

Utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost kukuruza (*Zea mays*, L.)

Malović, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:182:959356>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Marta Malović

**Utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost
kukuruza (*Zea mays*, L.)**

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Marta Malović

**Utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost
kukuruza (*Zea mays*, L.)**

Diplomski rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
Komentor: dr. sc. Vlatko Galić, znanstveni suradnik
Neposredna voditeljica: izv. prof. dr. sc. Lidija Begović

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

**UTJECAJ KADMIJA NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST KUKURUZA
(*Zea mays*, L.)**

Marta Malović

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentor: dr. sc. Vlatko Galić, znanstveni suradnik

Neposredna voditeljica: izv. prof. dr. sc. Lidija Begović

Sažetak:

Kukuruz (*Zea mays*, L.) je jednogodišnja vrsta žitarica prilagođena na različite vrste tla. Osim što je nutritivno vrijedan, kukuruz obogaćuju brojni fitokemijski spojevi, zbog kojih posjeduje snažna antioksidativna svojstva. Antioksidativni mehanizmi u kukuruzu, su u ovom radu, promatrani kao obrambeni mehanizmi. Kadmij je toksični metal koji, akumuliranjem u biljke, izaziva, ne samo abnormalnosti u rastu i razvoju biljke, već utječe i na njihova antioksidativna i druga svojstva. U ovom radu istraživan je utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost dviju linija (84-28A i OS 942) kukuruza (*Zea mays*, L.) te njihova hibrida (OS 404). Uočeno je povećanje koncentracije proteina u biljkama tretiranim s koncentracijom kadmija od 150 $\mu\text{mol/L}$, dok su isti uzorci pokazali smanjenje sadržaja polifenola. Obje su linije kukuruza pokazale povećanje ukupne antioksidativne aktivnosti nakon tretmana s koncentracijom kadmija od 375 $\mu\text{mol/L}$, dok je u ostalim slučajevima antioksidativna aktivnost bila smanjena. Dobiveni rezultati upućuju na to da kadmij uvelike ima utjecaj na antioksidativnu aktivnost kukuruza (*Zea mays*, L.).

Diplomski rad obuhvaća: 50 stranica, 15 slika, 1 tablica, 56 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kadmij, kukuruz, antioksidativna aktivnost, radikali, antioksidansi

Rad prihvaćen: 26.09.2023.

Datum obrane: 10.10.2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. dr. sc. Vlatko Galić, znanstveni suradnik, član
4. izv. prof. dr. sc. Lidija Begović, zamjena člana

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD**Master Thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Chemistry****Graduate Study of Chemistry****Scientific Area: Natural Sciences****Scientific Field: Chemistry****THE INFLUENCE OF CADMIUM ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
MAIZE (*Zea mays*, L.)****Marta Malović****Thesis completed at:** Department of Chemistry, J. J. Strossmayer University of Osijek**Supervisor:** Martina Šrajer Gajdošik, Associate Prof., PhD**Co-Supervisor:** Vlatko Galić, PhD**Principal investigator:** Lidija Begović, Associate Prof., PhD**Abstract:**

Maize (*Zea mays*, L.) is an annual grain, adapted to different types of soil. Besides being nutritionally valuable, maize is also very rich in phytochemical compounds and therefore having strong antioxidant properties. Antioxidant mechanisms in maize, in this paper, were observed as defense mechanisms. Cadmium is a toxic metal which, when accumulated in plants, causes not only abnormalities in plant growth and development, but also impacts their antioxidant and other properties. The influence of cadmium on the antioxidant activity of two maize (*Zea mays*, L.) lines (84-28A i OS 942) and their hybrid (OS 404) was investigated in this study. The increase in protein concentration in plants treated with cadmium concentration of 150 $\mu\text{mol/L}$ was observed, while the same samples showed a decrease in polyphenol content. Both maize lines showed an increase in total antioxidant activity when treated with cadmium concentration of 375 $\mu\text{mol/L}$. Total antioxidant activity was decreased in other samples of maize. The obtained results indicate that cadmium has a great influence on the antioxidant activity of maize.

Thesis includes: 50 pages, 15 figures, 1 table, 56 references**Original in:** Croatian**Keywords:** cadmium, maize, antioxidant activity, radicals, antioxidants**Thesis accepted:** 26.09.2023.**Thesis defence:** 10.10.2023.**Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Vlatka Gvozdić, Ph. D., chair
2. Assoc. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, Ph. D., supervisor and member
3. Vlatko Galić, PhD, co-supervisor and member
4. Assoc. Prof. Lidija Begović, PhD, alternate member

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

Zahvale

Želim se zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Šrajer Gajdošik na pomoći, razumijevanju i strpljenju tijekom izrade mojeg diplomskog rada. Hvala Vam što ste mi približili biokemiju srcu i pomogli mi da se u tome pronađem.

Hvala izv. prof. dr. sc. Lidiji Begović na pomoći u labosu kad je bila najpotrebnija, te komentoru dr. sc. Vlatku Galiću na uzgojenim biljkama jer bez njih ništa dalje ne bi bilo moguće. Hvala svima na danim savjetima, prenesenom znanju i pruženom iskustvu.

Hvala mojoj prijateljici Mateji što je svaki studentski dan ispunila smijehom, šalama i kavom.

Hvala mom dečku Danielu koji je bio i ostao moj fan broj 1. Hvala što si vjerovao u mene svaki put kad ja nisam, nasmijao me svaki put kad je bilo najteže i pomogao da ovo studiranje privedem kraju.

Na kraju, želim se od srca zahvaliti svojim roditeljima na osobnom odricanju kako bih ja mogla slijediti svoje snove. Hvala Vam što me nikad niste zaustavljali na mom putu, već što ste mi dali jaki vjetar u leđa i pružili bezuvjetnu ljubav. Hvala mom bratu i sestri koji su me uvijek dočekali doma sa srećom u očima i navijali za mene. Hvala i teti i tetku, bakama i djedovima, na svim mogućim oblicima pomoći i podrške koju ste mi pružili tijekom studentskih dana. Hvala Vam!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Antioksidansi	2
2.1.1. Enzimatski antioksidansi	3
2.1.2. Neenzimatski antioksidansi	6
2.2. Kadmij	12
2.2.1. Kadmij u okolišu	12
2.2.2. Štetni utjecaj kadmija na biljke	15
2.3. Utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost	18
2.4. Kukuruz i njegova svojstva	20
2.4.1. Nutritivne vrijednosti kukuruza	21
2.4.2. Antioksidativna aktivnost kukuruza	21
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Ispitivani materijal	23
3.2. Kemikalije	23
3.3. Biljni materijal i uzgoj	24
3.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	25
3.5. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola	25
3.6. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	26
3.6.1. DPPH metoda	26
3.6.2. FRAP metoda	26
3.7. Ekstrakcija i određivanje prolina	27
3.8. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI	29
4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	29
4.2. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola	30
4.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	31
4.3.1. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti DPPH metodom	31
4.3.2. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	32
4.4. Ekstrakcija i određivanje prolina	33
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČAK	39
7. LITERATURA	40
8. ŽIVOTOPIS AUTORA	44

1. UVOD

Prooksidansi su tvari koje uzrokuju oksidativni stres formiranjem ROS-a ili inhibiranjem sustava antioksidansa. Oksidativni stres je definiran kao ravnotežni pomak između prooksidansa i antioksidansa na stranu prooksidansa. Uklanjaju ih antioksidansi na način koji nije štetan za stanicu. Antioksidativne tvari hvataju i neutraliziraju slobodne radikale, a najčešće se dijele na enzimatske i neenzimatske. U 12. skupini periodnog sustava elemenata nalazi se kadmij. Do trovanja kadmijem uglavnom dolazi prilikom udisanja njegovih para ili prašine. Iako rijedak element, smatra se najotrovnijim teškim metalom za živa bića i okoliš. Bioraspoloživost i toksičnost kadmija određuju fizikalne i kemijske karakteristike tla. Biljke različito akumuliraju kadmij prilikom čega dolazi do nastanka promjena u njihovim stanicama i staničnim funkcijama. Kukuruz (*Zea mays*, L.) je biljka prilagođena na različita tla te uvjete okoliša i klime. Svi se njeni dijelovi koriste u različite svrhe, prvenstveno zbog kvalitetnih nutritivnih vrijednosti. Fitokemijski spojevi su važne komponente gotovo svih dijelova kukuruza, zbog čega je ova žitarica često korištena u farmaceutskoj industriji. Fitokemikalije omogućuju biljkama antiradikalska i redukcijska svojstva. Kukuruz je brzorastuća biljka velike biomase zbog čega je često korišten biljni materijal za istraživanje utjecaja teških metala. Dosadašnja istraživanja su pokazala da kadmij u kukuruзу usporava rast biljke i oštećuje kloroplaste, dok su listovi biljke pokazali određenu otpornost na utjecaj kadmija.

Cilj ovog istraživanja je bio istražiti utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost kukuruza (*Zea mays*, L.) na dvjema različitim samooplodnim linijama kukuruza (OS84-28A i OS942) te na njihovom hibridu (OS404).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Antioksidansi

Oksidativni metabolizam u ljudskom tijelu rezultira nastankom slobodnih radikala. Slobodni radikali imaju sposobnost modificiranja organizmu bitnih molekula, kao što su DNA molekule, lipidi i proteini. Modifikacije rezultiraju promjenama u funkcijama navedenih molekula. Te se promjene nazivaju oksidativnim oštećenjima. Antioksidativni sustav u ljudskom tijelu je složen i sastavljen od mnogobrojnih različitih unutarstaničnih i izvanstaničnih, endogenih i egzogenih komponenti koje mogu biti topljive u vodi ili lipidima. Navedene komponente zajedničkim djelovanjem sprječavaju nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i prekidaju lančane reakcije peroksidacije bioloških tvari inicirane reaktivnim kisikovim vrstama [1]. ROS se stvaraju u određenim koncentracijama zbog njihove uloge u odvijanju regularnih fizioloških procesa kao što su fagocitoza, stvaranje energije, intermolekularna komunikacija i dr. U stanicama ROS mogu biti u obliku slobodnih radikala i neradikala. Slobodnim radikalima se smatraju superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), alkoksi radikal ($RO\cdot$) i peroksilni radikal ($ROO\cdot$). Primjeri neradikala su vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik (1O_2) i ozon (O_3). Neradikali koji nastaju u biljkama su hidroperoksid ($ROOH$), hipoklorna kiselina ($HOCl$), didušikov tetroksid (N_2O_4), dušikasta kiselina (HNO_2) i dr. [2].

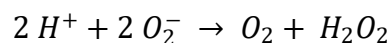
Antioksidansi su tvari koje uklanjaju prooksidanse pri čemu nastaju netoksični produkti koji neće oštetiti stanicu. Prooksidansi su spojevi koji izazivaju oksidativni stres kroz formiranje ROS-a ili inhibicijom antioksidativnog sustava. Glavna funkcija antioksidansa je hvatanje i neutralizacija slobodnih radikala, a u nekim slučajevima služe za aktivaciju drugih molekula za obavljanje tih funkcija [1]. Osnovna podjela antioksidansa je na prirodne i sintetičke. Sintetički antioksidansi se dalje dijele na fenolne strukture i *nano*-antioksidanse. Primjeri fenolnih struktura su butilirani hidroksianizol (eng. *butylated hydroxyanisole*, BHA), butilirani hidroksitoluen (eng. *butylated hydroxytoluene*, BHT) i 2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-benzenediol (eng. *tert-butylhydroquinone*, TBHQ). Prirodni antioksidansi se najčešće dijele na enzimatske i neenzimatske antioksidanse [2].

Oksidativni stres se može definirati kao pomak u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa uzrokovan relativnim ili apsolutnim nedostatkom antioksidansa [1].

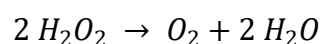
Drugim riječima, oksidativni stres je pomak u ravnoteži prooksidativnog i antioksidativnog sustava u korist sustava prooksidansa. Pomak ravnoteže se događa ukoliko je obrana antioksidativnog sustava oslabljena ili pak se slobodni radikali prekomjerno stvaraju [3]. Oksidativni stres se smatra jednim od glavnih uzročnika oštećenja normalnih funkcija stanica. Pomak ravnoteže u korist prooksidativnog sustava potiče razne nepoželjne oksidativne promjene u ključnim komponentama stanica, što može dovesti do gašenja staničnih funkcija pa time i do preranog starenja, invaliditeta i bolesti. Razvoj mnogobrojnih kroničnih bolesti kao što su koronarna bolest srca, demencija, moždani udar i rak, povezane su s dugotrajnim oksidativnim stresom [1]. Antioksidansi su dostupni iz prirodnih izvora poput raznovrsnog voća i povrća te pića. Kao takvi pomažu pri smanjivanju rizika od smrtonosnih koronarnih bolesti srca i sl. Studije provedene s epidemiološke strane i prikladne meta-analize pokazale su da konzumacija polifenola iz biljaka tijekom dužeg vremenskog perioda može zaštititi od opasnih bolesti, npr. dijabetesa, raka, osteoporoze pa i neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest [4]. Jestivo povrće i voće, začini i razno bilje, obogaćeno je fenolnim spojevima, karotenoidima te mikroelementima. Na antioksidativno djelovanje prirodnih izvora ovih spojeva utječu klima, uvjeti tla i vrijeme u kojem se odvija berba [2].

2.1.1. Enzimatski antioksidansi

Enzimatski antioksidansi su superoksid-dismutaza (eng. *superoxide dismutase*, SOD), katalaza (eng. *catalases*, CAT), glutation-peroksidaza (eng. *glutathione peroxidases*, GPX), askorbat-peroksidaza (eng. *ascorbate peroxidase*, APX) i glutation-reduktaza (eng. *glutathione reductase*, GR). SOD je enzim koji katalizira reakciju dismutacije superoksidnog radikala u molekularni kisik i H₂O₂ prema jednadžbi [5]:

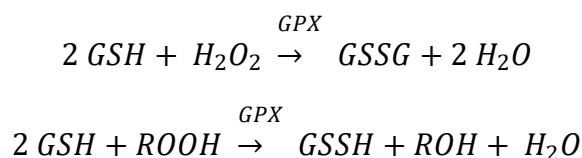


SOD je enzim koji u svom aktivnom mjestu sadrži ion bakra, cinka, mangana ili željeza. U kloroplastu, citosolu i peroksisomu stanica se nalazi Cu/Zn SOD oblik, dok se Mn-SOD nalazi u mitohondriju. Povećanje aktivnosti SOD-a ima važnu ulogu u smanjivanju oksidativnog stresa u biljkama i njihovu preživljavanju. Katalaze su tetramerični enzimi koji se uglavnom nalaze u peroksisomima stanica, sadrže hem te pretvaraju H₂O₂ u molekularni kisik i vodu prema jednadžbi [5]:



Katalaze (CAT) u biljkama su neophodne za neutralizaciju ROS-a, a dijele se u tri skupine. Prva skupina je lokalizirana u tkivima za fotosintezu i uklanja H₂O₂ koji nastaje prilikom fotosinteze. Druga skupina CAT-a nastaje u vaskularnim biljnim tkivima, a njihova je biološka uloga još uvijek nerazjašnjena. CAT iz biljaka treće skupine se nalaze u mladim biljkama i sjemenkama, a služe za uklanjanje suvišnog vodikovog peroksida koji nastaje tijekom razgradnje kiselina u glioksisomima. Povećana aktivnost CAT-a je osobina lako prilagodljivih biljaka koja uvelike pomaže smanjenju toksičnih količina vodikova peroksida [5].

GPX je enzim koji katalizira reakciju redukcije vodikova peroksida i citotoksičnih hidroperoksida u alkohole. Također, zaslužni su za uklanjanje produkata lipidne peroksidacije. Postoje tri vrste GPX: ovisne o seleniju, PHGPX (eng. *the nonselenium-dependent phospholipids hydroperoxide* GPX) i glutation-transferaze (eng. *glutathione transferases*, GST). GPX i GST enzimi imaju različite podjedinice, različite su prirode veza kojima je selenij vezan u aktivnom mjestu te imaju različite katalitičke mehanizme. GPX svojim mehanizmom djelovanja eliminiraju perokside za koje se smatra da su potencijalni supstrati za Fentonovu reakciju oksidacije. GPX djeluje zajedno s tripeptidom glutationom (GSH), koji je u stanicama prisutan u velikim količinama. Supstrati katalitičke reakcije su H₂O₂ ili organski peroksid (ROOH), pri čemu se peroksidi zgrađuju na vodu ili alkohol prema jednadžbi [5]:

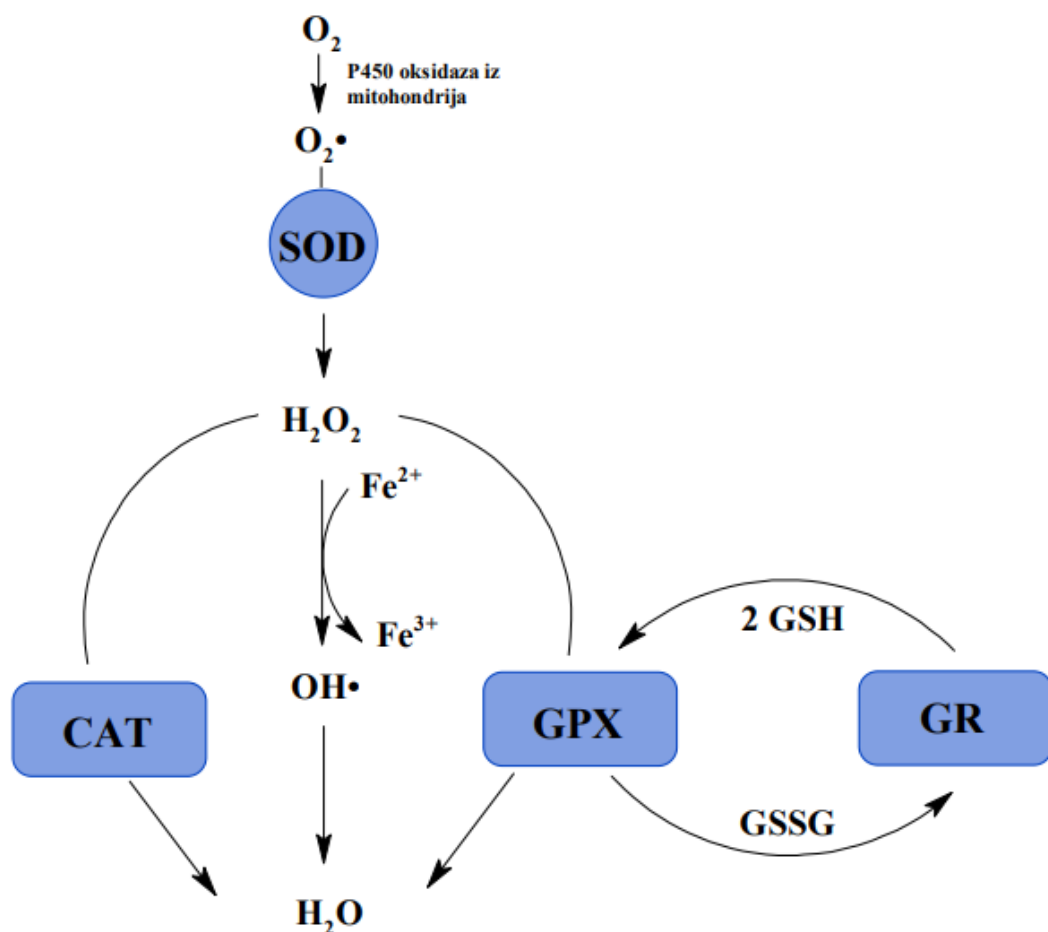


APX je enzim uključen u uklanjanje vodikova peroksida u askorbat-glutation ciklusu, a askorbat (AsA) je pritom donor elektrona. APX prevodi H₂O₂ u vodu, a dosad je poznato pet oblika APX-a. Poznati su vezani oblici APX-a na tilakoidima i mikrosomima te topljivi stromalni, citosolni i apoplastični APX enzimi. APX u kloroplastima je prilično nestabilan, s vremenom poluživota manjim od 30 sekundi bez prisutnosti AsA. Vrijeme poluživota APX oblika u citosolu je od 40 do 60 minuta. U usporedbi s CAT, APX ima veći afinitet za H₂O₂ pa se može reći da APX ima bitniju ulogu u uklanjanju ROS-a u uvjetima oksidativnog stresa [5].

GR je vrlo konzervirani enzim koji katalizira NADPH ovisnu reakciju disulfidne veze GSSG-a. Može se pronaći u stromi kloroplasta, mitohondriju, citosolu i

peroksisomima. Biljke uglavnom sadrže više oblika GR enzima, npr. grašak sadrži osam GR enzima. GR u pravilu katalizira zadnju reakciju askorbat-glutation puta. Povećana aktivnost GR-a povećava $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ omjer. Time je osigurana količina NADP^+ koji će primiti elektrone iz fotosintetskog lanca prijenosa elektrona. NADP^+ može minimizirati protok elektrona prema O_2 pa time i stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$ [5].

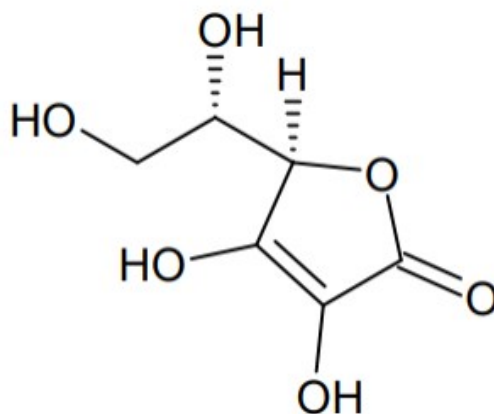
Mehanizam djelovanja antioksidansa može se objasniti na primjeru reakcije dismutacije H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$, a shematski je prikazan na slici 1. Najprije se $\text{O}_2^{\bullet-}$ dismutira u H_2O_2 pomoću SOD-a. Nastali H_2O_2 se dalje pretvara u oblik koji nije štetan, u vodu, pomoću CAT-a i GPX-a. GPX uzima vodikove atome iz dvije molekule GSH-a pri čemu nastaju dvije molekule vode i molekula GSSG-a. GSH se zatim regenerira iz GSSG pomoću GR-a. Uloga CAT-a je da neutralizira H_2O_2 izravno u H_2O . H_2O_2 se također može pretvoriti u visoko reaktivni OH^{\bullet} , a potom u H_2O , oksidacijom Fe^{2+} u Fe^{3+} [5].



Slika 1. Shematski prikaz mehanizma reakcije dismutacije H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$ enzimskim antioksidansima.

2.1.2. Neenzimatski antioksidansi

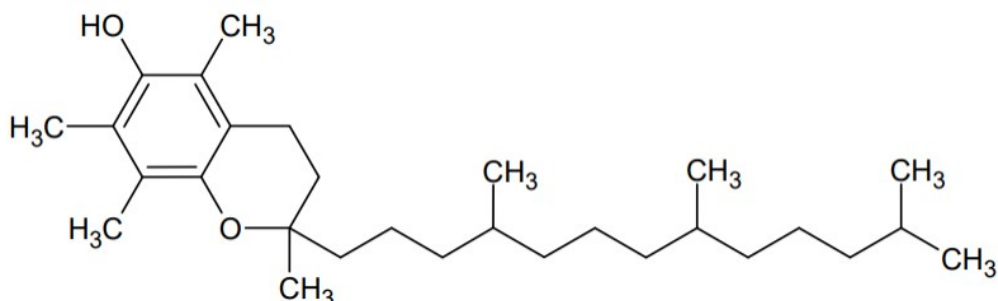
Neenzimatski antioksidansi su askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutation, karotenoidi i fenolni spojevi. Askorbinska kiselina (slika 2.) je najviše proučavani antioksidans i može ga se pronaći u većini biljnih stanica, organela i apoplasta. Reducirani oblik askorbinske kiseline je AsA, a najveće koncentracije AsA nalaze se u citosolu (20 mM) i stromi kloroplasta (20-300 mM). AsA utječe na aktivnosti drugih enzima, a u sinergiji s drugim antioksidansima, smanjuje nastalu oksidativnu štetu. Sinteza AsA se odvija u mitohondrijima i prenosi u druge dijelove stanica olakšanom difuzijom ili putem protonsko-elektrokemijskog gradijenta. Prekursor za sintezu AsA je D-glukoza, dok put biosinteze istog još nije razjašnjen. AsA utječe na fiziološke procese biljaka poput regulacije rasta, metabolizam i diferencijaciju. AsA također sudjeluje u obrambenom sustavu biljaka, a glavna mu je uloga zaštititi metaboličke procese od štetnog utjecaja vodikova peroksida i drugih derivata kisika. APX koristi dvije molekule AsA u ciklusu askorbat-glutation kako bi mogao prevesti H_2O_2 u molekule vode uz istovremeno stvaranje monodehidroaskorbata (MDA). MDA je slobodni radikal kratkog vijeka trajanja koji se raspada na dehidroaskorbat (DHA) i AsA ili se prevodi direktno u AsA [5].



Slika 2. Strukturna formula askorbinske kiseline.

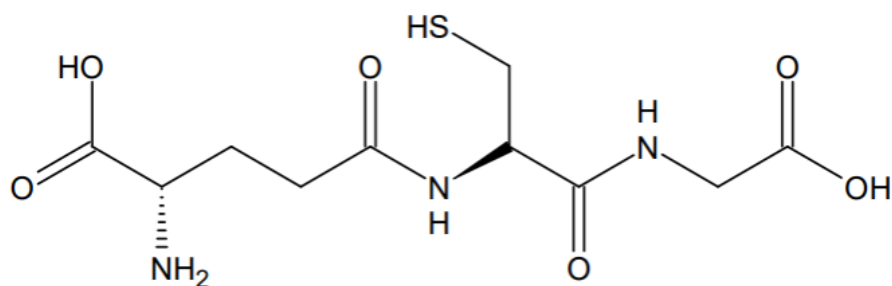
Tokoferoli su skupina antioksidativnih tvari koji se pronalaze u različitim dijelovima biljaka i algi. Četiri su poznata izomera tokoferola: α , β , γ i δ . Biološki najaktivniji su α -tokoferoli koji dominiraju u membranama kloroplasta. Glavna im je uloga zaštita od nastanka oksidativne štete. Procijenjeno je da jedna molekula α -tokoferola (vitamina E) ima sposobnost neutralizirati 120 molekula singletnog oblika kisika. Mehanizam djelovanja α -tokoferola se temelji na hvatanju lipidnih peroksi radikala, pritom nastaje

tokoferoksilni radikal koji ima mogućnost recikliranja u α -tokoferol u reakciji s npr. AsA. Vitamin E, čija je strukturna formula prikazana na slici 3., inhibira korak lančane propagacije u oksidaciji lipida [5].



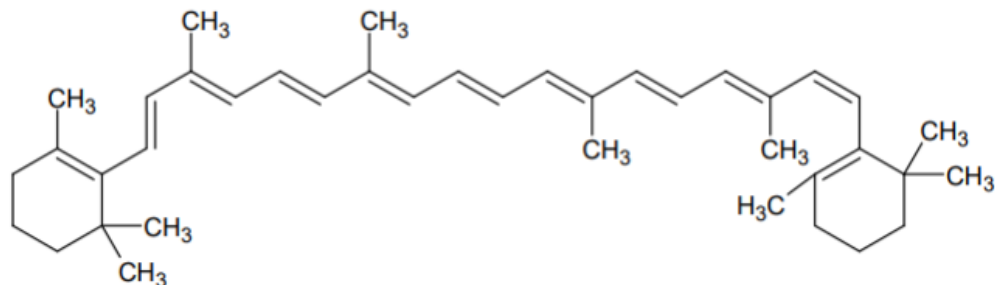
Slika 3. Strukturna formula α -tokoferola.

Glutation (GSH) je tripeptid prikazan na slici 4., koji se nalazi u citosolu, kloroplastima, endoplazmatskom retikulumu, mitohodrijima i vakuolama. Smatra se primarnim izvorom neproteinskih tiola u biljnim stanicama. Tiolna skupina GSH-a je kemijski vrlo reaktivna zbog čega je GSH kompatibilan za izvršavanje različitih funkcija u organizmima. Također, tiolna skupina je nukleofilne prirode što je važno u reakcijama s određenim elektrofilima. Većinom se javlja u reduciranom obliku (GSH), a najviše se koncentrira u kloroplastima (1-4 mM). Put biosinteze GSH je sličan u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Put se sastoji od dva koraka koja su ovisna o ATP-u, a reakcije su katalizirane γ -glutamylcistein sintetazom (eng. *γ -glutamylcysteine synthetase*, γ -ECS) i glutation sintetazom (GSHS). GSH, kao jedan od ključnih eliminatorsa ROS-a, djeluje kao antioksidans na nekoliko načina. Koristi se za redukciju DHA u ciklusu askorbat-glutation, a sam se pritom oksidira u GSSG, odnosno oksidirani oblik glutaciona. Regenerira se nazad u GSH, a ta je reakcija katalizirana glutation reduktazom. NADPH je redukcijska snaga reakcije regeneracije GSSG u GSH. Za visoki redukcijski potencijal GSH-a, odgovoran je središnji nukleofilni cisteinski ostatak. Kao takav, cisteinski ostatak uklanja citotoksični H_2O_2 te reagira s drugim ROS-om (singletnim kisikom, hidroksilnim radikalima i sl.) na neenzimski način [5].



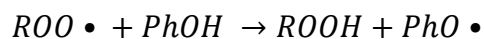
Slika 4. Strukturna formula glutationa.

Karotenoidi (eng. *carotenoids*, Car) su vrsta pigmenata koje sadrže biljke i mikroorganizmi. Poznato je više od 600 vrsta karotenoida. Antioksidativna svojstva karotenoida su posljedica sposobnosti konjugiranih dvostrukih veza da delokaliziraju nesparene elektrone koji su odgovorni za svojstvo β -karotena (slika 5.) da neutralizira singletni kisika bez razgrađivanja. Isto tako, β -karoten kemijski reagira sa slobodnim radikalima poput ROO^\bullet , O_2^\bullet i $^\bullet OH$. Karotenoidi, kada su prisutni u visokim količinama, mogu zaštititi lipide od nastanka oštećenja. Druge vrste karotenoida su α -karoten, lutein, likopen i zeoksantin [5].



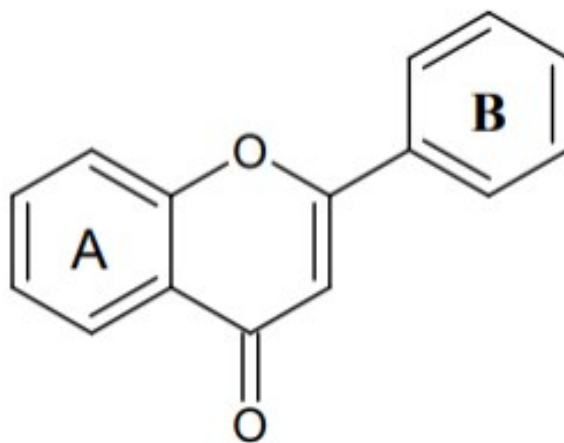
Slika 5. Strukturna formula β -karotena.

Fenoli su raznovrsni sekundarni metaboliti koji se nalaze u biljnim tkivima. Fenolni spojevi onemogućavaju oksidiranje lipida i drugih molekula doniranjem atoma vodika radikalima prema jednadžbi [5]:

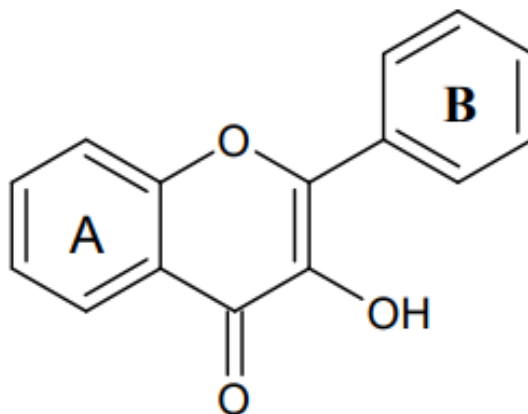


Međuprodukti reakcije (fenoksi radikali) su stabilni i ne iniciraju daljnje reakcije radikala, već prekidaju lančane reakcije. U uvjetima visoke koncentracije antioksidativnih fenola, aktivnih redoks metala (Fe, Cu) ili pri visokim pH vrijednostima, fenoli se ponašaju kao prooksidansi [1].

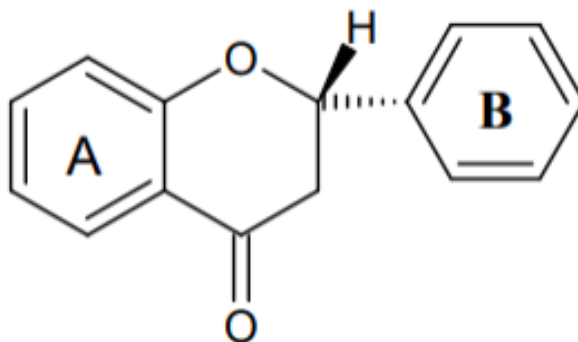
Polifenoli su najčešća skupina biljnih metabolita, a imaju snažno antioksidativno djelovanje jer posjeduju gotovo idealnu strukturnu građu za hvatanje slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost polifenolnih spojeva proizlazi iz činjenice da djeluju kao donori elektrona ili vodikovih atoma. Na taj način stabiliziraju slobodne radikale i sprječavaju oksidativna oštećenja. Polifenoli posjeduju sposobnost stabiliziranja i delokaliziranja nesparenih elektrona prisutnih u radikalima. Stabilizacija nesparenih elektrona uzrokuje prekid lančane reakcije slobodnih radikala. Polifenolni spojevi sprječavaju ione prijelaznih metala da sudjeluju u reakcijama i proizvode slobodne radikale reakcijom kelacije. Polifenoli se klasificiraju prema kemijskim strukturama, biološkim funkcijama i izvoru podrijetla. Najviše proučavana vrsta polifenola su flavonoidi koji mijenjaju kinetiku reakcije peroksidacije, modificiranjem poretka lipida i smanjenjem membranske fluidnosti. Takvim mehanizmom djelovanja, spriječena je difuzija slobodnih radikala i ograničene su reakcije peroksidacije. Flavonoidi u svojoj strukturi sadrže dva prstena, A i B, koji su zaslužni za njihova svojstva. Dijelev se u skupine prema stupnju hidroksilacije i različitim varijacijama u heterocikličkom prstenu C. Neke od skupina flavonoida su antocijanini, flavoni, flavanoni, flavonoli i flavanoli. Nadalje, postoje tzv. izoflavoni i neoflavonoidi, kod kojih B prsten nije vezan na uobičajeni C2 atom na prstenu C, već na C3 i C4 položaju istog. Ipak, najveću podskupinu polifenola čine flavoni i njihovi 3-hidroksi derivati (flavonoli) [5]. Na slikama 6., 7. i 8. su prikazane strukturne formule flavona, flavonola i flavanona.



Slika 6. Strukturna formula flavona.

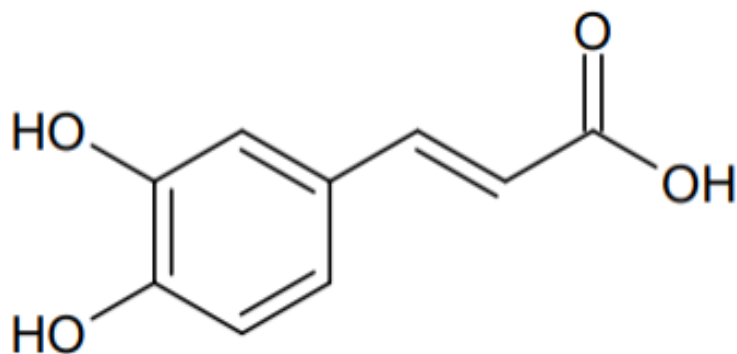


Slika 7. Strukturna formula flavonola.



Slika 8. Strukturna formula flavanona.

Neflavonoidni polifenoli su fenolne kiseline koje se dijele na derivate benzojeve i cimetne kiseline. Količina hidroksibenzojeve kiseline je niska, osim u crvenom luku, crnim rotkvicama i sl. Derivati cimetne kiseline se mogu pronaći gotovo svim vrstama i dijelovima voća, a njihova koncentracija se smanjuje tijekom faze zrenja, a povećava se tijekom rasta ploda. Hidroksicinaminske kiseline uglavnom ima više u biljkama nego hidroksibenzojeve. Derivati hidroksicinaminske kiseline su *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska i kofeinska kiselina. Navedene kiseline su rijetko u slobodnom obliku, osim kada se hrana koja ih sadrži podvrgne procesima poput fermentacije, zamrzavanja i sl. Najčešći derivatni oblik cimetne kiselina je kofeinska kiselina koja je prikazana na slici 9. [5].



Slika 9. Strukturna formula kofeinske kiseline.

Kada polifenoli imaju *N*-funktionalne supstituente nazivaju se polifenolnim amidima. Najčešće vrste polifenolnih amida su kapsaicinoidi (iz čili papričica) i amidi antranilne kiseline (iz zobi). Ostale vrste polifenola su tanini i vitamina A te lipoična kiselina. U različitim dijelovima biljaka mogu se pronaći različite tzv. fitokemikalije. Fitokemijski spojevi se definiraju kao bioaktivni spojevi bez značajnih nutritivnih vrijednosti, ali služe biljkama za npr. obranu od ekstremnih okolišnih uvjeta, klime ili pak grabežljivaca. Ipak, fitokemikalije dokazano imaju antimikrobna i antioksidativna svojstva zbog čega se intenzivno koriste u farmaceutskoj industriji. Naprimjer, zbog djelovanja flavonoida, biljke su manje osjetljivije na utjecaj insekata i mikroba, a životinje su zaštićene od brojnih bolesti. Pokazalo se da antocijanini imaju, uz antioksidativna i antiradikalna svojstva, i svojstva koja pomažu u prevenciji razvoja karcinoma, raznih upalnih stanja, pretilosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i raznih drugih medicinskih stanja. Vrsta polifenola, tzv. tanini, također su pokazali protuupalna, antioksidativna, antiradikalna te antimutagena svojstva [6].

2.2. Kadmij

Kadmij (Cd) je kemijski element cinkove ili 12. grupe u periodnom sustavu elemenata. Ovaj metal je srebrno bijele boje, mekoće poput kositra i emitira pucketanje kada se savija. Uz savijanje, može se i valjati u listiće. Temperatura taljenja je relativno niska (321,1 °C), a njegove pare su tamnožute boje i tada je kadmij jednoatomni. Kadmij se odlikuje stabilnošću na suhom zraku, dok je na vlažnom zraku obložen slojem oksida. Zapaljiv je pri zagrijavanju i lako se topi u mineralnim kiselinama. Otrovan je, a do trovanja dolazi uslijed udisanja para ili njegove prašine. Kadmij je smatran rijetkim elementom s obzirom na to da ga ima oko 0,2 grama po toni Zemljine kore. Prisutan je u nekim mineralima, ali i u drugim rudama, posebice cinkovim rudama, koje služe za proizvodnju kadmija kao nusprodukta. Cinkova ruda ili sfalerit se većim dijelom sastoji od cinkovog sulfida, dok kadmija ima 0,1-0,3 %. U prvom koraku proizvodnje cinka se cinkov sulfid prženjem prevodi u cinkov oksid, dok se kadmij nakuplja u dimovima. Dimne prašine se daljnjim koracima obrađuju sve do končanog proizvoda koji sadrži više od 99,9 % kadmija. Kako bi se željezo, bakar, čelik i druge slične legure zaštitile od korozije, galvaniziraju se kadmijem koji se dobiva na prethodno opisani način [7].

2.2.1. Kadmij u okolišu

Prisutnost otrovnih metala, čak i u tragovima, utječe na usjeve pa i na ljude i životinje [8]. Tla su obogaćena otrovnim metalima kao što su kadmij, olovo, arsen, živa, krom i nikal. Navedeni se metali prirodno nalaze u okolišu u malim koncentracijama. Kadmij se otpušta u okoliš putem prirodnih i antropogenih izvora. Rudarstvo, taljenje, primjena komercijalnih gnojiva i kanalizacijski mulj, samo su neke od ljudskih aktivnosti koje predstavljaju rizik za ekosustave. Šumski požari, erupcije vulkana, otpadne vode i starenje stijena, koje u svom sastavu sadrže kadmij, smatraju se prirodnim izvorima. Kadmij, kao najotrovniji teški metal živim bićima, je jedan od najvećih zagađivača okoliša zbog intenzivnog korištenja u industriji. Jedan je od neesencijalnih metala za koji nije poznata njegova fiziološka funkcija. Toksičnost za ljude je izrazito velika, naime kadmij je sedmi po redu od 20 najotrovnijih metala te se svrstava u 1. skupinu karcinogena. Kadmij se u ljudskom tijelu nakuplja u bubrezima gdje uzrokuje oštećenja bubrežnih kanalića i pridonosi stvaranju bubrežnih kamenaca. Kadmij je sličnog naboja i ionskog radijusa kao kalcij, zbog čega ga može zamijeniti u mineralima. Na taj se način lakše skladišti u ljudskom tijelu. Trovanje kadmijem uzrokovat će ozbiljna oštećenja na jetri i smanjiti razinu kalcija u tijelu [9].

Biljke se razlikuju po sposobnosti akumuliranja kadmija. Kadmij je lako topljiv u usporedbi s ostalim metalima 12. skupine pa upravo zbog tog svojstva ostaje koncentriran u jestivim dijelovima biljaka. Prilikom izloženosti biljaka kadmiju, dolazi do promjene u staničnim procesima i funkcijama. Do poremećaja može doći u fotosintetskoj aktivnosti biljaka, njihovom antioksidativnom djelovanju, u ionskim kanalima, može se poremetiti status vode u biljkama, kao i redoks ravnoteža, a može doći i do smanjenja stanične proliferacije i rasta [8]. Biljke pokazuju i razne metaboličke promjene do kojih je došlo uslijed izlaganja kadmiju. Od morfoloških i strukturnih promjena mogu se spomenuti kloroza i inhibicija razvoja bočnog korijenja te gustoća stomatalnog aparata. Kadmij je, isto tako uzrok pojave osmotskog stresa kod biljaka na način da smanjuje relativni status vode u listovima te stomatalnu provodljivost. Učinak ovog metala otežava prijenos mineralnih tvari što za posljedicu ima smanjenje prinosa. Ukratko, toksičnost kadmija će potaknuti prekomjernu proizvodnju ROS-a čime će se oštetiti membrane i stanični organeli. U posljednje vrijeme sve je veći interes za biljke koje imaju sposobnost akumulacije ili stabilizacije kadmijevih spojeva kako bi se cjelokupno zagađenje kadmijem smanjilo [9].

Fizikalna i kemijska svojstva tla će odrediti toksičnost i bioraspoloživost kadmija. Kako bi unos kadmija u biljku bio moguć, kadmij mora preći u mobilni oblik iz fiksnog oblika, a to se postiže smanjenje pH vrijednosti tla. Kako bi se smanjila toksičnost koju uzrokuje kadmij, potrebno je razumjeti fizikalna i kemijska svojstva tla te dinamiku kadmija u tlu [9]. Uobičajene koncentracije kadmija prisutne u tlima su od 0,07 do 1,1 mg/kg tla [10]. Za poljoprivredna tla granična vrijednosti iznosi 100 mg/kg tla [11]. Primarno je prisutan u obliku iona ili formira kompleksne spojeve. U tlu se mogu pronaći anionski oblici kadmija kao što su CdCl_3^- , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$, $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ i $\text{Cd}(\text{HS})_4^{2-}$, dok su kationski oblici CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO^{3+} i CdHS^+ . Raspodjela kadmija u tlu ovisi o nekim kemijskim reakcijama, tj. o taloženju i otapanju, adsorpciji i desorpciji te stvaranju Cd liganda. Na navedene procese utječu anorganski i organski ligandi, redoks stanja, sadržaj metala, temperatura te pH vrijednosti tla. Raspodjela kadmija u tlu je iznimno bitna za regulaciju toksičnosti istog u sustavima tla. Koncentracija slobodnih kadmijevih iona u tlu određuje biogeokemijska svojstva kadmija. Sama bioakumulacija kadmija u korijenje biljaka mijenja se s obzirom na koncentraciju kadmija u rizosferi i tip biljke. Naprimjer, za kukuruz (*Zea Mays*, L.) se pokazalo da akumulira više kadmija u dijelove staničnih stijenki od graha (*Vicia faba*, L.) [9].

Bioraspoloživost kadmija određuje nekoliko faktora: pH vrijednost tla, kapacitet kationske zamjene (eng. *cation exchange capacity*, CEC), aktivnost mikroba i organske tvari. Najvažniji čimbenik je pH vrijednost tla zbog toga što se kadmij u tlu nalazi u različitim oblicima ovisno o pH vrijednosti određenog dijela tla. Kiselo tlo uvelike utječe na topljivost kadmija u otopini tla. Kadmij u tlu mijenja svoj oblik iz nepokretnog oblika u pokretan (slobodni) oblik. Ove strukturne promjene omogućuju bolju bioraspoloživost i pokretljivost slobodnog oblika kadmija iz spojeva kao što su Mn i Fe oksidi. Važna pH vrijednost za topljivost kadmija u tlu jest pH 6. Pri pH 6 dolazi do stvaranja kompleksnih spojeva između kadmija i organskih tvari nakon čega se događa adsorpcija kompleksa na površine minerala. Povećanjem pH vrijednosti raste alkalitet tla što za posljedicu ima bolju adsorpciju kadmija u tlo [9]. U radu Yu i sur. [12] opisano je da je pH vrijednost tla ključni čimbenik u aklimatizaciji kadmija zrnima riže. Naime, raspoloživost slobodnog oblika kadmija u otopini tla ovisi o adsorpciji i njegovom taloženju u uvjetima povećanog pH tla [12]. S druge strane, sama bioraspoloživost kadmija uvjetovana je organskom tvari tla (eng. *soil organic matter*, SOM). Osim što neposredno utječe na vezanja kadmija za čestice tla, SOM ima utjecaj i na aklimatizaciju kadmija. U tom slučaju može se reći da bioraspoloživost kadmija ovisi o izvoru, koncentraciji i kemijskom obliku SOM-a [9]. Kako bi se na pravilan način procijenio potencijal ispiranja metala iz tla te bioraspoloživost istog, koristi se tehnika razdvajanja čvrstom otopinom. Važno je naglasiti da se uz literaturne podatke o mineralnim tlima, trebaju u obzir uzeti podaci o tlima s dominantnijim organskim materijalima u sastavu. Odvajanje mineralnog dijela tla od organskog vrši se korištenjem ugljika po masi tla (do 20 % ugljika). Distribucija metala u tragovima u čvrstoj otopini će biti drugačija u organskim tlima kiselog tipa od distribucije u poljoprivrednim ili urbanim tlima. Čimbenici koji utječu na distribuciju metala u tragovima su pH vrijednost, tekstura tla, unošenje organskih tvari, biljni pokrov, drveće i cjelokupna biota dotičnog tla [13]. Sauve i sur. [13] su otkrili za tla u šumama Kanade obogaćena organskim komponentama da određivanje pH i ukupnog sadržaja metala nije pouzdana tehnika za procjenu raspodjele metala između čvrste i tekuće faze. Istraživanje šumskih organskih tla u Kanadi pokazalo je da takva vrsta tla imaju i do 30 puta veći afinitet adsorpcije kadmija od mineralnih tla [14].

2.2.2. Štetni utjecaj kadmija na biljke

Danas je poznato da koncentriranje kadmija u tlima namijenjenima za poljoprivredu uzrokuje smanjenje rasta i prinos biljaka. Štetni utjecaj kadmija u tlu očituje se kao pojačana proizvodnja oksidativnih markera i slobodnih radikala te kao lipidna peroksidacija. Na taj se način biljka dovodi u stanje oksidativnog stresa i prinos usjeva će se smanjiti [9].

Biljke različito reagiraju na različite koncentracije kadmija. Moguće abnormalnosti zbog štetnog utjecaja ovise o vremenskom periodu tijekom kojeg je biljka bila izložena, količini unosa kadmija, lokalizaciji u dijelovima biljke te o samoj vrsti biljke. Kadmij se može lokalizirati bilogdje u biljkama zbog floemskog transporta. Floem je biljno tkivo koje služi za transport organskih tvari, koje nastaju procesom fotosinteze u različitim dijelovima biljaka, a najčešće u listovima. Izloženost kadmiju izaziva anatomske promjene koje najviše pogađaju korijen, listove i stabljiku poput smanjenja veličine listova, ožiljaka u stjenkama traheida, sužavanja ksilemskih žila, smanjenja parenhima u listovima i debljine epidermalnog tkiva. Postoje i biljke koje su otporne na utjecaje teških metala. Naime, takve vrste biljaka smanjuju štetu uzrokovanu teškim metalima pokretanjem brojnih mehanizama koji dovode do modifikacije mikrostruktura. Modifikacijom mikrostruktura povećava se površina vaskularnog snopa za bolji transport hrane i vode. Debela epiderma služi za čuvanje velike količine vode u tijelu biljke, a samo tijelo biljke pokriveno je voštanim slojem koji osigurava zadržavanje očuvane vode u korijenu i mladim dijelovima biljke. Za akumulaciju kadmija u različitim dijelovima biljaka odgovorno je nekoliko važnih mehanizama. Korijen biljke zamijeni kadmij za npr. fosfor, cink ili druge hranjive tvari radi sličnosti u strukturi elemenata. Također, dolazi do oštećivanja proteinskih struktura uslijed utjecaja kadmija na sulfhidrilnu skupinu (-SH) te uklanjanja određenih kationa iz aktivnih mjesta. Svaki poremećaj uobičajenih normalnih količina ROS-a i antioksidansa uglavnom rezultira oštećenjima lipida, proteina, pigmenata u stanicama, esencijalnih hranjivih tvari te nukleinskih kiselina [9].

Anatomske anomalije se razlikuju za pojedine biljne vrste, kao i koncentracije kadmija koje izazivaju anomalije kod određene vrste biljaka [9]. Tako npr. za kukuruz (*Zea mays*, L.) toksična koncentracija kadmija iznosi 0.1 mM, a pripadajuće anatomske anomalije su proširenje korijenova prostora i veći parenhim [15]. Kao drugi primjer može se tzv. kineska kočnica (*Pteris vittata*, L.), vrsta paprati kod koje koncentracija

kadmija od 100 μM izaziva smanjenje broja dlačica na korijenu i stvaranje crvenih precipitata u korijenskim vakuolama [16]. Za razliku od kukuruza i paprati, kod običnog se trsta (*Arundo donax*, L.) toksičnost kadmija očituje na stabljici. Dolazi do smanjenja udjela ksilema i reduciranja debljine epidermalnih tkiva pri koncentracijama kadmija od 101 mg/kg [17]. U konačnici, primjer biljke kojoj se toksičnost kadmija očituje na listovima jest tzv. muškatna kadulja (*Salvia sclarea*, L.). Pri koncentraciji od 100 $\mu\text{mol/L}$ kadmija smanjuje se veličina epidermalnih stanica i gubi se u međustaničnim prostorima [18].

Istraživanja štetnog utjecaja kadmija na rižu pokazala su da kadmij uzrokuje bitno smanjenje unosa hranjivih tvari putem korijenja i pad prinosa zrna. U slučaju riže na stopu smanjenog prinosa utječu genotip riže, vrsta tretmana, koncentracija kadmija i razdoblje izloženosti istom. S druge strane, kod pšenice se smanjuju svojstva poput broja zrna po klasu, duljina klipova i težina usjeva, ali kao i kod riže, toksičnost kadmija ovisi o genotipu, razdoblju izloženosti i njegovoj koncentraciji. Smanjenje prinosa uslijed štetnog utjecaja kadmija zabilježeno je i kod drugih biljaka, npr. ječma, rajčice, kukuruza, graška i dr. [9]. U Tablici 1. navedeni su štetni utjecaji kadmija na prinos različitih usjeva biljaka.

Tablica 1. Podatci o smanjenju prinosa za različite vrste usjeva i koncentracije kadmija [9].

Vrsta usjeva	Koncentracija Cd	Smanjenje prinosa (%)
rotkvica (<i>Raphanus sativus</i>)	200 mg/kg	29.55 – 53.48
pšenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	100 mg/kg	26 – 53
riža (<i>Oryza sativa</i> L.)	150 mg/kg	38.3 – 47.1
uljana repica (<i>Brassica napus</i> L.)	12 mg/kg	65.39
ječam (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	5 μ M	10.7 – 55.8
rajčica (<i>Solanum lycopersicum</i>)	50 μ M	25.5
pamuk (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	600 μ M	60.6

2.3. Utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost

Kadmij izaziva oksidativna oštećenja uslijed prekomjernog stvaranja H_2O_2 te pojačane lipidne peroksidacije u biljaka [19]. Kako bi umanjile nastalu štetu, biljke će pokrenuti antioksidativni obrambeni mehanizam da stanična redoks homeostaza ostane nepromijenjena. ROS će se vezati za proteine, lipide i nukleinske kiseline čime će doći do smanjenja enzimske aktivnosti, propusnost membrane će biti veća, kao i šansa za pojavom mutacija. Biljne vrste za koje se smatra da imaju određenu toleranciju na Cd^{2+} ione, imaju jače i učinkovitije antioksidativne obrambene mehanizme. Biljke imaju tzv. sustav antioksidativnog odgovora (eng. *the antioxidant response system*, ARS) koji čine sustavi enzimskih i neenzimskih reakcija [20].

Važan mehanizam u biljkama, za borbu protiv toksičnosti okoliša u kojemu se nalaze, je metabolizam ugljika, kao i održavanje lanca prijenosa elektrona te asimilacija ugljikova dioksida i konstanta opskrba istim. Štetni utjecaji kadmija i olova stvaraju probleme u metabolizmu ugljika koji se očituju kao smanjena djelotvornost fotosinteze. Kadmij je učinkoviti pokretač promjena u procesima poput fotosinteze, lanca prijenosa elektrona (eng. *electron transport chain*, ETC), fotosustava, puteva redukcije ugljikova dioksida u stromi i dr. Uslijed štetnog utjecaja kadmija, tilakoidi u strukturi kloroplasta budu napuhani i deformiranog oblika. Kod nekih biljnih vrsta nakupljaju se plastoglobuli i škrob u lišću te dolazi do brojčanog smanjenja kloroplasta i grana u strukturi kloroplasta. Aktivnost enzima lipoksigenaze (LOX) uzrokuje prethodno navedene posljedice uslijed lančane reakcije peroksidacije lipida (LPX). LOX posreduje u procesu peroksidacije membranskih masnih kiselina poput fosfatid glicerola (PG) i mono- i dilaktozildiacil glicerola (MGDG, DGDG). Pojačana akumulacija navedenih masnih kiselina u membrani rezultirat će stvaranjem ROS-a i slobodnih radikala [9]. ROS nastaju metabolizmom aerobnih organizama [21]. Učinkovitost procesa fotosinteze je smanjena i uslijed prethodno spomenutih deformacija u strukturi kloroplasta [9]. Toksičnost kadmija glavni je uzrok promjena u pigmentima fotosinteze, točnije inhibirana je njihova biosinteza. Pod utjecajem stresa uzrokovanim kadmijem u biljaka dolazi do smanjenja količine klorofila (Chl). Naprimjer, prekursor za biosintezu klorofila je spoj aminolevulinat (ALA). Zbog ograničenja količine ugljikova dioksida uslijed izloženosti kadmiju dolazi do smanjenja asimilacije i transpiracije procesa fotosinteze što u konačnici rezultira zatvaranjem stome [22]. Proces fotosinteze je esencijalan proces za održavanje, ali i sam razvoj živog svijeta. Pretvaranjem svjetlosne energije u kemijsku

energiju proizvodi se molekularni kisik, a troši ugljikov dioksid. Biljke sadrže fotosustave koji se mogu definirati kao visoko organizirani multiproteinski kompleksi s različitim pigmentima za prikupljanje fotona. Fotosustavi također koriste svjetlosnu energiju kao katalizator za primarne fotosintetske reakcije kojima se stvaraju visokoenergetski spojevi. U središnjem kompleksu sadrže tzv. reakcijske centre. U reakcijskom centru nalazi se elektron koji pokreće prijenos perifernog sustava koji je ključan za skupljanje svjetlosti i reguliranje aktivnosti fotosinteze [23]. U biljkama se razlikuju fotosustavi I (PSI) i fotosustavi II (PSII) čije se funkcije mijenjaju zbog štetnog utjecaja kadmija [9].

2.4. Kukuruz i njegova svojstva

Kukuruz (*Zea mays*, L.) je biljka iz porodice trava (*Poaceae*) [6] koja je globalno poznata kao „kraljica žitarica“ [24]. Uz pšenicu i rižu, ova jednogodišnja biljka jedna je od najvažnijih vrsta žitarica za prehranu velikih populacija Afrike, Azije i Amerike [25]. Svjetska godišnja proizvodnja kukuruza iznosi oko 780 milijuna tona, a glavni izvoznici su Kina, Brazil, Indija te Sjeverna i Južna Amerika [6]. Kukuruz šećerac je jedna od najpopularnijih povrtnih kultura u Kini pa i Sjevernoj Americi [26]. Rod *Zea* obuhvaća čak pet različitih vrsta, ali *Zea mays* je jedina kultivirana vrsta, a ostalo su divlje trave. Gotovo svi dijelovi kukuruza se koriste u neku svrhu, bilo kao hrana za ljude i stoku, za proizvodnju biogoriva ili pak domaću proizvodnju lijekova. Zrela zrna kukuruza mogu se sušiti i mljeti u svrhu proizvodnje kukuruznog brašna koje poboljšava kako nutritivne, tako i funkcionalne vrijednosti drugih vrsta brašna kada se koriste u kombinaciji. Zrna kukuruza se mogu koristiti za dobivanje biogoriva (etanola), ali i polusuhog ulja koje se upotrebljava u proizvodnji boja, sapuna i lakova [6].

Kukuruz ima dobro formirani i razvijeni korijen iz kojeg se nastavlja mnoštvo malog korijenja. Stabljika nije razgranata, a može narasti i preko dva metra u visinu. Listovi su postavljeni naizmjenično i formiraju tzv. rukavac oko stabljike te obavijaju jestivi dio biljke, klip. Dužina listova u prosjeku iznosi od 30 do 80 cm, a širina može biti i do 12 cm. Sadrže jednospolne i jednodomne cvjetove [27]. Klipove gradi mnoštvo zrna koja su najčešće žute boje. Klip je jestivi dio kukuruza pokriven dugim i svilenim dlačicama, tzv. kukuruznom svilom. Osim što se tradicionalno koristi kao lijek biljnog porijekla, kukuruzna svila je bitna i u razvoju farmaceutskih lijekova. Kukuruzne dlačice se u Aziji koriste i za pripremu zdravog čaja. Unutrašnji dio stabljike kukuruza se još koristi u proizvodnji kukuruznog sirupa, a vanjski osušeni dio za izradu npr. košara [6].

Usjevi kukuruza uspijevaju u različitim uvjetima okoliša i klime pa se može reći da je ova biljka izuzetno svestrana, tj. prilagođena je na različite vrste tla, od pjeskovitog do glinenog ilovastog. Međutim, najviše joj pogoduju tla s velikom sposobnošću zadržavanja vode i neutralnim pH vrijednostima te tla bogata organskim tvarima. Usjevima kukuruza je potrebno dovoljno vlage i topline od faze klijanja pa sve do faze cvatnje. Sjemenke klijanju u rasponu temperatura od 21 °C do 32 °C. Više temperature uzrokovat će smanjenje vlage, a samim time će doći do oštećenja na listovima prilikom cvatnje, sušenja peludi i nemogućnosti pravilnog oprašivanja [28].

2.4.1. Nutritivne vrijednosti kukuruza

Kukuruz je nutritivno kvalitetna vrsta usjeva [5]. U sastavu kukuruza pronalaze se ugljikohidrati (70 %), proteini (10 %), ulja (4 %), sirova vlakna (2,3 %) i albuminoidi (10,4 %). Vitamini A i E, nikotinska kiselina i riboflavin također su značajne nutritivne komponente kukuruza [24]. Sjemenke kukuruza ponajviše sadrže polisaharide, proteine i ulja. U sastav kukuruzne svile ulaze masti, proteini, pepeo, vlakna, ugljikohidrati, vitamini i minerali te određeni udio vlage [6]. U prosjeku 100 g kukuruza ima 365 kalorija, a glavne komponentne kukuruza su ugljikohidrati i voda. Kukuruz u prosjeku sadrži oko 75 % ugljikohidrata i 10 % vode [26]. Točnije, čak 72 - 73 % od ukupne mase zrna kukuruza zauzima škrob, dok su ostale vrste ugljikohidrata uglavnom glukoza, saharoza i fruktoza (~ 2 %) [29]. Vitamini koje sadrži kukuruz jesu niacin, riboflavin, folat, piridoksin, tiamin te vitamini E i K, dok se vitamin C nalazi samo u kukuruzu šećercu. Uz navedene vitamine, kukuruz sadrži i minerale i to ponajviše kalcij, kalij, natrij, cink, fosfor i magnezij. Lipidi su najvećim dijelom zastupljeni u mononezasićenom i polinezasićenom obliku, a najmanji udio zauzimaju zasićene vrste lipida [26].

2.4.2. Antioksidativna aktivnost kukuruza

Fitotoksičnost kadmija uzrokuje promjene u rastu biljke, propusnosti njenih membrana i stvaranju ROS-a [30]. Zbog velikog broja fitokemijskih spojeva, kukuruz pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost u usporedbi s drugim vrstama žitarica poput zobi, riže i pšenice. Općenito, ljekoviti značaj biljaka ovisi o njihovom fitokemijskom sastavu i prisutnim antioksidansima. Fitokemikalije su veoma važan sastojak lijekova protiv raznovrsnih bolesti zbog snažnih antiradikalnih i redukcijskih svojstava. Kukuruz ima raznoliki fitokemijski antioksidativni sustav i često je primjenjivan u farmaceutskoj industriji [31]. Fitokemijski spojevi se mogu pronaći u kukuruznoj svili, listovima, stabljici, korijenu pa i u sjemenkama. U kukuruzu nalazimo fitokemikalije poput flavonoida, alkaloida, tanina, saponina, antocijanina, steroida, fenolnih kiselina i sl. Sjemenke su bogate polifenolnim spojevima, fenolnim kiselinama, flavonoidima, raznim vitaminima i polisaharidima [6].

Kukuruzna svila je dio biljke najbogatiji antioksidativnim spojevima i jakim antioksidativnim potencijalom. Uz antioksidativnu aktivnost, kukuruz posjeduje i antidijabetska, antimutagena, antibiotska, antibakterijska, protuupalna, antifungalna i mnoga druga svojstva, ipak često završi u otpadu. Tradicionalno se koristi u liječenju

pretilosti, artritisa, gihta, hiperglikemije, tumor, raznih upala, problema kardiovaskularnog sustava, bubrežnih kamenaca i hepatitisa te mokrenja u krevet. Kukuruzna svila doprinosi i boljem funkcioniraju imunološkog sustava i izlučivanje urina. Pripravak čaja poznato je diuretsko sredstvo. Ekstrakti kukuruza također doprinose aktivnost antioksidativnih enzima u raznim organima. Međutim, svi su dijelovi kukuruza izvor antioksidativnih spojeva sa značajnim istovrsnim potencijalom [6].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitivani materijal

Antioksidativna aktivnost određivana je u uzorcima svježe usitnjenog biljnog tkiva kukuruza (*Zea mays*, L.). Uzorci su podijeljeni na uzorke tretirane određenom koncentracijom kadmija te na uzorke koji nisu tretirani kadmijem, odnosno kontrole.

3.2. Kemikalije

Za pripremu otopina, pufera i reakcijskih smjesa korištena je demineralizirana ili deionizirana voda. Popis korištenih kemikalija:

Acetatni pufer, pH = 3,6

Bradford reagens

Coomassie brilliant plavo

Deionizirana voda

DPPH, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

Etanol, C₂H₅OH

Folin-Ciocalteuov reagens, FC reagens

Galna kiselina, C₇H₆O₅

Govedi serumski albumin, BSA

Metanol, CH₃OH

Natrijev karbonat, Na₂CO₃

Ninhidrin, C₉H₆O₄

Octena kiselina, CH₃COOH

Prolin, C₅H₉NO₂

Tekući dušik

TPTZ otopina, 2,4,6-tripiridil-S-triazin

Tris-HCl pufer, pH = 8, 100 mM

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

Željezo (III) klorid heksahidrat, FeCl₃ x 6 H₂O

Željezov 2,4,6-tripiridil-S-triazin, Fe^{III} TPTZ

3.3. Biljni materijal i uzgoj

U svrhu ovog istraživanja, uzgajani su kultivari kukuruza (*Zea mays*, L.), linije 84-28A i OS 942 te njihov hibrid OS 404. Na temelju prethodnih istraživanja (Anjum et al. [30]) odabrane su koncentracije kadmija korištene u ovom pokusu: 150 i 375 $\mu\text{mol/L}$ (Cd150 i Cd375). U plastične posude dimenzija 35 x 21 x 7 cm, posijane su po dvije sjemenke svake sorte kukuruza u 3 replike s odgovarajućim koncentracijama kadmija, odnosno bez kadmija, kontrola (K). Kukuruz je posijan u univerzalni supstrat (Brill 5) s dodatkom 1100 g NPK s elementima u tragovima; pH (H_2O): 5.5-6.5; struktura: srednje fina; pH (CaCl_2): 5,7; sadržaj soli: 1,0 g/L; dušik (N): 150 g/L; fosfor (P_2O_5): 150 mg/L; kalij (K_2O): 190 mg/L.

Otopine CdCl_2 su raspršene po supstratu i dobro izmiješane. Biljke kukuruza uzgajane su u uzgojnoj komori FITOCLIMA 12000 PLH (Aralab) pri: intervalu dan/noć od 16/8 h, s dnevnom temperaturom od 25 °C i relativnom vlagom od 60 % te noćnom temperaturom do maksimalno 18 °C s relativnom vlažnosti zraka od 75 % i 500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posude su svakodnevno vagane i zalijewane ovisno o izmjerenoj masi, kako bi se nadoknadio gubitak vode. Nakon 28 dana uzgoja, nadzemni dio biljnog tkiva je uzorkovan i pohranjen na -80 °C. Za provođenje analiza biljno tkivo, listovi kukuruza, usitnjeno je pomoću tekućeg dušika do finog praha.



Slika 10. Uzgoj biljaka u fitotronu (foto: Vlatko Galić).

3.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu zasniva se na nespecifičnom vezanju boje *Coomassie Brilliant* plavog G-250 u anionskom obliku, te proteina u kiselim uvjetima. Odvagano je oko 0,5 g svježeg tkiva i usitnjeno do finog praha, nakon čega je uzorak prebačen u tubice od 2 mL. Tkivu je potom dodano po 1 mL 100 mM Tris-HCl pufera (pH=8). Nakon 15-minutne inkubacije na ledu, uzorci su centrifugirani tijekom 15 minuta na 18 000 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja, od taloga se odvoje supernatanti, a postupak ekstrakcije s 1 mL 100 mM Tris-HCl puferom (pH=8) se ponovi. Supernatanti obje ekstrakcije su spoje. U jažice mikrotitarske pločice dodano je po 5 µL pripremljenog uzorka i 250 µL Bradford reagensa. Apsorbancija je izmjerena pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) pri valnoj duljini od 595 nm. Albumin iz goveđeg seruma, BSA, (eng. *bovine serum albumin*) je korišten kao standard u rasponu koncentracija od 0-1,4 mg/mL. Standardna krivulja BSA je korištena za izračunavanje koncentracija proteina u nepoznatim uzorcima koja je u konačnici izražena u mg/g svježe tvari [32].

3.5. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

Za određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola korišten je tzv. Folin-Ciocalteu (FC) reagens prema metodi opisanoj u Sadeer et al. [33]. Temeljna reakcija ove metode je reakcija polifenola i FC reagensa u blago alkalnim uvjetima. Folin-Ciocalteu reagens se sastoji od fosfomolibdata i fosfovolframata, a općenito se koristi za *in vitro* kolorimetrijska istraživanja fenolnih i polifenolnih antioksidansa. U tubice od 12 mL odvagano je oko 0,5 g svježeg biljnog materijala. Biljnom tkivu je zatim dodano 2,5 mL metanola (70 %) nakon čega su uzorci inkubirani na – 20 °C. Nakon 24 sata, ekstrakti su centrifugirani tijekom 10 min, na 10 000 g pri 4 °C. Supernatanti su odvojeni i dalje korišteni za određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola te ukupne antioksidativne aktivnosti. Za potrebe metode određivanja sadržaja ukupnih topljivih polifenola supernatanti su razrijeđeni pet puta. U jažice mikrotitarske pločice dodano je po 10 µL uzorka, 190 µL deionizirane vode i 25 µL FC reagensa. Promiješana smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi. Nakon pet minuta, u jažice je dodano još 75 µL zasićene otopine natrijeva karbonata (Na₂CO₃). Uzorci su inkubirani još sat vremena pri temperaturi od 37 °C te ohlađeni na sobnu temperaturu. Mjerena je apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) pri 765 nm. Kao standard je korištena galna kiselina u metanolu (70 %) u rasponu koncentracija kiseline 0-100 µg/mL. Ukupne koncentracije topljivih

polifenola u uzorcima izračunate su iz standardne krivulje galne kiseline te izražene kao mg ekvivalenti iste (GAE) po masi svježe tvari [33].

3.6. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

U metodama koje slijede korišteni su uzorci dobiveni ekstrakcijom u metodi određivanja ukupnih topljivih polifenola. Korištene su dvije metode određivanja ukupne antioksidativne aktivnosti: DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) metoda i FRAP (eng. *ferric reducing antioxidant power*) metoda prema protokolima opisanim u Xiao et al. [34].

3.6.1. DPPH metoda

DPPH metoda zasniva se na reduciranju slobodnih DPPH radikala pomoću antioksidansa koji je donor elektrona ili vodikovih atoma. Koristi se tzv. DPPH reagens koji se dobiva otapanjem DPPH u metanolu. Dodano je 20 μL uzorka (dobivenog ekstrakcijom ukupnih topljivih polifenola) i 180 μL DPPH reagensa (0,004 %) u jažice mikrotitarskih pločica. Pločica s uzorcima je inkubirana na sobnoj temperaturi u tamnoj prostoriji tijekom 30 min na magnetskoj miješalici. Za izradu baždarne krivulje korištene su različite koncentracije (0-100 $\mu\text{g/mL}$) otopine Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina). Apsorbancija je mjerena pri 517 nm valne duljine na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Ukupna antioksidativna aktivnost izračunata je pomoću baždarne krivulje, a izražena kao ekvivalenti Troloxa ($\mu\text{mol/g}$ svježe tvari) [34].

3.6.2. FRAP metoda

Za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti FRAP metodom, potrebna je redukcija $[\text{FeIII}(\text{TPTZ})]^{3+}$ (željezo 2,4,6-tripiridil-striazina) u uvjetima niskog pH (pH = 3,6) i uz prisustvo antioksidansa. Produkt reakcije redukcije je kompleksni spoj željeza $[\text{FeII}(\text{TPTZ})]^{2+}$, plave boje. Miješanjem acetatnog pufera (0,3 M; pH = 3,6), TPTZ otopine (10 mM) i otopine $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) u omjeru 10:1:1, pripremljena je tzv. FRAP reakcijska smjesa. FRAP smjesa je inkubirana u vodenu kupelj na temperaturi od 37 °C. Otpipetirano je po 5 μL uzorka (dobivenog ekstrakcijom ukupnih topljivih polifenola) i 180 μL FRAP smjese u jažice mikrotitarske pločice. Uzorci su zatim inkubirani u tamnoj prostoriji na 37 °C tijekom 15 minuta. Apsorbancija je mjerena pri 562 nm valne duljine, čitačem mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Za standardnu krivulju korištena su različita razrjeđenja Troloxa (0-100 $\mu\text{g/mL}$) iz koje je zatim

određena ukupna antioksidativna aktivnost u uzorcima. Određena antioksidativna aktivnost izražena je u obliku ekvivalenata Troloxa ($\mu\text{mol/g}$ svježe tvari) [34].

3.7. Ekstrakcija i određivanje prolina

Mehanizam reakcije određivanja prolina temelji se na činjenici da u neutralnim uvjetima, ninhidrin uništava primarne α -aminokiseeline. Također dolazi i do reakcije ninhidrina sa slobodnim amonijakom pri čemu nastane kromogen tamnoljubičaste boje s maksimalnom apsorpcijom oko 570 nm valne duljine. U ovom pokusu, odvagano je oko 0,1 g svježe usitnjenog biljnog tkiva u tubice od 2 mL. U tubice je zatim dodano po 1 mL smjese etanola i vode u omjeru 40:60 (v:v), nakon čega su uzorci inkubirani 24 sata na temperaturi 4 °C. Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 14 000 g. Pripremljena je reakcijska smjesa ninhidrina 1 % (w/v) u octenoj kiselini 60 % (v/v) i etanolu 20 % (v/v) i zaštićena od utjecaja svjetlosti. Zatim je u tubice s navojem otpipetirano po 100 μL pripremljene reakcijske smjese te 50 μL ekstrakta uzorka ili 50 μL standarda prolina (1-0.4-0.2-0.1-0.04 mM) pripremljenog u smjesi etanola i vode 40:60 (v/v). Zatvorene tubice grijane su na 95 °C tijekom 20 minuta i potom ohlađene na sobnu temperaturu. Nakon jedne minute centrifugiranja na 2500 rpm, 100 μL dobivene smjese otpipetirano je u jažice mikrotitarskih pločica. Apsorbancija je izmjerena na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) pri valnoj duljini od 520 nm [35]. Za izračun količine slobodnog prolina u biljnim ekstraktima korištena je slijedeća jednadžba:

$$\text{Prolin} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{FW ili } \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{FW} \right) = \frac{\text{Abs}_{\text{ekstrakt}} - \text{blank}}{\text{slope}} * \frac{V_{\text{ekstrakt}}}{V_{\text{aliquot}}} * 1/\text{FW}, \text{ gdje}$$

$\text{Abs}_{\text{ekstrakt}}$ predstavlja izmjerenu apsorbciju za pojedini ekstrakt te se smatra da je vrijednost unutar linearnog raspona, a slope (izražen kao apsorbcija* nmol^{-1}) je određen linearnom regresijom. Volumen ekstrakta je označen s V_{ekstrakt} , dok je V_{aliquot} volumen korišten u pokusu. FW je količina ekstrahiranog biljnog materijala [35].

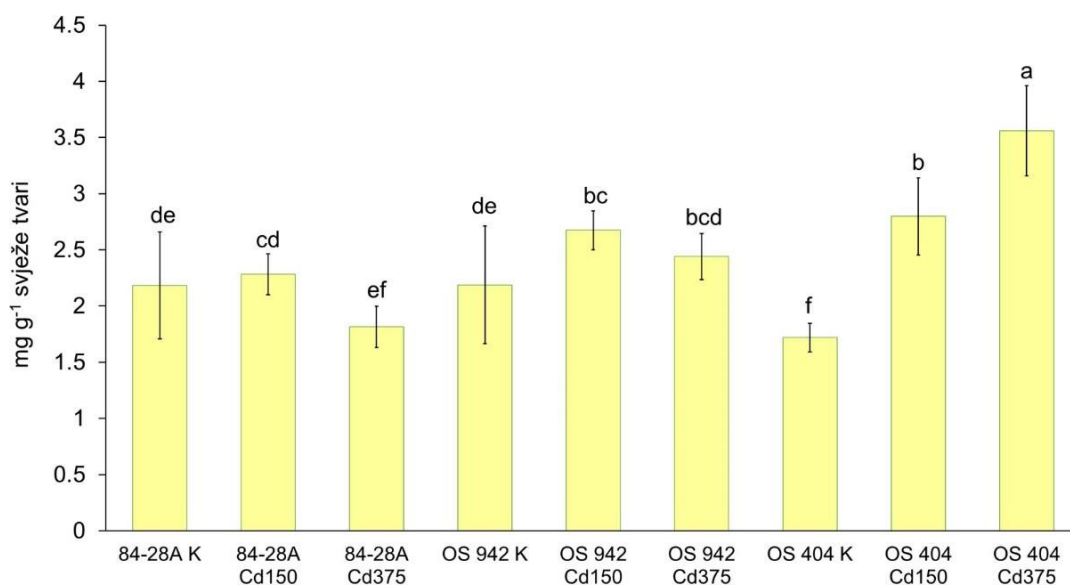
3.8. Statistička obrada podataka

Za obradu dobivenih podataka istraživanja korišten je statistički program R Studio. Normalnost raspodjele provjerena je Shapiro-Wilk testom. Budući da je raspodjela normalna, za daljnju analizu korištena je analiza varijance s dva promjenjiva faktora (*two-way ANOVA*) s testom najmanje značajne razlike (LSD *post hoc* testom) za utvrđivanje razlika između različitih kultivara, te kontrole i tretmana. Zatim je korištena analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom za raščlambu efekata interakcije, kako bi se utvrdilo između kojih genotipova pri kojim tretmanima postoji značajna razlika. Testovi su provedeni na razini značajnosti od $p < 0,05$. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

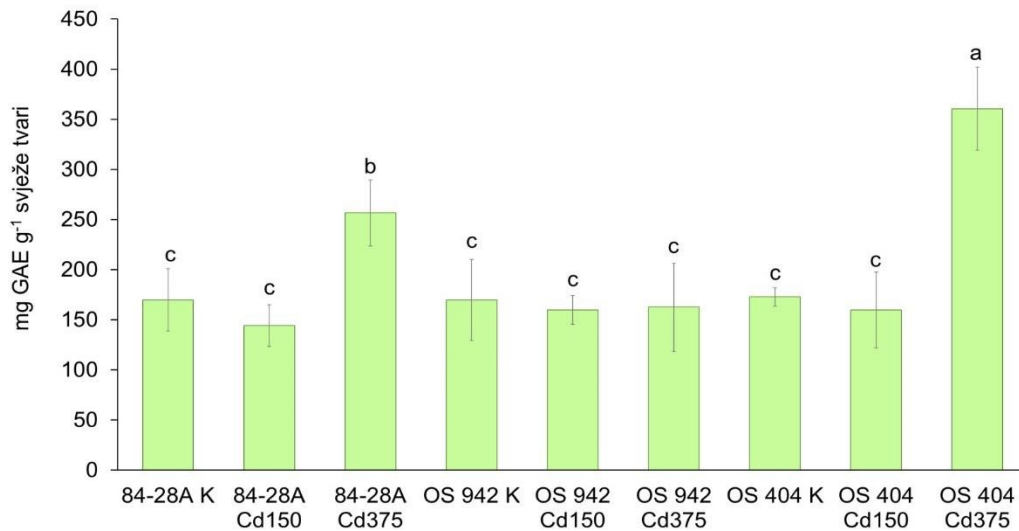
Najveći porast koncentracije proteina uočen je pri tretmanu s Cd375 u hibridu kukuruza OS 404, u odnosu na kontrolu i na tretman s Cd150. U biljkama linije 84-28A tretiranih s Cd375 došlo je do smanjenja koncentracije proteina, u odnosu na kontrolni uzorak i tretman s Cd150. Biljke linije OS 942 pokazale su blago povećanje koncentracije proteina kada su tretirane s Cd375 u odnosu na kontrolu, ali ne i međusobno u tretmanima.



Slika 11. Koncentracija proteina izmjerenih u uzorcima kukuruza (*Zea mays*, L.), dviju linija (84-28A i OS 942) i njihova hibrida (OS 404), u kontroli (K) i nakon tretmana s dvije koncentracije kadmija od 150 $\mu\text{mol/L}$ (Cd150) i 375 $\mu\text{mol/L}$ (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju značajne razlike između skupina ($p < 0,05$).

4.2. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

U slučaju hibrida dviju linija (OS 404) nakon tretmana s $375 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$, pokazalo se da je sadržaj ukupnih topljivih polifenola značajno viši u odnosu na kontrolu i ostale uzorke. Također, utvrđen je značajan porast u liniji 84-28A tretirane s $375 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ u odnosu na kontrolu i tretman s Cd150. Utvrđeno je da se vrijednosti za sve uzorke, osim navedenih, nisu značajno razlikovale.

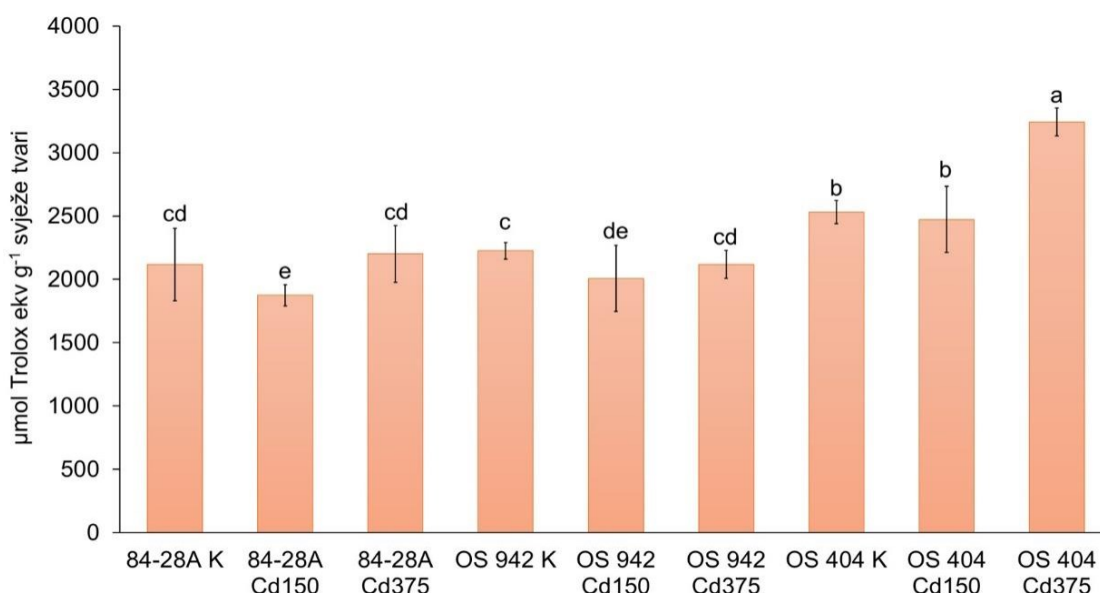


Slika 12. Sadržaj ukupnih topljivih polifenola izmjenjenih u uzorcima kukuruza (*Zea mays*, L.), dviju linija (84-28A i OS 942) i njihova hibrida (OS 404), u kontroli (K) i nakon tretmana s dvije koncentracije kadmija od $150 \mu\text{mol/L}$ (Cd150) i $375 \mu\text{mol/L}$ (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju značajne razlike između skupina ($p < 0,05$).

4.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

4.3.1. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

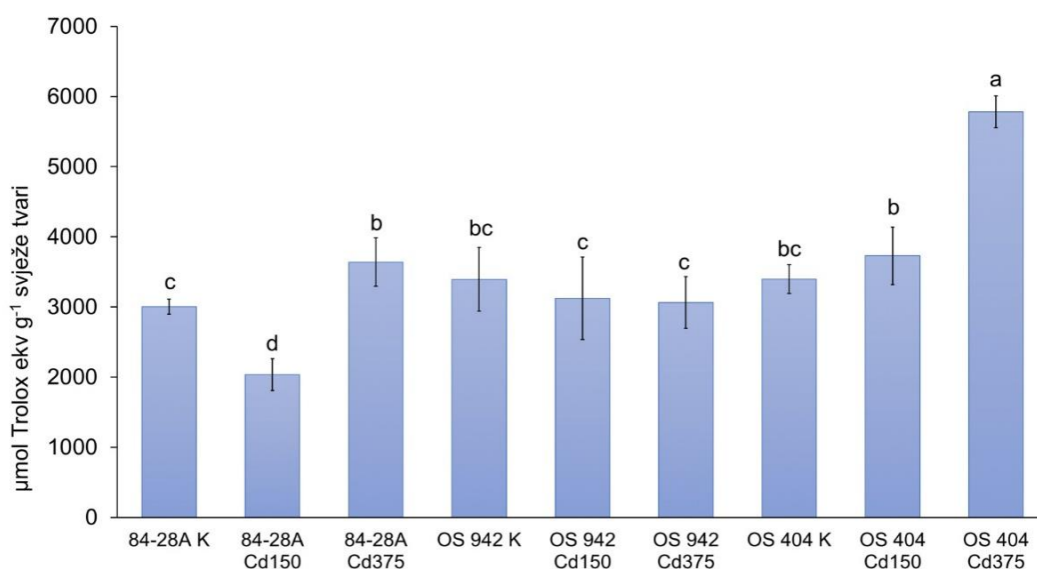
Linije 84-28A i OS 942 pokazale su manju ukupnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na kontrolne uzorke, kada su tretirane s Cd150, dok se u slučaju hibrida OS 404, vrijednosti za kontrolni (OS 404 K) i tretirani uzorak (OS 404 Cd150), nisu značajno razlikovale. Rezultati dobiveni za kontrolni uzorak linije 84-28A i tretirani uzorak iste linije (84-28A Cd375), se nisu razlikovali. Biljke linije OS 942, tretirane s Cd375, imaju nešto manju ukupnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na kontrolu, ali ne značajnu. Biljke hibrida OS 404 tretirane s Cd375 pokazale su veću ukupnu antioksidativnu aktivnost izmjerene DPPH metodom, u odnosu na kontrolu i ostale ispitivane uzorke.



Slika 13. Ukupna antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom u uzorcima kukuruza (*Zea mays*, L.), dviju linija (84-28A i OS 942) i njihova hibrida (OS 404), u kontroli (K) i nakon tretmana s dvije koncentracije kadmija od 150 µmol/L (Cd150) i 375 µmol/L (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju značajne razlike između skupina ($p < 0,05$).

4.3.2. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

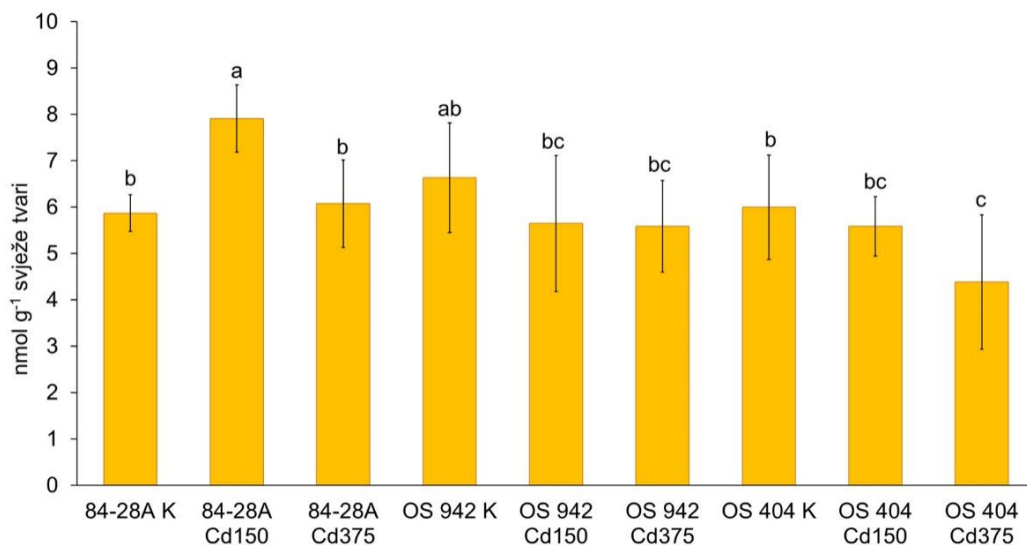
Biljke linije 84-28A pokazale su pad ukupne antioksidativne aktivnosti, kada su tretirane s Cd150, te rast ukupne antioksidativne aktivnosti u biljkama tretiranih s Cd375, u usporedbi s kontrolom (84-28A K). Statističkom analizom rezultata za liniju OS 942 utvrđeno je da, prilikom tretiranja biljaka kadmijem (Cd150 i Cd375), dolazi do blagog pada ukupne antioksidativne aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak (OS 942 K), ali nije značajan. Hibrid OS 404 pokazao je blago povećanje ukupne antioksidativne aktivnosti u slučaju tretiranja s Cd150, a tretman s Cd375 je uzrokovao značajan porast ukupne antioksidativne aktivnosti izmjerene FRAP metodom.



Slika 14. Ukupna antioksidativna aktivnost određena FRAP metodom u uzorcima kukuruza (*Zea mays*, L.), dviju linija (84-28A i OS 942) i njihova hibrida (OS 404), u kontroli (K) i nakon tretmana s dvije koncentracije kadmija od 150 µmol/L (Cd150) i 375 µmol/L (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju značajne razlike između skupina ($p < 0,05$).

4.4. Ekstrakcija i određivanje prolina

Statističkom obradom rezultata utvrđeni je najveći sadržaj slobodnog prolina u uzorcima linije 84-28A tretirane s Cd150. Vrijednosti za kontrolni uzorak linije 84-28A i tretirani uzorak 84-28A s Cd375, nisu se značajno razlikovale. Linija OS 942 pokazala je podjednako smanjenje sadržaja slobodnog prolina u uzorcima oba tretmana, u odnosu na kontrolni uzorak. U slučaju hibrida OS 404 pokazalo se da je došlo do smanjenja sadržaja slobodnog prolina u oba tretmana kadmijem, a posebice u tretmanu s Cd375.



Slika 15. Sadržaj slobodnog prolina određenog u uzorcima kukuruza (*Zea mays*, L.), dviju linija (84-28A i OS 942) i njihova hibrida, u kontroli (K) i nakon tretmana s dvije koncentracije kadmija od 150 $\mu\text{mol/L}$ (Cd150) i 375 $\mu\text{mol/L}$ (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su *post hoc* testom. Različita slova označavaju značajne razlike između skupina ($p < 0,05$).

5. RASPRAVA

Teški metali predstavljaju veliku prijetnju okolišu i svim živim bićima, već pri niskim koncentracijama [36]. Oksidativna oštećenja nastaju uslijed izloženosti biljke oksidativnom stresu. Poznato je da mehanizmi djelovanja kadmija potiču proizvodnju ROS-a u biljkama. Dominantni oblik kadmija u tlu je Cd^{2+} , a kao takav ne može izravno proizvesti slobodne radikale [19]. Ipak, prilikom izloženosti biljke kadmiju, zbog nastalog oksidativnog oštećenja dolazi do stvaranja tiobarbiturine kiseline (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) i malondialdehida koji potiču lučenje elektrolita. Toksični učinak kadmija uzrokuje povećanje količine ROS-a koje narušavaju strukture lipida, proteina i nukleinskih kiselina [20]. Kadmij je neesencijalan element koji uzrokuje morfološke, biokemijske, fiziološke te molekularne promjene [37]. Istraživanja su pokazala da kadmij ima štetan utjecaj na biljke koji se očituje kao spriječeno klijanje sjemenki i izduživanje korijenja, smanjenje duljine biljaka i količine listova, a što u konačnici najčešće rezultira smrću biljke [38]. Neke biljke su razvile obrambene mehanizme za borbu protiv štetnog utjecaja kadmija [20]. Dokazano je da kadmij izaziva stanje oksidativnog stresa u vrstama biljaka poput *moso* bambusa (*Phyllostachys pubescens*) [39], obične pšenice (*Triticum aestivum*, L.) [40] i rajčice (*Solanum lycopersicum*, L.) [41].

Kukuruz je jednogodišnja biljka koja je svijetu poznata kao „kraljica žitarica“ [24]. Biljka kukuruza je bogata tzv. fitokemijskim spojevima, zbog čega ima snažno antioksidativno djelovanje. Kukuruz se koristi u brojnim studijama kao model za istraživanje onečišćenja teškim metalima upravo zbog brzog rasta biljke i velike biomase. Akumuliranjem kadmija u biljku, usporava se njezin rast i oštećuju se kloroplasti. Iznimka su listovi kukuruza, s većom tolerancijom na kadmij od ostalih dijelova biljke, stoga štetni utjecaj kadmija na rezultira sušenjem listova [31]. Fitokemijski spojevi poput flavonoida, fenolnih kiselina, antocijanina i drugih, prisutni su u gotovo svim dijelovima kukuruza, a posebice u kukuruznoj svili [6]. Dovoljna konzumacija flavonoida, najveće skupine fenolnih spojeva u kukuruzu, dokazano smanjuje rizik od razvoja dijabetesa, raka i drugih vrsta kroničnih bolesti. Prirodne fenolne kiseline daju kukuruzu kiselkast i gorak okus [26]. Poznati su čimbenici koji imaju utjecaj na antioksidativne i fitokemijske značajke u pojedinim dijelovima kukuruza. Fitokemijski i antioksidativni sastav ovise o sorti kukuruza i fazi rasta tijekom koje se analizira. Isto tako, izrazito je važno na kojoj lokaciji se nalaze usjevi, nadalje

koji su klimatski uvjeti, načini navodnjavanja i gustoća kojom su biljke poredane. Ipak, blagi pad antioksidativne aktivnosti kukuruza uočen je prilikom fermentiranja uzoraka kukuruza. Uzorci nakon fermentacije sadrže povećanu količinu karotenoida i askorbinske kiseline. Može se reći da su za cjelokupnu antioksidativnu aktivnost kukuruza važni uvjeti skladištenja te metode obrade i kuhanja [6].

Kadmij je mobilniji u odnosu na druge teške metale, zbog čega u visokim koncentracijama pokazuje veću toksičnost za biljke. Poznato je da su biljke višeg rasta otpornije na djelovanje teških metala zbog posjedovanja obrambenih mehanizama poput sinteze fitokelatina i sličnih peptida, ali i proteina koji se javljaju u stresnom stanju. Prilikom izloženosti teškim metalima poput kadmija, u biljkama dolazi do remećenja funkcija enzima i proteina. Toksičnost se javlja uslijed vezanja metala za sulfhidrilnu skupinu proteina, što potencijalno dovodi do inhibicije aktivnosti proteina ili narušavanja njihove strukture. Suvišak teških metala u biljkama izaziva stanje oksidativnog stresa što dovodi do povećane proizvodnje ROS-a, koje uglavnom utječu na biološki važne molekule. Istraživanja utjecaja teških metala, točnije kadmija i bakra, na proteine u biljkama, pokazala su da biljke nakon izloženosti većim koncentracijama metala sadrže proteine manje molekularne mase [42]. Djelovanje ROS-a na proteine uzrokuje njihovu oksidaciju, prilikom čega proteini gube svoju funkciju. Deaktivirani proteini se u tom slučaju agregiraju i dolazi do povećanja njihove koncentracije [43]. U ovom istraživanju je zabilježeno povećanje koncentracije ukupnih proteina u biljkama kukuruza tretiranih sa 150 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} , što bi mogao biti odgovor na povećanu proizvodnju ROS-a koji denaturiraju proteine zbog čega postoji povećana potreba za proizvodnjom istih [44]. Akumulacija proteina je najveća u slučaju hibrida OS 404 u oba tretmana. Ipak, tretman s koncentracijom Cd^{2+} od 375 $\mu\text{mol/L}$ doveo je do smanjenja koncentracije ukupnih proteina u liniji kukuruza OS 84-28A, što može značiti da se u tom slučaju kadmij nije akumulirao do viših dijelova biljke. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Rakszegi et al. [45] u kojemu je proučavan utjecaj oksidativnog stresa na pšenicu (*Triticum aestivum*, L.). Pokazalo se da stanje oksidativnog stresa u pšenici uzrokuje povećanje koncentracije proteina do čega dolazi zbog veće količine ROS-a u stanicama. U istraživanju Metwali et al. [42] zabilježeno je smanjenje molekularne mase ukupnih proteina u kukuruza kada su biljke tretirane kadmijem u koncentracijama od 75 i 150 $\mu\text{mol/L}$ [42].

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti u biljkama s važnom ulogom reduciranja nastalih oksidativnih oštećenja. Točnije, inhibiraju propagaciju lančanih reakcija oksidacije. Količina raspoloživog ugljika u lišću biljaka utječe na brzinu sinteze polifenola u biljkama. Do povećane proizvodnje polifenola dolazi kada je proizvodnja ugljika veća od metaboličke potrebe za rastom. Osim što imaju redukcijiska svojstva, polifenoli također imaju ulogu donora vodikovog atoma i gasitelja singletnog oblika kisika. Koncentracijski gradijent polifenola u biljkama pokazuje na koji se način biljka suočava sa stanjem abiotičkog stresa [46]. Kukuruz je pokazao veći sadržaj polifenola od također važnih žitarica, zobi, pšenice i riže [47]. U ovom istraživanju je vidljivo da s padom količine ukupnih polifenola dolazi do smanjenja ukupne antioksidativne aktivnosti, nakon tretmana sa 150 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. Kod izdanaka kukuruza tretiranih s 375 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ uočen je porast sadržaja ukupnih topljivih polifenola u slučaju linije 84-28A i hibrida. Ostali uzorci nisu pokazali statistički značajne razlike u sadržaju ukupnih topljivih polifenola. Na temelju dobivenih rezultata u ovom istraživanju se može pretpostaviti da su linija 84-28A i hibrid dviju linija, razvili učinkovitiji obrambeni mehanizam u borbi protiv oksidativnog stresa izazvanim kadmijem. Slične rezultate dobili su Márquez-García et al. [48] u istraživanju utjecaja kadmija na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost vrijeska (*Erica andevalensis*). Nepromijenjena količina ukupnih polifenola u biljkama nakon tretiranja visokim koncentracijama kadmija, pripisuje se svojstvu fenoksilnih radikala, koji nastaju antioksidativnim reakcijama, da djeluju kao prooksidansi u danim uvjetima. Iz tog razloga visoke koncentracije kadmija uspjevaju reducirati sintezu ili otpuštanje polifenola, zasada nepoznatim mehanizmom. Nedostatak porasta sadržaja ukupnih polifenola može biti posljedica akumuliranja viška kadmija, što potencijalno dovodi do oslabljenog antioksidativnog odgovora do te mjere da biljke nisu u mogućnosti sintetizirati nove polifenolne spojeve [48].

Za istraživanje neenzimatske ukupne antioksidativne aktivnosti izdanaka kukuruza nakon tretmana sa 150 i 375 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$, korišteni su FRAP i DPPH radikali. Usporedbom rezultata obiju metoda utvrđeno je da je tretman sa 150 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ rezultirao smanjenjem ukupne antioksidativne aktivnosti u uzorcima linije 84-28A, dok se u liniji OS 942 i hibridu OS 404 ukupna antioksidativna aktivnost nije značajno promijenila, u odnosu na kontrolne uzorke. FRAP metodom je utvrđen porast ukupne antioksidativne aktivnosti u uzorku linije 84-28A tretiranog s 375 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. Porast ukupne antioksidativne aktivnosti, u odnosu na kontrolu, zabilježen je i u slučaju hibrida

OS 404, samo nakon tretmana s $375 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. Ulusu et al. [49] koristili su izdanke peršina izložene kadmiju za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta. Korištene su koncentracije kadmija 75, 150 i $300 \mu\text{mol/L}$. Utvrđeno je povećanje antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u uzorcima tretiranim sa 150 i $300 \mu\text{mol/L}$. Također, DPPH metodom je utvrđeno povećanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, usporedno s povećanjem korištene koncentracije kadmija [49]. Karalija et al. [50] istražili su utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost i druga svojstva kukuruza. DPPH metodom je određeno smanjenje antioksidacijske aktivnosti, u uzorcima kukuruza koji su bili izloženi kadmiju, u odnosu na kontrolne uzorke [50]. Činjenica da je u ovom istraživanju došlo do smanjenja ukupne antioksidativne aktivnosti u nekim uzorcima, može ukazivati na to da se izdanci nisu u potpunosti uspjeli prilagoditi na stresne uvjete uzrokovane kadmijem.

Prolin je neesencijalna aminokiselina koja se biosintetizira u kloroplastima i citoplazmi biljnih stanica, a ima važnu ulogu u raznim fazama razvoja biljke i njenih sjemenki te cvjetanja. Prekursori za biosintezu prolina su ornitin i glutamat. Biljke ga mogu sintetizirati u prisustvu i odsustvu stanja abiotičkog stresa. Ovaj metabolit omogućuje biljkama zaštitu, prilagodbu i toleranciju stresa izazvanog djelovanjem kadmija. Osim što je zaslužan za održavanje osmotskog potencijala, stabilizaciju membranskih struktura te redukciju oksidativnog stresa [36], prolin također služi kao izvor ugljika i dušika te regulator pH vrijednosti [51]. Akumulacija prolina u biljkama je odgovor biljke na stanje stresa nastalog prilikom izlaganja kadmiju [36]. Semida et al. [52] su proveli istraživanje utjecaja kadmija na proizvodnju prolina u krastavcu, a Rady et al. [53] su proučavali isto u grahu (*Phaseolus vulgaris*). U oba istraživanja se pokazalo da uslijed izlaganja sadnice kadmiju, dolazi do povećane proizvodnje prolina u različitim dijelovima biljaka. Iste su rezultate dobili Hatamian et al. [54] u istraživanju utjecaja kadmija na proizvodnju prolina u kosteli (*Celtis australis*). Biljke poput masline (*Olea europaea*, L.) pokazuju povećanje količine prolina i u korijenju i listovima, kada su izložene djelovanju kadmija, dok su razine kadmija bile smanjene [55]. Poznato je da se kadmij akumulira u gotovo svim dijelovima biljaka, posebice u korijenju [9]. Ling et al. [56] su istražili promjene razina prolina u korijenju kukuruza u uvjetima opskrbe različitim koncentracijama kadmija. Njihovo istraživanje je pokazalo linearni porast prolina u korijenju, kada su uvjeti uzgoja uključivali korištenje koncentracija kadmija manjih od $50 \mu\text{mol/L}$. Tretmani od 50 do $100 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ nisu pokazali značajne

razlike. Najveća količina prolina je uočena pri tretmanu sa 400 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. Još veće koncentracije kadmija izazvale su smanjenje sadržaja prolina [56]. Na temelju rezultata dobivenih određivanjem prolina u ovom istraživanju, utvrđeno je da je došlo do povećanja količine prolina samo u izdancima kukuruza linije 84-28A nakon tretmana sa 150 $\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. Količina prolina u ostalim uzorcima nije se statistički razlikovala u odnosu na kontrolni uzorak za oba tretmana kadmijem. Ling et al. [56] navode da povećana količina prolina ukazuje na mogućnost prilagodbe kukuruza na vanjske uvjete, mijenjanjem koncentracije prolina. Smanjenje količine prolina u izdancima kukuruza analiziranih u ovom istraživanju, mogu biti rezultat hiperakumulacije kadmija u korijenju, posebice pri visokim koncentracijama Cd^{2+} , stoga Cd^{2+} nije prisutan u izdancima kukuruza u dovoljnim količinama da izazove povećanje sadržaja prolina [56].

6. ZAKLJUČAK

Pokazalo se da je kadmij utjecao na antioksidativnu aktivnost kukuruza (*Zea mays*, L.). Utvrđena je akumulacija proteina u uzorcima tretiranim s Cd150. Linija 84-28A je nakon tretmana s Cd375 pokazala pad koncentracije proteina. Pokazalo se da pad ukupne antioksidativne aktivnosti prati pad sadržaja ukupnih topljivih polifenola. Kod biljaka tretiranih s Cd150 uočeno je smanjenje sadržaja ukupnih topljivih polifenola. Nasuprot tome, došlo je do povećanja sadržaja polifenola u uzorcima hibrida OS 404 i linije 84-28A, što može biti pokazatelj da je biljka razvila dobar mehanizam obrane protiv kadmijem izazvanog oksidativnog stresa. Izdanci kukuruza su pokazali smanjenje ukupne antioksidativne aktivnosti, osim OS 404 i 84-28A tretiranih s Cd375, u kojima se ukupna antioksidativna aktivnost povećala. Smanjenje ukupne antioksidativne aktivnosti može upućivati na nedovoljno dobru prilagodbu biljaka na utjecaj kadmija. Do porasta sadržaja prolina došlo je samo u uzorcima linije 84-28 A , tretiranim s Cd150. Smanjenje sadržaja prolina u ostalim uzorcima izdanaka kukuruza može biti rezultat hiperakumulacije kadmija u korijenju. Dobiveni rezultati ukazuju na značajan utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost kukuruza (*Zea mays*, L.).

7. LITERATURA

- [1] S. Stanner, E. Weichselbaum, *British Nutrition Foundation* **2** (2005) 138-147.
- [2] J. Flieger, W. Flieger, J. Baj, R. Maciejewski, *Materials* **14** (2021), 41315.
- [3] I. Parčetić – Kostelac, D. Bešlo, M. Šperanda, T. Kopačin, A. Jozinović, T. Jović, M. Đidara, *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva* **70** (2016), 71-92.
- [4] A. W. K. Yeung, N. T. Tzvetkov, O. S. El.Tawil, S. G. Bungau, M. M. Abdel-Daim, A. G. Atanasov, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2019), 1-11.
- [5] P. Ahmad, C. A. Jaleel, M. A. Salem, G. Nabi, S. Sharma, *Critical Reviews in Biotechnology* **30** (2010), 161-175.
- [6] H. Nawaz, S. Muzaffar, M. Aslam, S. Ahmad, *Corn – Production and Human Health in Changing Climate* (2018), 49-68.
- [7] <https://www.britannica.com/science/cadmium> (20.7.2023.)
- [8] M. Franić, V. Galić, Z. Lončarić, D. Šimić, *Agronomy*, **10** (2020), 986.
- [9] U. Zulfiqar, W. Jiang, W. Xiukang, S. Hussain, M. Ahmad, M. F. Maqsood, N. Ali, M. Ishfaq, M. Kaleem, F. U. Haider, N. Farooq, M. Naveed, J. Kucerik, M. Brtnicky, A. Mustafa, *Frontiers in Plant Science* **13** (2022), 773815.
- [10] World Health Organization [WHO], *Health Risks of Heavy Metals from Long-Range Transboundary Air Pollution* (2007).
- [11] M. Asgher, M. Khan, M. I. R. Anjum, N. A. Khan, *Protoplasma* **252** (2014), 399-413.
- [12] H.-Y. Yu, C. Liu, J. Zhu, F. Li, D.-M. Deng, Q. Wang, C. Liu, *Environmental Pollution* **209** (2016), 38-45.
- [13] S. Sauve, S. Manna, M.-C. Turmel, A. G. Roy, F. Courchesne, *Environmental Science & Tehnology* **37** (2003), 5191-5196.
- [14] M. B. Kirkham, *Geoderma* **137** (2006), 19-32.
- [15] I. Maksimović, R. Kastori, L. Krstić, J. Luković, *Biologia Plantarum* **51** (2007), 589-592.

- [16] M. Balestri, A. Ceccarini, L. M. C. Forino, I. Zelko, M. Martinka, A. Lux, M. Ruffini Castiglione, *Planta* **239** (2014), 1055-1064.
- [17] Z. Guo, X. Miao, *Journal of Central South University of Technology* **17** (2010), 770-777.
- [18] A. G. Dobrikova, E. L. Apostolova, A. Hanc, E. Yotsova, P. Borisova, I. Sperdoui, I.-D. S. Adamakis, M. Moustakas, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **209** (2021), 111851.
- [19] M. Franić, V. Galić, *Plant Metallomics and Functional Omics* (2019), 209-251.
- [20] T. Zhu, L. Li, Q. Duan, X. Liu, M. Chen, *Plant Signaling & Behavior* **16** (2020), 1836884.
- [21] K. Eraković, *Parametri oksidacijskog stresa u premalignim promjenama vrata maternice*, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, diplomski rad, 2019.
- [22] S. A. Anjum, M. Tanveer, S. Hussain, E. ullah, L. Wang, I. Khan, R. A. Samad, S. A. Tung, M. Anam, B. Shahzad, *CLEAN-Soil, Air, Water* **44** (2015), 29-36.
- [23] S. Caffarri, T. Tibiletti, R. Jennings, S. Santabarbara, *Current Protein & Peptide Science* **15** (2014), 296-331.
- [24] B. Ashwin Kumar, P. V. K. J. Rao, L. Edukondalu, *International Journal of Agriculture Sciences* **9** (2017), 4338-4341.
- [25] P. Barnwal, D. M. Kadam, K. K. Singh, *International Agrophysics* **26** (2012), 331-334.
- [26] S. Siyuan, L. Tong, R. H. Liu, *Food Science and Human Wellness* **7** (2018), 185-195.
- [27] <https://www.plantea.com.hr/kukuruz/> (1.8.2023.)
- [28] I. S. Brar, A. K. Dixit, R. Khurana, A. Gautam, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6** (2017), 963-970.
- [29] I. González Gongora, A. Tarón Dunoyer, L. A. García-Zapateiro, *Contemporary Engineering Sciences* **11** (2018), 257-268.

- [30] S. A. Anjum, M. Tanveer, S. Hussain, M. Bao, L. Wang, I. Khan, E. Ullah, S. A. Tung, R. A. Samad, B. Shahzad, *Environmental Science and Pollution Research* **22** (2015), 17022-17030.
- [31] X. Xu, C. Liu, X. Zhao, R. Li, W. Deng, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **93** (2014), 618-624.
- [32] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **72** (1976), 248-254.
- [33] N. Bibi Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin, M. F. Mahomoodally, *Antioxidants* **9** (2020), 709.
- [34] F. Xiao, T. Xu, B. Lu, R. Liu, *Food Frontiers* **1** (2020), 60-69.
- [35] P. Carillo, Y. Gibon, *PROTOCOL: Extraction and determination of proline. PrometheusWiki* (2011).
- [36] T. El Rasafi, A. Oukarroum, A. Haddioui, H. Song, E. E. Kwon, N. Bolan, F. Tack, A. Sebastian, P. Majeti, J. Rinklebe, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **52** (2020), 1-52.
- [37] M. Rizwan, A. Shafaqat, M. Adrees, I. Muhammad, D. C. W. Tsang, M. Zia-ur-Rehman, Z. A. Zahir, J. Rinklebe, F. M. G. Tack, Y. S. Ok, *Chemosphere* **182** (2017), 90-105.
- [38] J. Bae, D. L. Benoit, A. K. Watson, *Environmental Pollution* **213** (2016), 112-118.
- [39] S. Li, J. Chen, E. Islam, Y. Wang, J. Wu, Z. Ye, W. Yan, D. Peng, D. Liu, *Chemosphere* **153** (2016), 107-114.
- [40] R. Lin, X. Wang, Y. Luo, W. Du, H. Guo, D. Yin, *Chemosphere* **69** (2007), 89-98.
- [41] A. Medyńska-Juraszek, M. Bednik, P. Chohura, *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17** (2020), 7861.
- [42] E. M. R. Metwali, S. M. H. Gowayed, O. A. Al-Maghrabi, Y. Y. Mosleh, *World Applied Sciences Journal* **21** (2013), 301-314.
- [43] T. C. Squier, *Experimental Gerontology* **36** (2001), 1539-1550.
- [44] K. J. Salih, O. Duncan, L. Li, B. O'Leary, R. Fenske, J. Trösch, A. H. Millar, *The Plant Journal* **103** (2020), 128-139.

- [45] M. Rakszegi, E. Darkó, A. Lovegrove, I. Molnár, L. Láng, Z. Bedő, M. Molnár-Láng, P. Shewry, *PLOS ONE* **14** (2019), e0211892.
- [46] H. Hichem, D. Mounir, E. A. Naceur, *Industrial Crops and Products* **30** (2009), 144-151.
- [47] S. Zhang, J. Ji, S. Zhang, W. Xiao, C. Guan, G. Wang, Y. Wang, *Journal of Cereal Science* **96** (2020), 103113.
- [48] B. Márquez-García, M. Á. Fernández-Recamales, F. Córdoba, *Journal of Botany* **2012** (2012), 1-6.
- [49] Y. Ulusu, L. Öztürk, M. Elmastaş, *Russian Journal of Plant Physiology* **64** (2017) 883-888.
- [50] E. Karalija, A. Selović, *Environmental Science and Pollution Research* **25** (2018), 33370-33380.
- [51] M. Pál, E. Horváth, T. Janda, E. Páldi, G. Szalai, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **169** (2006), 239-246.
- [52] W. M. Semida, K. A. Hemida, M. M. Rasy, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **154** (2018), 171-179.
- [53] M. M. Rady, A. S. Elrys, M. F. Abo El-Maati, E.-S. M. Desoky, *Plant Physiology and Biochemistry* **139** (2019), 558-568.
- [54] M. Hatamian, A. R. Nejad, M. Kafi, M. K. Souri, K. Shahbazi, *Heliyon* **6** (2020), e03247.
- [55] M. Zouari, C. Ben Ahmed, N. Elloumi, K. Bellassoued, D. Delmail, P. Labrousse, F. B. Abdallah, B. B. Rouina, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **128** (2016), 195-205.
- [56] T. Ling, Q. Gao, H. Du, Q. Zhao, J. Ren, *Chemical Speciation & Bioavailability* **29** (2017), 216-221.

8. ŽIVOTOPIS AUTORA

Osobni podatci

Ime i prezime: Marta Malović

Datum i mjesto rođenja: 19. rujna 1999. Čakovec

e-mail: marta.malovic@gmail.com

Obrazovanje

2021. – 2023. Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

2018. – 2021. Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

2014. – 2018. Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec

smjer: jezična gimnazija

Stručna praksa

8.5.2023. – 11.5.2023. Inspecto d.o.o.

Osobna i akademska postignuća

ERASMUS: BIP kolegij Nanomaterials, Universität Paderborn, Fakultät für Naturwissenschaften, Paderborn, Njemačka

Rektorova nagrada za ak. god. 2021./2022

Sudjelovanje na konferencijama

22.10.2022. 7. Simpozij studenata kemičara (pasivan sudionik)

2.5.2022. – 7.5.2022. Festival znanosti

Osobne vještine

Strani jezici: engleski i njemački

Računalne vještine: vrlo dobro poznavanje rada na računalu i internetu te aktivno korištenje MS Office programskog paketa

Vozačka dozvola: B kategorija