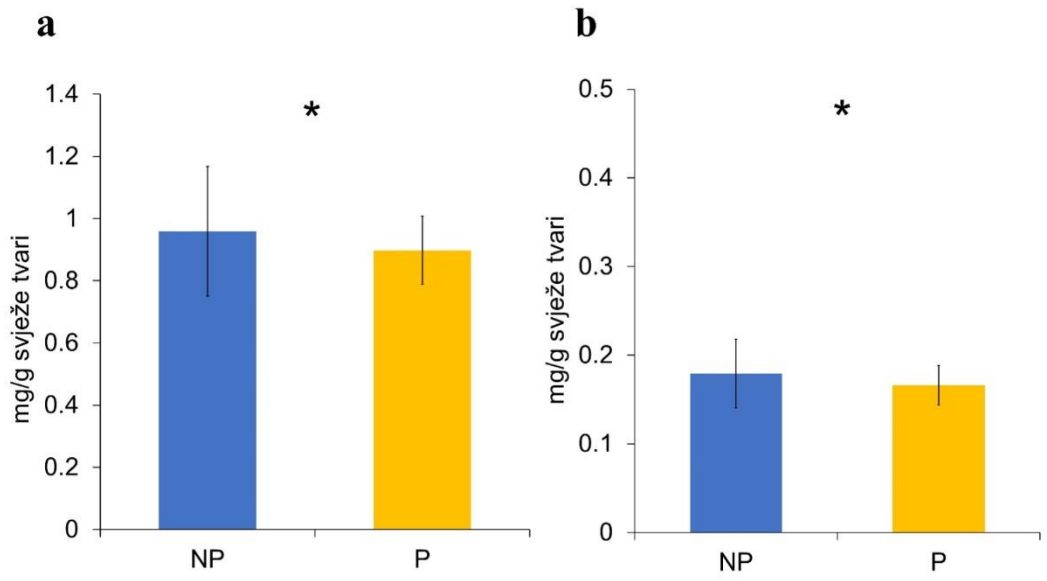
gdje oznaka PCi pretstavlja i-tu glavnu komponentu a l_{ji} je opterećenje promatrane varijable X_l.

Obrada podataka izvršena je u programu Statistica 13.3.

4. REZULTATI

4.1. Koncentracija klorofila i karotenoida

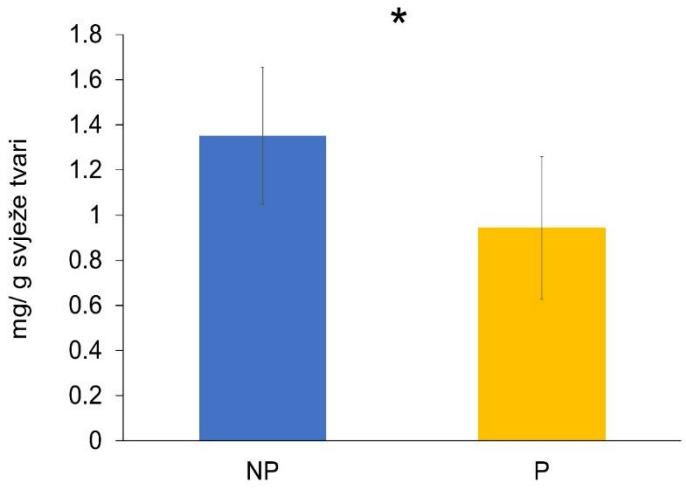
Nakon statističke obrade utvrđeno je da postoji značajna razlika u koncentraciji fotosintetskih pigmenata između uzoraka prikupljenim na prometnim lokacijama i uzoraka na neprometnim lokacijama. Ukupni klorofil ima značajno veću koncentraciju na neprometnim lokacijama nego na prometnim lokacijama (***slika 8a***). Koncentracija karotenoida također je značajno veća na neprometnim lokacijama u usporedbi s prometnim lokacijama (***slika 8b***).



Slika 8. Koncentracija ukupnog klorofila (a) i karotenoida (b) u uzorcima maslačka na neprometnim (NP) i prometnim lokacijama (P). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su T-testom. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.2. Koncentracija proteina

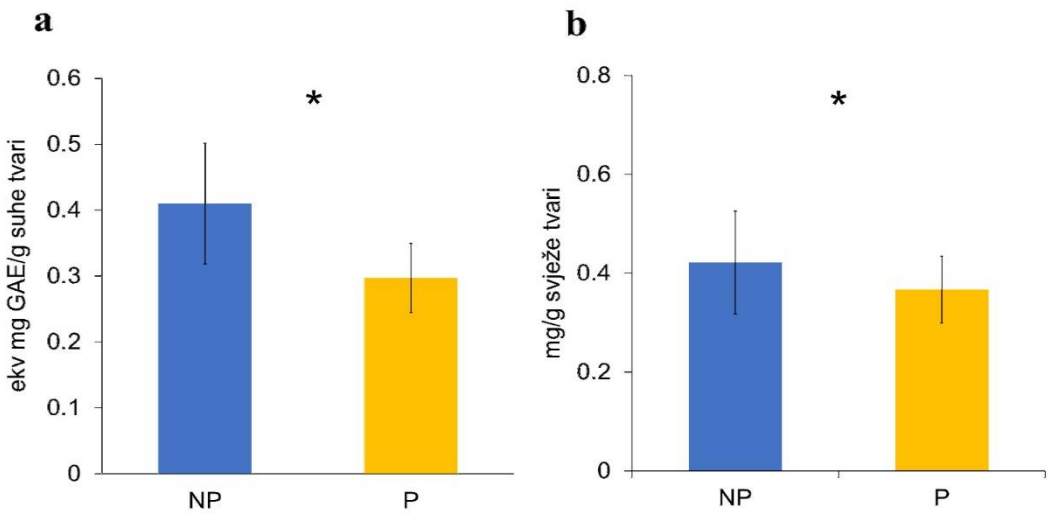
Statističkom analizom utvrđene su razlike u koncentraciji proteina između uzoraka prikupljenih na prometnim lokacijama i onima koje nisu prometne (***slika 9***). Iz rezultata je vidljivo da je kod prometnih lokacija koncentracija proteina manja.



Slika 9. Koncentracija proteina u uzorcima maslačka na neprometnim (NP) i prometnim lokacijama (P). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su T-testom. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.3. Sadržaj ukupnih polifenola i askorbinske kiseline

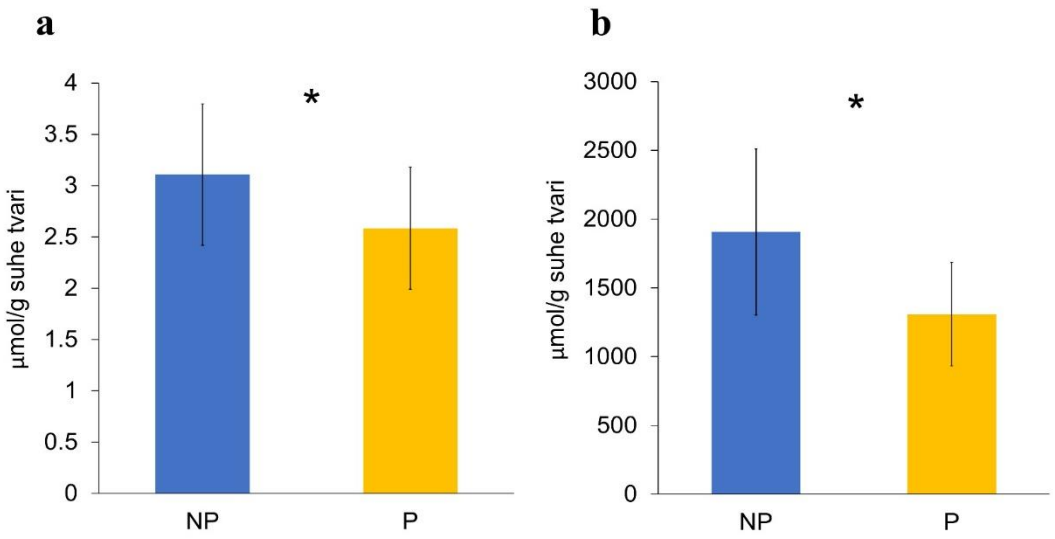
Statističkom obradom rezultata utvrđene su značajne razlike u sadržaju ukupnih polifenola između uzoraka na lokacijama izloženih prometu i onih lokacija kod kojih nema djelovanja prometa (***slika 10a***). Također je utvrđeno da postoje značajne razlike u sadržaju askorbinske kiseline između prometnih lokacija i lokacija kod kojih nema utjecaja prometa (***slika 10b***). Iz rezultata je uočljivo da je u uzorcima prikupljenim na prometnim lokacijama sadržaj askorbinske kiseline kao i sadržaj ukupnih polifenola manji od sadržaja u uzorcima prikupljenim na lokacijama koje nisu izložene djelovanju prometa.



Slika 10. Sadržaj ukupnih polifenola (a) i askorbinske kiseline (b) u uzorcima maslačka na neprometnim (NP) i prometnim lokacijama (P). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su T-testom. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.4. Ukupna antioksidativna aktivnost

Statističkom obradom rezultata utvrđene su značajne razlike kod ukupne antioksidativne aktivnosti između lokacija uzoraka zbog djelovanja prometa i onih lokacija na koja promet nema utjecaj izmjerenih FRAP metodom (***slika 11a***) i iRAC metodom (***slika 11b***). Iz rezultata je uočljivo da je kod prometnih lokacija ukupna antioksidativna aktivnost manja od vrijednosti pronađenih u uzorcima prikupljenim na lokacijama koje nisu izložene prometu.



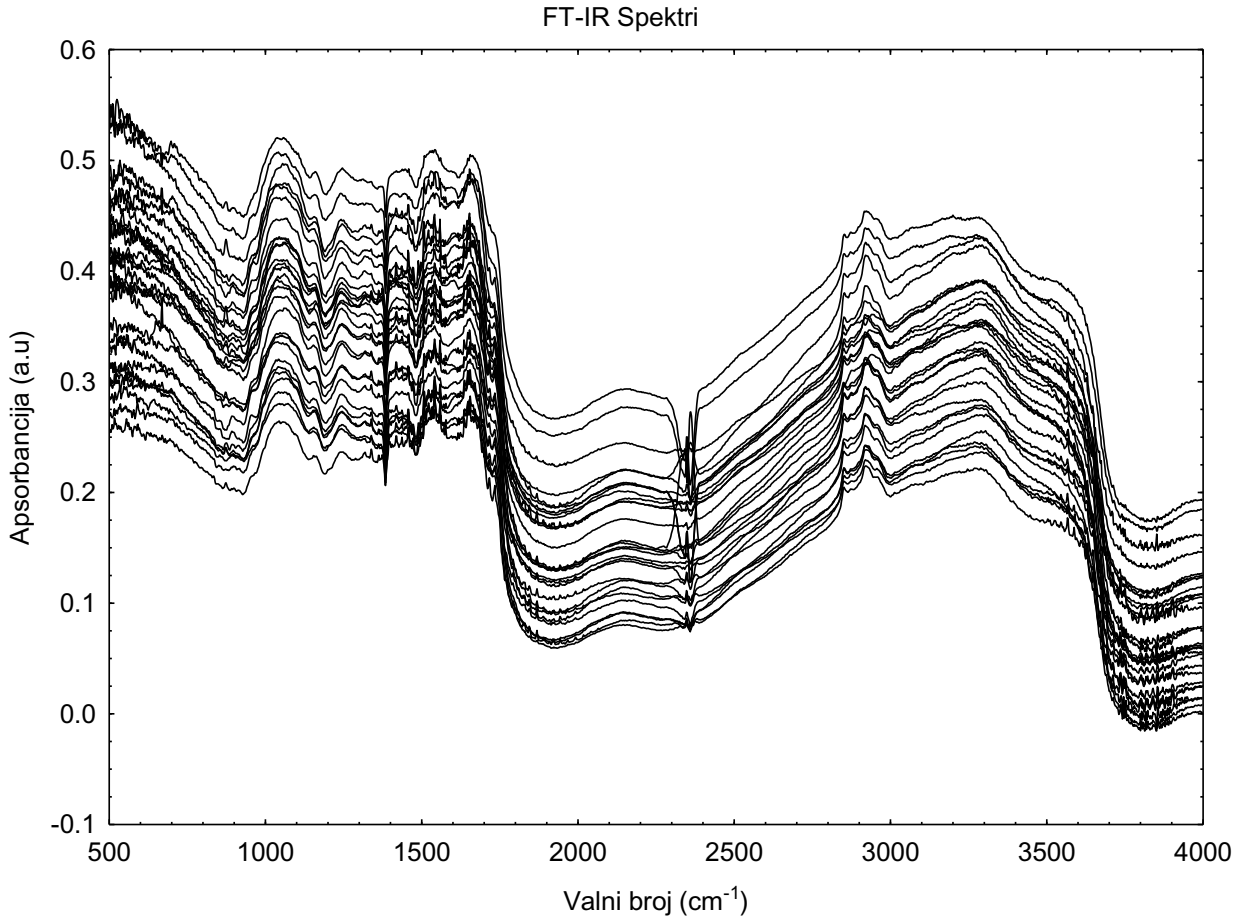
Slika 11. Ukupna antioksidativna aktivnost u uzorcima maslačka na neprometnim (NP) i prometnim lokacijama (P) izmjerena FRAP (a) i iRAC metodom (b). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su T-testom. Zvjezdica (*) označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$).

4.5. Analiza glavnih komponenata

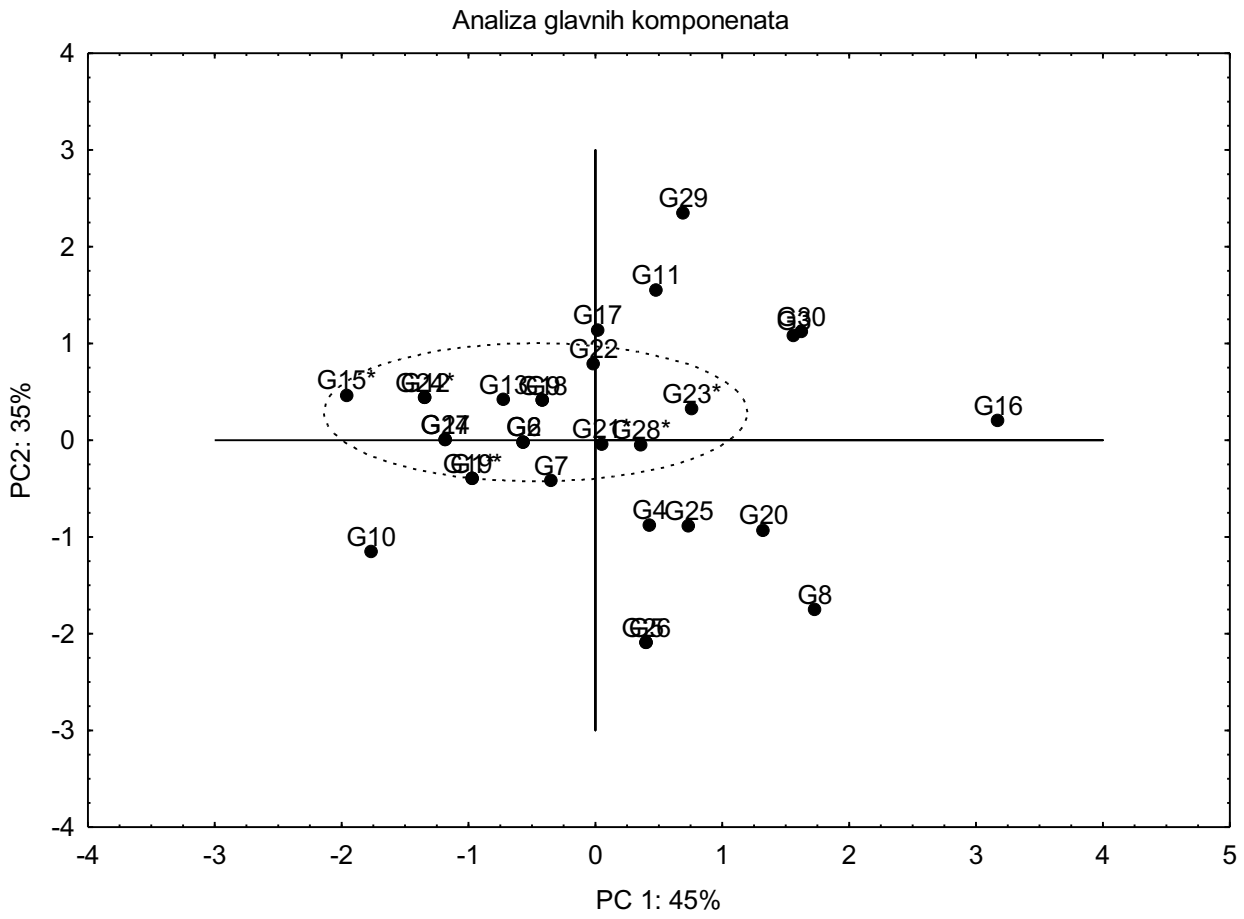
Analiza glavnih komponenata učinjena je na podatkovnoj matrici koja se sastojala od vrijednosti odabranih apsorpcijskih maksimuma, a ne na kompletnim spektrima snimljenim u rasponu od (500-4000 cm^{-1}). Spektri pokazuju karakteristične vrpce funkcionalnih skupina, pri određenim valnim brojevima, pri čemu je na apscisi valni broj (cm^{-1}), a na ordinati apsorbancija (***slika 12***). Maksimum smješten oko 3295 cm^{-1} predstavlja N-H vibracije istezanja (područje proteina). Maksimumi koji se nalaze u rasponu od 3000 do 2800 cm^{-1} uglavnom predstavljaju C-H vibracije istezanja koje potječu od lipida. Vrpca koja odgovara amidima I i amidima II smještena je između 1700 i 1500 cm^{-1}, dok se područje „otiska prsta“ (engl. *fingerprint region*) nalazi u području između 1500 i 1000 cm^{-1}.

Podatkovna matrica na koju je primijenjena metoda analize glavnih komponenata sastojala se od 7 varijabli, točnije apsorpcijskih maksimuma koji su se kretali oko sljedećih vrijednosti: 900 cm^{-1}, 1160 cm^{-1}, 1240 cm^{-1}, 1540 cm^{-1}, 1660 cm^{-1}, 2930 cm^{-1} i 3300 cm^{-1} i 30 redaka (broj prikupljenih uzoraka). U prvoj fazi analiza glavnih komponenata učinjena je nad cjelokupnom matricom podataka, nakon čega je utvrđeno da je postotak varijance objašnjen prvom i drugom komponentom nizak (cca 44%). U cilju smanjenja broja varijabli i određivanju onih koje imaju

veći utjecaj pristupilo se jednoj od metoda rotacija faktora (varimax) poslije čega se pokazalo da najveći utjecaj na podatke imaju vrijednosti pomaka spektara pri sljedećim maksimumima: 900 cm^{-1}, 1240 cm^{-1}, 2930 cm^{-1}, stoga su za konačnu analizu upotrijebljene navedene vrijednosti. Rezultat primijenjene analize glavnih komponenata prikazani su uz pomoć dvije glavne komponente (engl. *Principal Components* - PCs) (***slika 13***).



Slika 12. Prikaz FTIR spektra u rasponu od 500 do 4000 cm^{-1}.



Slika 13. Rezultati analize glavnih komponenata.

Vidljivo da prve dvije glavne komponente sadrže velik dio (80%) informacije, što je dovoljno za uspješnu interpretaciju podataka. Iz prikaza je vidljivo da su se ne prometne lokacije svrstale u zaseban roj (engl. *Cluster*) (obilježeno elipsom).

5. RASPRAVA

Maslačak (*Taraxacum officinale* Weber) je široko rasprostranjen bioindikator zagađenih staništa pa je idealan za proučavanje akumulacije antropogenih zagađenja [18]. Zagađivala stvaraju slobodne radikale unutar biljke kao posljedica oksidativnog stresa što dovodi do oštećenja raznih dijelova biljaka. Antioksidativne tvari i enzimi služe za obranu biljke od štetnog djelovanja zagađivača [8].

Reaktivne kisikove vrste (ROS) kod biljaka stvaraju se u mitohondrijima, kloroplastima i peroksisomima. Regulaciju stvaranja i uklanjanja ROS-a regulira antioksidativni obrambeni mehanizam kod biljaka. Antioksidansi sprečavaju oksidaciju drugih molekula. Uz pomoć NDPH biljke u citoplazmi, kloroplastu i stromi stvaraju antioksidanse poput AA koji međusobno djeluju s različitim molekulama i imaju utjecaj na rast i razvoj biljaka. Biljke također imaju sposobnost proizvodnje sekundarnih metabolita kao što su: alkaloidi, fenoli i karotenoidi. Njihova je uloga uklanjanje ROS-a [8]. Stvaranje ROS-a također može uzrokovati peroksidaciju lipida, oksidaciju ugljikohidrata i proteina, oštećenja DNA i RNA [2]. Povećana enzimska i ne enzimska aktivnost javlja se kod biljaka izloženijim antropogenim zagađivalima. Upravo tim povećanjem biljka bolje podnosi stres izazvan zagađenjem zraka i tla.

Rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da je došlo do značajnog smanjenja koncentracije fotosintetskih pigmenata biljaka prikupljenih na prometnim lokacijama u odnosu na lokacije koje nisu bile izložene utjecaju prometa. Zagađivači poput SO_2, NO_2, O_3 uzrokuju oštećenje membrana i raznih molekula, kao što je i klorofil. Također isti rezultati smanjenja sadržaja klorofila kod maslačka dobiveni su i u radovima provedenim od strane Bretzel i sur. (2013) [3]. Klorofil, glavni fotosintetski pigmenti, utječe na rast i razvoj biomase kod biljaka, a do smanjenja koncentracije može doći zbog prisutnosti velikih količina SO_2 u zraku [31]. Karotenoidi djeluju kao pomoćni pigmenti kod viših biljaka i igraju važnu ulogu u procesu fotosinteze [32]. Također imaju bitnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa kod biljaka [8]. U ovome istraživanju dobiveni rezultati ukazuju na smanjenje koncentracije karotenoida na prometnim područjima u odnosu na lokacije koje nisu bile izložene utjecaju prometa. U radu Chauhana i sur. (2009) [32] pokazno je da dolazi do smanjenja koncentracije karotenoida kada su biljke pšenice i gorušice bile izložene utjecaju SO_2 i NO_x koji potječu od zagađenja zraka. To nam ukazuje da antropogeni utjecaj ima veliku ulogu u promjeni koncentracije fotosintetskih

pigmenata, kao što su klorofil i karotenoidi. Smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata dovodi do smanjenja fotosintetske aktivnosti biljaka [32].

Antropogena zagađivala, kao što je promet, utječu na sadržaj proteina u biljkama. Rezultati ovog rada ukazuju na promjene u koncentraciji proteina. Koncentracija proteina smanjuje se pod utjecajem onečišćenja u uzorcima maslačka prikupljenim na lokacijama izloženim utjecaju prometa. Do istog rezultata u svome istraživanju na maslačku došli su Paun i sur. (2015) [9].

Polifenoli su jedna od najaktivnijih skupina antioksidansa [1] i imaju važnu ulogu u redoks reakcijama i neutralizaciji ROS-a [2]. Dobiveni rezultati nam pokazuju da promet ima veliki utjecaj na smanjenje sadržaja ukupnih polifenola u odnosu na područja koja nisu zahvaćena prometom. Istraživanje provedeno od strane Maslennikov i sur. (2018) [2] na 22 vrste drvenastih i zeljastih biljaka u koje spada i maslačak, pokazalo je da dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih polifenola. Zaštitne funkcije fenola kod biljaka su: sposobnost pročišćavanja slobodnih radikala i kompleksiranja s ionima teških metala, čime dolazi do blokade njihove katalitičke aktivnosti. Služeći kao akceptori slobodnih radikala, polifenoli mogu ugasiti lančane reakcije slobodnih radikala. Stoga se promjene koncentracije fenola mogu odraziti ne samo na antioksidacijski status biljne stanice, već i na njegov redoks potencijal koji omogućava održavanje respiratorne aktivnosti na određenoj razini [2].

Askorbinska kiselina prirodni je antioksidans, koji pomaže biljkama u toleranciji na zagađenje [32]. Jedna od najvažnijih uloga kod biljaka joj je kontrola rasta i razvoja u stresnom stanju [8]. Sadržaj askorbinske kiseline se smanjio pod djelovanjem antropogenih zagađivala što je vidljivo iz rezultata ovog rada. To smanjenje sadržaja izazvano je povećanom proizvodnjom ROS-a [31], što dovodi do poremećaja u rastu i razvoju biljke. Rezultati dobiveni istraživanjem Chauhan i sur. (2010) [32] na biljkama gorušice i pšenice također ukazuju na smanjenje sadržaja askorbinske kiseline kod ovih vrsta.

Obje metode, FRAP i iRAC, za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti pokazale su iste rezultate. Kako askorbinska kiselina, polifenoli, proteini, klorofil i karotenoidi imaju bitnu ulogu za ukupnu antioksidativnu aktivnost, došlo je do smanjenja ukupne antioksidativne aktivnosti uzoraka prikupljenih na prometnim lokacijama u odnosu na uzorke koji su bili prikupljeni na lokacijama kod kojih nema nikakvog djelovanja prometa. Iz rezultata dobivenih ovim metodama može se zaključiti da antropogena zagađivala igraju značajnu ulogu u smanjenju

ukupne antioksidativne aktivnosti kod maslačka [2], a samim time dolazi i do smanjena sadržaja određenih komponenti antioksidativnog sustava.

Infracrvenom spektroskopijom može se odrediti koliko su stanice ili tkiva oštećene, također ona može dati biokemijske informacije uzoraka bez njihova uništavanja. FTIR je jedna od tehnika koja služi za identifikaciju kemijskih spojeva i određivanje njihovih struktura. Određivanjem funkcijskih skupina, vrste veza i konformacije, FTIR spektroskopijom dobivamo informacije o strukturi samih molekula . Spektralne vrpce karakteristične su za pojedine molekule i daju nam informacije o biokemijskom sastavu. Infracrvena spektroskopija moćna je tehnika za proučavanje strukture molekula i interakcija među molekulama [33].

Kemometričke metode (PCA, PCR, klaster analiza, itd.) često su korištene u obradi kemijskih podataka [28]. U ovom radu upotrijebili smo PCA analizu kako bi otkrili postojanje mogućih razlika među prikupljenim uzorcima i kako bi matematičkim putem potvrdili rezultate dobivene kemijskim analizama. Podatkovne matrice kemijskih mjerenja sastoje se velikog broja podataka, kao što je i slučaj u ovome radu, gdje su snimljeni apsorpcijski spektri 30 uzoraka maslačka u rasponu od 500 do 4000 cm^{-1}. Na taj način dobivene je matrica dimenzija 1816 x 30. Kako bi matricu podataka učinili pogodnom za primjenu metode PCA, izvorna je matrica promijenjena na način da su za daljnji račun umjesto kompletnih spektara upotrijebljene vrijednosti najizraženijih apsorpcijskih maksimuma, točnije njihovi pomaci. Rezultati dobiveni PCA analizom prikazani na ***slici 13*** ukazuju na određeno grupiranje uzoraka koji nisu izloženi prometu (prikazani unutar elipse na ***slici 13***) od ostatka uzoraka koji su bili izloženi utjecaju prometa. Odabir apsorpcijskih maksimuma u odnosu na cijeli apsorpcijski spektar skratio je i pojednostavio vrijeme matematičke obrade čime je ujedno izbjegnuta i velika pogreška zbog dijelova apsorpcijskih spektara koji u sebi ne sadrže maksimume ili su oni ne jasno izraženi. Važno je istaknuti da ovakva primjena kemometričkih metoda na podatke dobivene FTIR spektroskopijom uz neku jednostavniju i bržu metodu kemijske analize daje mogućnost brzog uvida u stanje uzoraka u odnosu na metode koje koriste izučavanje samih pojedinačnih spektara. Jedna od najčešće korištenih multivarijantnih metoda (PCA) primijenjena na vrijednosti odabranih apsorpcijskih maksimuma u ovom je slučaju poslužila kao matematički dokaz rezultatima dobivenim biokemijskim analizama.

6. ZAKLJUČAK

Djelovanje antropogenih zagađivala izazvalo je smanjenje sadržaja ukupnih polifenola, askorbinske kiseline, kao i koncentracije proteina, klorofila i karotenoida, što je dovelo do smanjenja ukupne antioksidativne aktivnosti maslačka. Razlike u uzorcima maslačaka s obzirom na promatrane lokacije potvrđene su dodatno, primjenom metode glavnih komponenata na vrijednosti najizraženijih apsorpcijskih maksimuma FT-IR spektara. Ovo istraživanje potvrdilo je da je maslačak dobar bioindikator zagađenja nastalog antropogenim djelovanjem te da je osjetljiv na stres u okolišu.

7. LITERATURA

[1] G. Vanni, R. Cardelli, F. Marchini, A. Saviozzi, L. Guidi, Pol. J. Environ. Stud. **24** (2015), 1-15.

[2] P. Maslennikov, G. Chupakhina, L. Skrypnik, P. Feduraev, A. Мельник, Russian Journal of Ecology. **49** (2018), 384–394.

[3] F. Bretzel, S. Benvenuti, L. Pistelli, Environ Sci Pollut Res. **21** (2014), 2325–2333.

[4] Lj. Grlić, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb, 1990.

[5] M Ligocki, Z. Tarasewicz, A. Zygmunt, M. Anisko, Acta Sci. Pol. Zootech. **10** (2011), 73-82.

[6] M. Meštrov, Socijalna ekologija. **9** (2000), str. 267-273.

[7] T. Sofilić, Zdravlje i okoliš Sisak: Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015

[8] N. Arif, V. Yadav, S. Singh, B. Kushwaha, S. Singh, T. Tripathi, K. Vishwakarma, S. Sharma, N. Dubey, D. Chauhan, Plant Responses to Xenobiotics, Springer, Singapore, (2016).

[9] A. Păun, A. Neagoe, M. Păun, I. Baciu, V. Iordache, Pol. J. Environ. Stud. **24**, (2015), 1219–1234.

[10] Ž. Bajan, "Oksidacijski stres u biljkama duhana (Nicotiana tabacum L.) izloženim nanočesticama srebra." Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2017.

[11] M. B. Davies, J. Austin, D. A. Partridge, Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.

[12] https://hr.betweenmates.com/difference-between-ascorbic-acid (21. 4. 2020.)

[13] J. M. Berg, S. L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[14] https://www.atascientific.com.au/3-protein-analysis-techniques/ (26. 5. 2020)

[15] https://hr.stareyesforever.com/obrazovanie/84518-molekulyarnaya-i-strukturnayaformula-fenola.html (4. 4. 2020.)

[16] L. B. Radomska, J. Harasym, Food Quality and Safety. **2** (2018), 69-74.

[17] G. A. Armstrong, J. E. Hearst, Genetics and molecular biology of carotenoid pigment. **10** (1966), 228-237.

[18] http://www.inpharma.hr/index.php/news/18/18/Pozitivan-utjecaj-karotenoida-na-izgled-i-strukturu-koze (13. 5. 2020.)

[19] https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/chlorophyll-chlorophyllin (16. 08. 2020.)

[20] https://www.britannica.com/science/chlorophyll (16. 08. 2020.)

[21] https://www.researchgate.net/figure/The-molecular-structure-of-A-chlorophyll-a-and-B-chlorophyll-b-Source-Chen-M-and_fig16_317923316 (16. 08. 2020.)

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

[23] M. M. Bradford, Analytical Biochemistry. **72** (1976), 248-254.

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

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

[26] I. F. F. Benzie, J. J. Strain, Methods in Enzymology. **299** (1999), 15-27.

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

[28] M. Pecina, Metode multivarijantne analize Zagreb (2006), str. 7-12

[29] B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, 1998.

[30] T. Durak, J. Depciuchb, Environmental and Experimental Botany. **169** (2020), 1-13.

[31] A. P. Deepalakshmi, Toxicology and Food Technology. **3** (2013), 10-14.

[32] A. Chauhan, P. C. Joshi, N. Joshi, N. Y. Sci. J.. 3. **29** (2009), 398–404

[33] M. Baseri, S. Baker, ROMANIAN J. BIOPHYS. **21** (2011), 277–284

8. DODACI

8.1 Popis kratica

NH_3	amonijak
CO_2	ugljikov dioksid
CH_4	metan
HCl	klorovodik
PUA	policiklički aromatski ugljikovodici
POP	postojani organski spojevi
NO_x	dušikovi oksidi
SO_x	sumporovi oksidi
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kisikove jedinke (engl. *reactive oxygen species*)
AA	askorbinska kiselina (engl. *ascorbic acid*)
$C_6H_8O_6$	vitamin C
C_6H_5OH	fenol
$C_{40}H_{56}$	karotenoidi
P	prometna područja
NP	neprometna područja
$Mg(HCO_3)_2$	magnezijev hidrogenkarbonat
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*
Fe III TPTZ	železov 2,4,6-tripiridil-s-tirozin
$FeCl_3x6H_2O$	železov klorid heksahidrat
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroamn-2-karbonska kiselina
SD	standardna devijacija
PCA	analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Components Analysis*)
PCR	regresijska analiza nad glavnim komponentama (engl. *Principal Component Regression*)
PC	engl. *Principal components*
RNA	ribonukleinska kiselina
SO_2	sumporov (IV) oksid
NO_2	dušikov (IV) oksid
O_3	ozon
FTIR	engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Denis Boršćak
Datum i mjesto rođenja	02. 04. 1995., Koprivnica
Adresa	Ulica braće Malančec 18, 48000 Koprivnica
e-mail	borscak.denis@gmail.com
Obrazovanje	
2018. - 2020.	**Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer** Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2014. - 2018.	**Preddiplomski sveučilišni studij kemije** Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Peroksidacija lipida: metode mjerenja mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić
2010. - 2014.	Gimnazija Fran Galović, Koprivnica (Opća gimnazija)
Radno iskustvo	
Lipanj 2014. – Srpanj 2014. Listopad 2017. – Studeni 2017.	Studentski posao u skladištu, Carlsberg Croatia d.o.o., Koprivnica
Rujan 2017. – Rujan 2017.	Studentski posao u službi ljudski potencijala, Carlsberg Croatia d.o.o., Koprivnica
Studeni 2017. – Prosinac 2017.	Studentski posao u službi osiguranja kvalitete (laboratorij), Carlsberg Croatia d.o.o., Koprivnica
Osobne vještine	
Materinski jezik	hrvatski
Strani jezici	engleski – aktivno u govoru i pismu njemački – pasivno u govoru i pismu
Računalne vještine	Odlično snalaženje pri radu na računalu, poznavanje i aktivno korištenje MS Office programskog paketa
Vozačka dozvola	B kategorija