

Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja imele (*Viscum Album*)

Lujanac, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:182:742168>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Josip Lujanac

PROCJENA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA
FIZIOLOŠKOG STANJA IMELE (*Viscum album* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Josip Lujanac

PROCJENA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA
FIZIOLOŠKOG STANJA IMELE (*Viscum album* L.)

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentorica: doc. dr. sc. Lidija Begović

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

PROCJENA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA FIZIOLOŠKOG STANJA

IMELE (*Viscum album L.*)

Josip Lujanac

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

Mentor: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentor: doc.dr.sc. Lidija Begović

Sažetak:

Bijela imele (*Viscum album L.*) je poluparazitska biljka koja raste na različitim drvenastim vrstama. Zbog svojih protuupalnih, antibakterijskih i antitumorskih svojstava upotrebljava se u liječenju različitih bolesti i stanja. Posebno se ističu antioksidativna svojstva imele koja ovise o vrsti domaćina na kojem parazitira, regiji i vremenu uzorkovanja. U ovom je radu ispitivan utjecaj lokacije i vremena uzorkovanja na biokemijski sastav i antioksidativnu aktivnost svježe ubranih uzoraka imele te gotovih čajnih pripravaka imele. Veći sadržaj ukupnih topljivih polifenola, antioksidativna aktivnost i koncentracije karotenoida i ukupnog klorofila uočene su u uzorcima ubranima u listopadu u odnosu na one ubrane u veljači. Svježih uzorci i čaj nisu pokazali značajnu razliku u ispitivanim parametrima izuzev uzoraka u Istri, Petrijevcima i Aljmašu. Uočene su razlike između svježe ubranih uzoraka lista i grančica te sadržaja ukupnih topljivih polifenola i antioksidativne aktivnosti pojedinih čajnih pripravaka. Rezultati metode analize glavnih komponenata ukazao je na određena grupiranja među uzorcima sukladno rezultatima biokemijskih analiza. Dobiveni rezultati potvrđuju utjecaj lokacije i sezonskih varijacija na fitokemijski sastav imele.

Diplomski rad obuhvaća: 28 stranica, 13 slika, 1 tablicu i 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: imele / antioksidativna aktivnost / polifenoli / karotenoidi / klorofili / analiza glavnih komponenata /

Rad prihvaćen: 16.09.2021.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. doc.dr.sc. Lidija Begović, komentorica i članica
4. doc. dr. sc. Olivera Galović, zamjena člana

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

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Chemistry

Scientific Field: Chemistry

**ESTIMATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE PHYSIOLOGICAL STATE
OF MISTLETOE (*Viscum album* L.)**

Josip Lujanac

Thesis completed at: Department of Chemistry and Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD

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

Abstract:

Common mistletoe (*Viscum album* L.) is a semi-parasitic plant that grows on various woody species. Due to its anti-inflammatory, antibacterial and antitumor properties, it is used in the treatment of various diseases and conditions. Particular emphasis is placed on the antioxidant properties of mistletoe, which depend on host type on which it parasitizes, the region and the sampling time. In this paper, the influence of location and sampling time on the biochemical composition and antioxidant activity of freshly harvested mistletoe samples and mistletoe tea preparations was investigated. Higher content of total soluble polyphenols, antioxidant activity, and concentrations of carotenoids and total chlorophyll were observed in samples harvested in October in comparison to those harvested in February. Fresh samples and tea did not show a significant difference in the examined parameters except for the samples in Istria, Petrijevi and Aljmaš. Differences were observed between freshly harvested samples of leaves and twigs and the content of total soluble polyphenols and antioxidant activity among individual tea preparations. The result of the principal components analysis method indicated certain groupings among the samples in accordance with the results of biochemical analyses. The obtained results confirm the influence of location and seasonal variations on the phytochemical composition of mistletoe.

Thesis includes: 28 pages, 13 figures, 1 table and 43 references

Original in: Croatian

Keywords: mistletoe / antioxidant activity / polyphenols / carotenoids / chlorophyll / principal component analysis

Thesis accepted: 16.09.2021.

Reviewers:

1. Assoc. Prof. Vlatka Gvozdić, PhD, chair
2. Assist. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, supervisor and member
3. Assist. Prof. Lidija Begović, PhD, co-supervisor and member
4. Assist. Prof. Olivera Galović, PhD, substitute member

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Imela	2
2.2. Ljekovita svojstva.....	3
2.3. Antioksidativna aktivnost	4
2.4. Utjecaj okolišnih čimbenika na biokemijski sastav.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. Biljni materijal.....	8
3.2. Kemikalije	9
3.3. Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola	10
3.4. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	11
3.4.1. 2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil (DPPH) metoda	11
3.4.2. Iron (III) Reducing Antioxidant Capacity (iRAC) metoda	12
3.4.3. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) metoda.....	12
3.5. Određivanje koncentracije karotenoida i ukupnog klorofila	13
3.6. Statistička obrada podataka	14
3.6.1. Statistička obrada podataka	14
3.6.2. Analiza glavnih komponenata	14
4. REZULTATI	15
4.1. Ukupni sadržaj topljivih polifenola u svježim uzorcima i čaju imele	15
4.2. Antioksidativna aktivnost izmjerena DPPH metodom.....	16
4.3. Antioksidativna aktivnost izmjerena FRAP metodom.....	17
4.4. Antioksidativna aktivnost izmjerena iRAC metodom.....	18
4.5. Sadržaj karotenoida i ukupnog klorofila	19
4.6. Analiza glavnih komponenata (PCA).....	20
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČAK.....	24
7. LITERATURA	25
8. ŽIVOTOPIS	28

1. UVOD

Klima, podneblje i zagađenje su čimbenici koji mogu uzrokovati promjene u biokemijskom sastavu biljke. Saznanja o utjecaju okoline na sadržaj pojedinih komponenti u biljci važna su kako bi se odredio najpogodniji period branja i iskoristio sav potencijal biljke [1].

Biokemijski sastav biljke upućuje na njezinu potencijalnu primjenu za ublažavanje ili liječenje raznih tjelesnih stanja i oboljenja. Polifenoli, flavonoidi i drugi spojevi prisutni u imeli imaju antioksidativno djelovanje i štite organizam od štetnih reaktivnih kisikovih jedinki te su zaslužni su za njezina ljekovita svojstva [2, 3].

Europska imela (*Viscum album L.*) je zimzeleni viseći žućkasti grm koji raste kao poluparazit na raznom drveću poput vrbe, topole, jabuke i drugih drvenastih vrsta. Upotrebu je pronašla u narodnoj medicini u obliku biljnih pripravaka. S obzirom da je imela poluparazit, biokemijski sastav može varirati u ovisnosti o vrsti drveta domaćina, podneblju i okolišnim čimbenicima [4].

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj podrijetla biljnog materijala (čaj i svježe ubrani uzorci), vremena uzorkovanja i lokacije na biokemijski sastav imele, uključujući sadržaj ukupnih topljivih polifenola, antioksidativnu aktivnost i koncentraciju karotenoida i ukupnog klorofila. Kako bi se odredile moguće sličnosti odnosno razlike među uzorcima, na podatke je primijenjena metoda analize glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Imela

Europska imela (*Viscum album* L.) pripada obitelji Santalaceae, koja broji 11 rodova i više od 450 vrsta. Rasprostranjena je diljem Euroazije, od Velike Britanije do sjeverne Azije. Većina vrsta posjeduje zajednički poluparazitski oblik rasta. Poluparazitske biljke se vežu na drvo domaćina pomoću posebnog sustava žila (haustorije) putem kojih uzimaju vodu i minerale, a posjeduju sposobnost fotosinteze što im omogućava samostalnu proizvodnju hranjivih tvari i drugih važnih spojeva [1].

Imela je zimzelena biljka koja, na grani drveta domaćina, formira viseći žućkasti grm promjera između 60 i 90 cm (slika 1). Grane formiraju gustu račvastu strukturu s kožastim lišćem ovalnog do kopljastog oblika. Listovi imele su žutozeleni, kožasti i duguljasti [5]. Cvjetovi su jednospolni i dvodomni. Cvatu krajem zime, od veljače do travnja. Plodovi su bijele okruglaste bobice koje dozrijevaju zimi, a kada su zrele, sadrže ljepljivu polu-prozirnu pulpu. Bobice europske imele, kao i drugih vrsta, sadrže toksične spojeve za većinu životinja i ljude. Najčešće raste na drveću jabuke, vrbe, topole i drugih drvenastih vrsta [5].



Slika 1. Grm imele na drvetu domaćina.

Cvjetovi se oprašuju pomoću životinja, a rasprostranjivanje većine vrsta imele odvija se pomoću ptica, no sudjeluju i druge životinje, za koje bobice nisu otrovne [1].

2.2. Ljekovita svojstva

Zbog bogatog sastava koji uključuje spojeve poput: polifenola, flavonoida, alkaloida, triterpena, amina i mnogih drugih, imele posjeduje značajnu biološku i farmakološku aktivnost. Stoga se koristi u narodnoj medicini diljem svijeta za liječenje bolesti poput kardiovaskularnih poremećaja, epilepsije, neplodnosti, hipertenzije i artritisa [6]. Izolirani sastojci i ekstrakti dobiveni od europske imele pokazali su značajno medicinsko djelovanje u eksperimentalnim modelima i kod pacijenata oboljelih od raka, autoimunih bolesti i s raznim upalnim stanjima [7]. U brojnim je istraživanjima ispitivan utjecaj ekstrakata imele na različita stanja i bolesti. Khan i sur. [8] su istražili utjecaj ekstrakta imele na relaksaciju glatkog mišićnog tkiva probavnog i krvožilnog sustava. U istraživanju je korišteno glatko tkivo sa spontanim ritmičkim kontrakcijama što omogućava direktnu procjenu djelovanja relaksirajućeg utjecaja ekstrakata. Rezultati su pokazali anti-kontraktivni utjecaj ovisan o primijenjenoj dozi ekstrakta, sličan *Verapamil*¹ lijeku [8].

Upalne bolesti su među čestim zdravstvenim problemima koji se liječe tradicionalnom medicinom. Stoga je istraživanje novih bioaktivnih spojeva u biljkama važno u otkrivanju potencijalnih prirodnih lijekova za liječenje upalnih procesa. U istraživanju koje su proveli Orhan i sur. [9] utvrđena su izvrsna protuupalna i antinociceptivna² svojstva imele u liječenju glavobolje i nekih upalnih bolesti. Izolirano je 5 flavonoida iz biljke te je ispitano njihovo djelovanje u koncentraciji 30 mg/kg. Dva flavonoida pokazala su izvrsno protuupalno i analgetsko djelovanje, dok je djelovanje ostala 3 bilo nešto slabije. Primijenjena doza nije izazvala akutnu toksičnost niti oštećenja želudca [9].

Među brojnim pozitivnim učincima imele je i njezino antimikrobno djelovanje. Mikrobi mogu značajno naštetiti organizmu, a biljni pripravci i ekstrakti često se koriste za njihovo suzbijanje. Istraživanje antimikrobnog djelovanja niza biljnih ekstrakata, uključujući biljke *Inula aucherana*, *Fumaria officinalis*, *Crocus sativus*, *Viscum album*, *Tribulus terrestris*, i dr. proveli su Sengul i sur. [10]. Svi su ekstrakti pokazali vrlo dobru antimikrobnu aktivnost na brojnim vrstama mikroorganizama pri čemu je imele je pokazala antimikrobnu aktivnost protiv 9 od 32 vrste bakterija. Također, otkriveno je da i vrsta otapala može imati utjecaj na razinu antimikrobnog djelovanja pa tako ekstrakt ekstrahiran metanolom ima bolje djelovanje od vodenog ekstrakta [10].

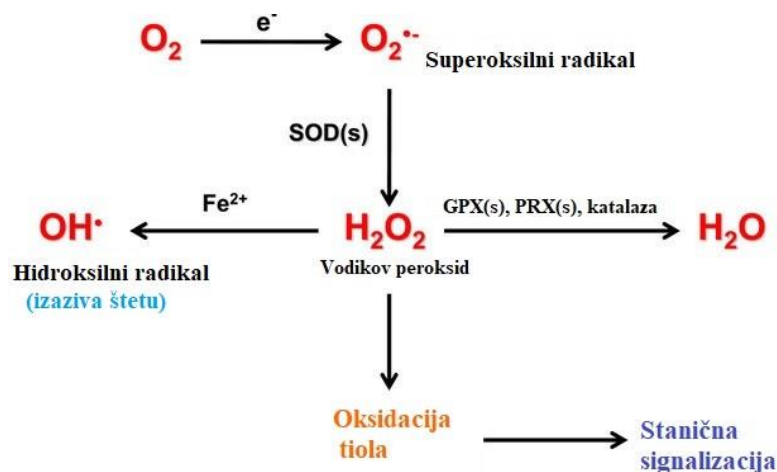
¹ Blokator kalcijevih kanala koji se koristi za opuštanje mišića

² Ublaživanje ili otklanjanje osjeta bola prouzročeno primjenom analgetika ili lokalnih anestetika

S porastom broja oboljelih od dijabetesa raste i interes za prirodnim pripravcima koji pomažu u borbi protiv ove bolesti. Kim i sur. [11] ispitali su djelovanje ekstrakta korejske imele (KME) na dijabetes. Pokazano je da su proteinske frakcije, dobivene iz ekstrakta ionskom kromatografijom u kombinaciji s taloženjem amonijevim sulfatom, stimulirale beta stanice gušterače štakora na lučenje inzulina. Uočeno je i povećanje ekspresije transkripcijskih faktora PDX-1 i beta 2/neuro D, ključnih za indukciju ekspresije gena inzulina. Također, tretman ekstraktom korejske imele, rezultirao je regeneracijom i sprječavanjem uništenja beta stanica gušterače u miševima s hiperglikemijom induciranom aloksanom³ [11].

2.3. Antioksidativna aktivnost

Oksidacijske reakcije neophodne su za živi svijet jer pomažu u održavanju složenih biokemijskih reakcija organizma, no mogu biti i vrlo štetne za stanicu te uzrokovati oštećenja DNA molekula. Općenito, oksidacija je proces u kojem dolazi do otpuštanja elektrona iz atoma, molekule ili iona. Ukoliko molekula kisika primi nespareni elektron nastaje slobodni superoksidni radikal, koji je izrazito reaktivan i štetan, te može uzrokovati brojne lančane reakcije koje uništavaju stanicu i stanične strukture (slika 2).



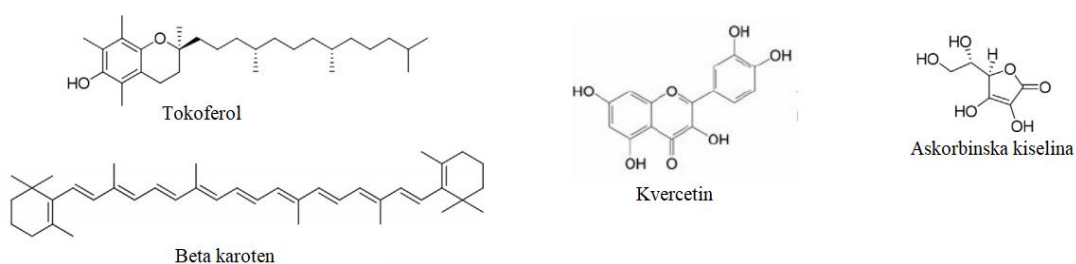
Slika 2. Prikaz mehanizma nastanka superoksidnog radikala i njegovog metabolizma djelovanjem enzima superoksid-dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPX), peroksidoksin (PRX). Preuzeto i prilagođeno iz [3]

³ organski spoj koji selektivno uništava beta stanice gušterače koje proizvode inzulin. Koristi se za induciranje dijabetesa u pokusnim životinjama.

Brojni abiotički stresori uzrokuju nastanak niza reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji dovode do oštećenja tkiva što rezultira brojnim bolestima uključujući bolesti srca, jetre, rak, neurodegenerativne bolesti i starenje [3]. Antioksidans je bilo koji spoj koji u niskoj koncentraciji odgađa oksidaciju proteina, ugljikohidrata, lipida i DNA. Oni sprječavaju ili uklanjaju bolesti uzrokovane oksidativnim stresom tako što poništavaju štetni utjecaj ROS-a [3, 12]. Antioksidansi se mogu klasificirati u tri glavne kategorije:

1. Antioksidansi prve linije obrane uključuju enzime superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT) i glutation-reduktazu (GR) te minerale poput Se, Cu, Zn i dr.
2. Antioksidansi druge linije obrane uključuju glutation (GSH), vitamin C, albumin, vitamin E, karotenoide, flavonoide, itd. (slika 3).
3. Antioksidansi treće linije obrane uključuju kompleksnu skupinu enzima odgovornih za popravak DNA, oštećenih proteina, oksidiranih lipida i peroksida. Primjer su lipaze, proteaze, transferaze i dr. [12].

Razlikujemo endogene i sintetički antioksidanse. Endogeni antioksidansi su prirodnog podrijetla kao što su to vitamini E, A, C, flavonoidi, enzimi, metationin, glutation. Sintetički antioksidansi su vrlo jaki i često se dodaju hrani kako bi se spriječilo njezino kvarenje. Ovi antioksidansi odgađaju i/ili inhibiraju oksidaciju i smanjenje kvalitete hrane, no također mogu imati i pozitivan utjecaj na očuvanje enzimskih sustava i DNA kod ljudi [13].



Slika 3: Primjeri struktura antioksidanasa

Biljka imele posjeduje dobru antioksidativnu aktivnost zbog čega se često koristi za dobivanje čaja i čajnih pripravaka. Izražena antioksidativna aktivnost posljedica je bogatog sadržaja polifenola u biljci. Sam sadržaj varira u ovisnosti o vrsti biljke, drvu domaćina na kojem raste, te o vremenu berbe [14,15]. Primijećeno je da ekstrakti imele koji rastu na

drvetu limete i rogača potpuno inhibiraju štetno djelovanje H₂O₂ na mitohondrijsku DNA u HeLa stanicama za razliku od ekstrakta imele koja je rasla na klen javoru kod kojih je inhibicija bila samo 50 % [16].

Brojna su i istraživanja antioksidativne aktivnosti imele u području anti-tumorskog djelovanja. Osim testiranja direktnog utjecaja samog ekstrakta imele, ispitivana su i sinergistička djelovanja s kemoterapijskim lijekovima. Istraživanja su pokazala da je ekstrakt imele uzrokovao značajnu inhibiciju metastaziranja B16 melanomskih stanica u pluća miševa. Standardizirani ekstrakt imele primijenjen je u dozama 3, 30 i 150 ng/kg, jednom dnevno u trajanju od 3 tjedna [17]. Istraživanje provedeno u cilju otkrivanja sinergističkog djelovanja imele i kemoterapijskog lijeka *Doxorubicina* na mijeloidnim K562 stanicama leukemije pokazalo je dobre rezultate. Otkriveno je da imela pojačava anti-leukemijsko djelovanje *Doxorubicina* na K562 stanica [2, 7].

2.4. Utjecaj okolišnih čimbenika na biokemijski sastav

Utjecaj klime, tla, zagađenja i drugih parametara na rast i razvoj, a samim time i na biokemijski sastav biljke, poznat je od davnina. U antičkoj Grčkoj i Rimu su primijetili da različiti tipovi tla, erozija i drugi aspekti kvalitete tla, mogu utjecati na razvoj biljke i njeno fiziološko stanje [18]. Na biokemijski sastav imele znatan utjecaj imaju vrsta tla i klima u kojoj raste drvo domaćina. Kako bi mogla preživjeti, imela uzima nutrijente od drveta na kojem parazitira, stoga vrsta drveća ima znatan utjecaj i na njezin biokemijski sastav [1]. Brojna istraživanja su potvrdila taj utjecaj ispitujući sastav polifenola i flavonoida, antioksidativnu aktivnost i druge parametre. Jedno od takvih istraživanja su proveli Majeed i sur. (2021) [19] u kojem su utvrdili korelaciju između ovisnosti sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti s drvetom domaćina. Ekstrakt dobiven od lišća imele uzorkovanog s drveta domaćina *Juglans regia* L. imao je višu antioksidativnu aktivnost u usporedbi s ekstraktom imele koja je rasla na drveću vrsta *Populus ciliata* L. i *Ulmus villosa* L. [19]. Utjecaj vrste drveta domaćina su također potvrdili i Pietrzak i Nowak [20] pri čemu su vrijednosti ukupnih polifenola varirale od najniže vrijednosti dobivene kod ekstrakta imele s *Fraxinus excelsior* L. do najviše vrijednosti dobivene za ekstrakt s drveta *Abies alba* Mill. Također su uočene i razlike u ukupnom sastavu flavonoida između ekstrakata s različitih vrsta drveća [20].

Klimatski uvjeti te period uzorkovanja može značajno pridonijeti varijacijama u biokemijskom sastavu biljke. Primjerice, biljka se priprema za zimske mjesece skladištenjem potrebnih nutrijenta i minerala povećavajući njihovu koncentraciju [13,14,15,16]. Također, kišni dani, suša te broj sunčanih sati mogu uvelike utjecati na biokemijski sastav. Utjecaj klime na sastav imele su potvrdili Pietrzak i Nowak [20]. Uzorci imele uzorkovani od veljače do travnja 2017. godine sadržavali su veću količinu polifenola i flavonoida te veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke uzorkovane u istom periodu 2016. godine. Kada su uspoređen vremenske prilike, uočeno je da su u periodu od veljače do travnja 2017. prosječne temperature zraka bile niže u odnosu na iste mjesece 2016. godine, snježni je pokrov bio deblji i duže je trajao, te je bilo manje sunčanih sati. [20].

Na biokemijski sastav imele može utjecati i zagađenje. U uzorcima uzorkovanim u centru grada, gdje je prisutna veća koncentracija dušikova dioksida, uočeno je da imela pokazuje povećanu aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) [21]. Utjecaj zagađenja tla teškim metalima i solima na biljku imele ispitali su Michalczyk i sur. [22]. Otkriveno je da populaciju koja je rasla u gradu karakterizira veća proizvodnja organskih spojeva u odnosu na kontrolnu populaciju sa sela. Ta otkrića indiciraju na imelinu otpornost na štetne utjecaje gradskog okruženja [22]. Imela može biti korisna i kao biološki marker zagađenja okoliša, toksičnih plinova i općenitog zdravlja drveća [21].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Za istraživanje su korišteni uzorci listova i grančica svježe ubranih biljaka imele (*Viscum album* L.) te uzorci čaja imele (Bjelovar, Koprivnica i Voćin čajna mješavina). Svježi uzorci su sakupljeni na lokacijama na području Republike Hrvatske prikazanim na slici 1. Lokacije su: Hum, Istra (Pazin), Karlovac, Bjelovar, Petrijevci, Kopački rit i Aljmaš (tablica 1). Uzorci su prikupljeni u listopadu 2020. i veljači 2021. godine. Svježi uzorci (grančice i listovi) su osušeni na zraku do konstantne mase. Svi uzorci su samljeveni u prah u tarioniku. Za analize sadržaja ukupnih topljivih polifenola i ukupne antioksidativne aktivnosti 0,5 g tkiva ekstrahirano je s 1 mL 70 % metanola tijekom 48 sati na -20°C.



Slika 4: Lokacije prikupljanja uzoraka imele (*Viscum album* L.)

Tablica 1: Lokacije uzorkovanja, vrsta uzorka i vrijeme uzorkovanja imele

Uzorak	Lokacija	Vrsta domaćin	Tip uzorka	Vrijeme uzorkovanja
1	Hum	-	Svježe ubran	listopad
2	Istra (Pazin)	-	Svježe ubran	listopad
3	Karlovac	vrba	Svježe ubran	listopad
4	Petrijevci	vrba	Svježe ubran	listopad
5	Aljmaš	vrba	Svježe ubran	listopad
6	Kopački rit 1	topola	Svježe ubran	veljača
7	Kopački rit 2	topola	Svježe ubran	veljača
8	Kopački rit 3	topola	Svježe ubran	veljača
9	Koprivnica	voćke	Čaj	
10	Bjelovar	voćke	Čaj	
11	Voćin	voćke	Čajna mješavina	

3.2. Kemikalije

Tekući dušik

Aceton, C₃H₆O

22,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH

Bakrov sulfat, CuSO₄

Etanol, C₂H₅OH

Folin-Ciocalteuov reagens, FC

Natrijev karbonat, Na₂CO₃

Galna kiselina, C₇H₆O₅

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

Željezov klorid heksahidrat, FeCl₃·6H₂O

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

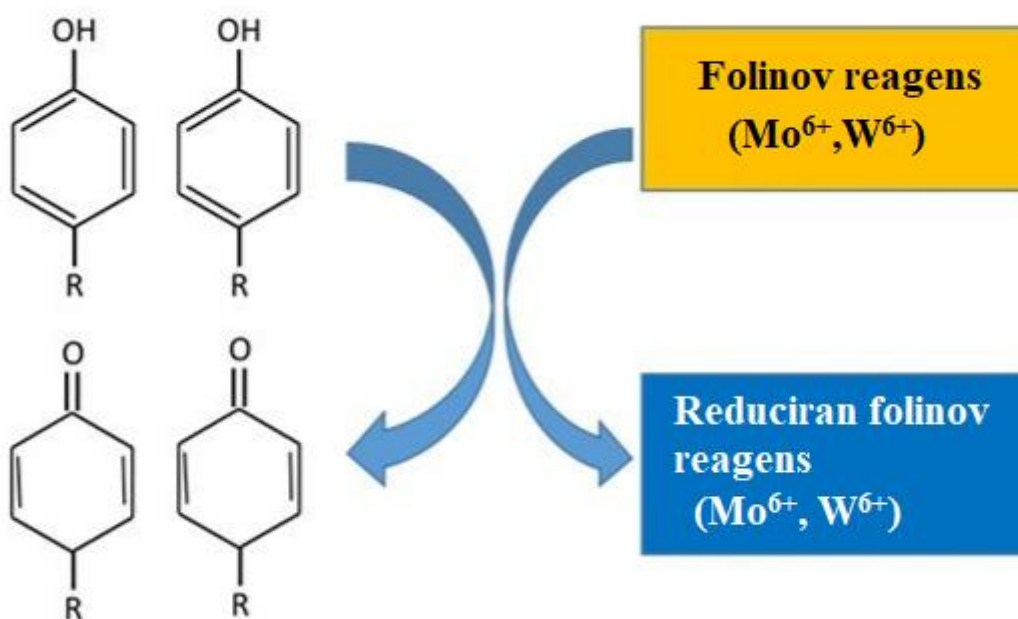
Metanol, CH₃OH

Ferozin i amonij Fe (III) sulfat

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

3.3 Određivanje sadržaja ukupnih topljivih polifenola

Metoda se zasniva na reakciji polifenola i Folin-Ciocalteu reagensa (FC) pri čemu se polifenoli oksidiraju, a FC reagens reducira u plave kromofore konstituirane od fosfovolframovog i fosfomolibdenovog kompleksa (slika 5). Rezultat reakcije je promjena boje reagensa iz žute u plavu koja može poslužiti za kvantifikaciju polifenola pri 765 nm. [23].



Slika 5. Prikaz reakcije Folin-Ciocalteu reagensa i polifenola. Slika preuzeta i prilagođena iz [24].

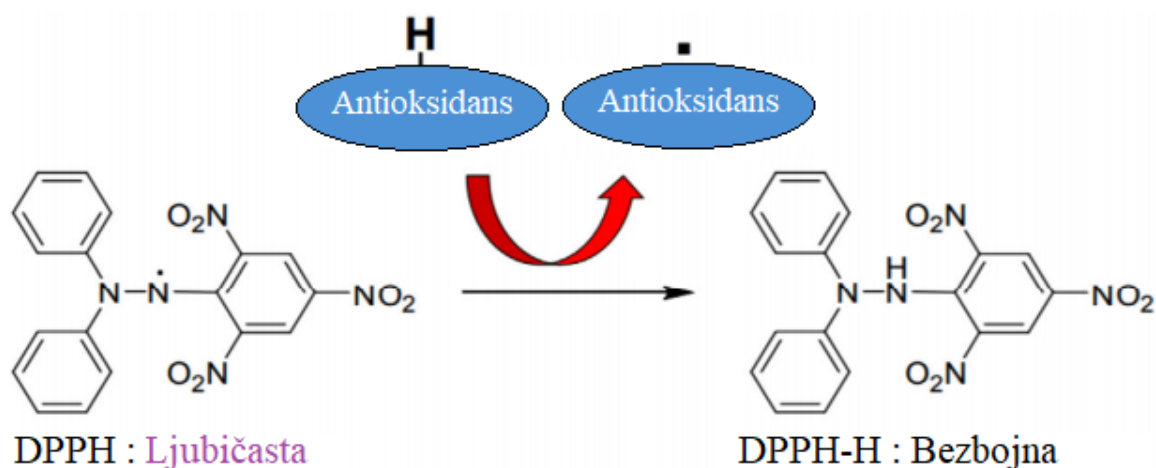
Nakon ekstrakcije, tubice su centrifugirane na 4 °C pri 18000 g u trajanju od 15 min. Odvojeni supernatant razrijeđen je po potrebi. Zatim su pripremljeni reagensi FC i natrijev karbonat. Folin-Ciocalteu reagens je pripremljen razrjeđivanjem s vodom u omjeru 1:2 (v/v). Natrijev karbonat je pripremljen otapanjem 100 g natrijeva karbonata (Na₂CO₃) u 400 mL deionizirane vode i zagrijavanjem do vrenja. Nakon hlađenja, otopina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 500 mL te nadopunjena do oznake. U jažice mikrotitrarske pločice dodano je 10 μL uzorka, 190 μL deionizirane vode i 25 μL Folin-Ciocalteuovog reagensa. Smjesa je promiješana i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 75 μL zasićene otopine Na₂CO₃. Pločica je inkubirana 60 minuta pri temperaturi od 37 °C. Apsorbancija je izmjerena na čitaču mikrotitrarskih pločica (Tecan, Spark) na valnoj duljini

od 765 nm. Baždarna krivulja je izrađena pomoću galne kiseline u rasponu koncentracija od 100 g/mL do 20 g/mL [25].

3.4 Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

3.4.1. 2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil (DPPH) metoda

DPPH slobodni radikal je dugo živući dušikov radikal ljubičaste boje. Kada se otopina DPPH pomiješa s antioksidansom njegova boja prelazi iz ljubičaste u žutu boju odgovarajućeg hidrazina (slika 6). Sposobnost antioksidansa da reducira DPPH se može procijeniti praćenjem smanjenja apsorbancije na 515-528 nm [26].



Slika 6. Prikaz reakcije DPPH i antioksidansa. Slika preuzeta i prilagođena iz [26].

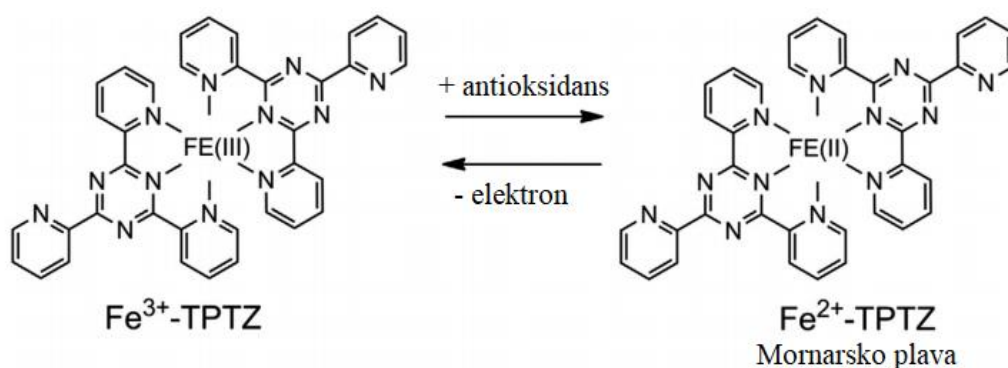
Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani na 18000 g pri 4°C u trajanju od 15 min. Supernatant je odvojen i uzorci su razrijeđeni prije analize. Reagens je pripremljen otapanjem 0,004 g DPPH u 100 mL metanola. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 20 µL uzorka i 180 µL reagensa. Pločica je inkubirana 30 minuta u mraku uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Za izradu baždarne krivulju korišten je trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u rasponu koncentracija od 20 µg/mL do 100 µg/mL [27].

3.4.2. Iron (III) Reducing Antioxidant Capacity (iRAC) metoda

iRAC metoda se zasniva na *Ferric-reducing antioxidant power* (FRAP) metodi koja je prilagođena za rad s mikrotitarskom pločicom i pri uvjetima pH 7 [28]. iRAC reagens se pripremio otapanjem 20 mg ferozina u 18 mL Tris pufera (0,1 M i pH 7,0) i miješanjem s 8 mg amonijevog željezo (III) sulfata otopljenog u 2 mL deionizirane vode. U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica dodano je 20 μL uzorka i 280 μL iRAC reagensa. Za baždarnu krivulju korišten je trolox u rasponu koncentracija od 20 $\mu\text{g/mL}$ do 100 $\mu\text{g/mL}$. Pločica s uzorcima je inkubirana 30 min na 37°C. Apsorbancija je izmjerena na 562 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark) [25].

3.4.3. Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) metoda

FRAP metoda se temelji na redukciji željeznog 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (Fe^{3+} - TPTZ) u Fe^{2+} - TPTZ djelovanjem antioksidansa. Vezanje Fe^{2+} iona uzrokuje vrlo intenzivno plavo obojenje (slika 7). Mjerenjem apsorbancije pri 593 nm se može odrediti količina reduciranog željeznog iona što korelira s količinom antioksidanta [26].



Slika 7. Prikaz reakcije željeznog TPTZ s antioksidansom. Slika preuzeta i prilagođena iz [26].

Reakcijsku smjesu je sačinjavao 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 0,1 mM TPTZ otopljen u acetatnom puferu (pH 3,6). U 180 μL smjese dodano je 5 μL uzorka. Smjesa se izmiješala i inkubirala na sobnoj temperaturi 15 min u mraku. Apsorbancije je mjerena na 593 nm koristeći čitač

mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark). Za baždarnu krivulju je korišten trolox u rasponu koncentracija od 20 µg/mL do 100 µg/mL s reakcijskom smjesom kao standard. Ukupna antioksidativna aktivnost je izražena u ekvivalentima Troloxa (mmol/g suhe tvari).

3.5. Određivanje koncentracije karotenoida i ukupnog klorofila

U prethodno izvagane tubice dodano je 0,05 g suhog tkiva. Uzorcima je dodano 1 mL 100 % acetona, te je ekstrakcija klorofila i karotenoida provedena na temperaturi od -20°C tijekom 24 sata. Nakon ekstrakcije, tubice su centrifugirane na 4 °C pri 18 000 g u trajanju od 15 min. Dobivenom supernatantu je izmjerena apsorbancija na tri različite valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm koristeći spektrofotometar (Specord 40, Analytik Jena). Kao slijepa proba koristio se 100 % acetona. Koncentracije pigmenata su određene prema [29] koristeći slijedeće formule:

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

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

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

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

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

Chl b - koncentracija klorofila b u mg/g mase uzorka

Car - koncentracija karotenoida u mg/g mase uzorka.

A - apsorbancija na određenoj valnoj duljini

V – volumen ekstrakta

m – masa uzorka

3.6. Statistička obrada podataka

3.6.1. Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni u programu Statistica 13.1 (StatSoft Inc. 2015) koristeći analizu varijance *one-way* ANOVA. Nakon toga je provedena *post hoc* analiza uz pomoć Fisher's LSD testa (engl. *least significant difference*). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

3.6.2. Analiza glavnih komponentata

Uobičajene metode univarijantne analize podataka ne pružaju dovoljno mogućnosti za analizu višestrukih opažanja, stoga se u tu svrhu primjenjuju i multivarijantne metode analize (analiza glavnih komponentata, klaster analiza, diskriminacijska analiza, itd.). Rezultati kemijskih analiza počesto ostaju na razini izmjerenih vrijednosti sve dok se ne prouče njihove međusobne korelacije, značajnost, povezanost, sličnosti i razlike. Analiza glavnih komponentata je metoda formiranja sintetskih (novih) varijabli koje su linearne složenice, odnosno kombinacije izvornih varijabli. Glavni aspekti PCA analize su sažimanje i linearna povezanost većeg broja međusobno koreliranih varijabli kako bi se sažele u manji broj komponenti tj. varijabli, međusobno nekoreliranih i sa minimalnim gubitkom informacija [30]. Kako bi se reducirao broj varijabli postupku metode analize glavnih komponentata može prethoditi i jedna od metoda rotacije faktora (Varimax, Quartimax, itd.). Često se u literaturi takav pristup naziva faktorska analiza (FA), iako se zapravo radi o metodi analize glavnih komponentata s rotacijom faktora. Metoda se temelji na tome da set od p varijabli i n opažanja može biti definiran s manjim brojem faktora stoga se i može poslužiti kao redukcijaska metoda [30].

Općenito:

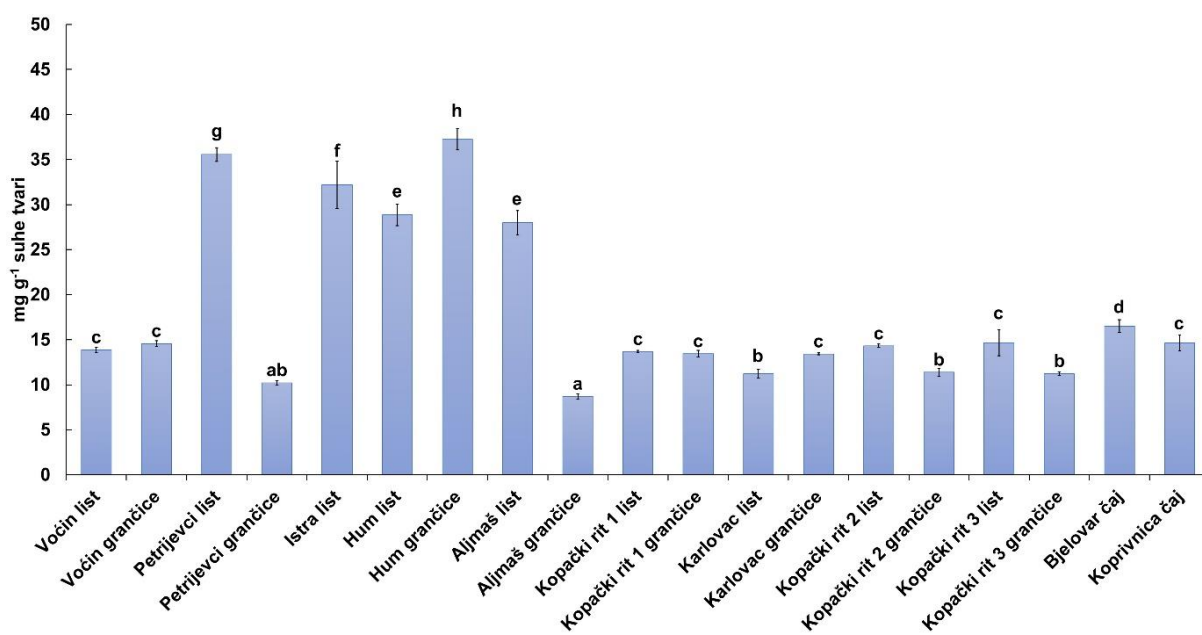
$$PC_i = l_{1i}X_1 + l_{2i}X_2 + \dots + l_{ni}X_n \quad (1)$$

PC_i označava i -tu glavnu komponentu, a l_{ji} faktorsko opterećenje varijable X_j .

4. REZULTATI

4.1. Ukupni sadržaj topljivih polifenola u svježim uzorcima i čaju imele

Najviša vrijednost sadržaja ukupnih topljivih polifenola izmjerena je u uzorcima grančica iz Huma (37,3 mg/g suhe tvari). Potom slijede uzorci listova iz Petrijevac, Istre, Huma i Aljmaša. Najmanji sadržaj ukupnih topljivih polifenola izmjeren je u uzorcima grančica iz Aljmaša (8,7 mg/g suhe tvari).

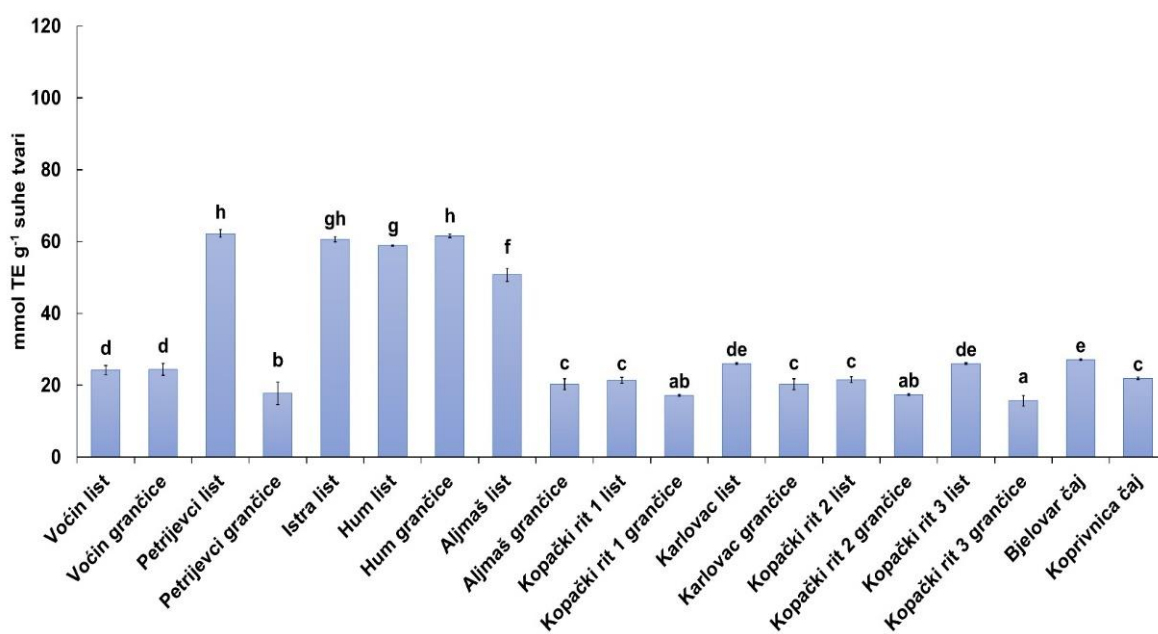


Slika 8. Sadržaj ukupnih topljivih polifenola u svježe ubranim listovima i grančicama imele te čaju nakon 48 sati ekstrakcije u 70% metanolu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

U ostalim uzorcima prikupljenim na područjima Kopačkog rita i Karlovca vrijednosti ukupnih topljivih polifenola varirale su od 10,2-13,4 mg/g suhe tvari. U uzorku čaja iz Bjelovara izmjeren je veći sadržaj polifenola u usporedbi s čajem iz Koprivnice i čajnom mješavinom iz Voćina koja je sadržavala i grančice i listove (slika 8).

4.2. Antioksidativna aktivnost izmjerena DPPH metodom

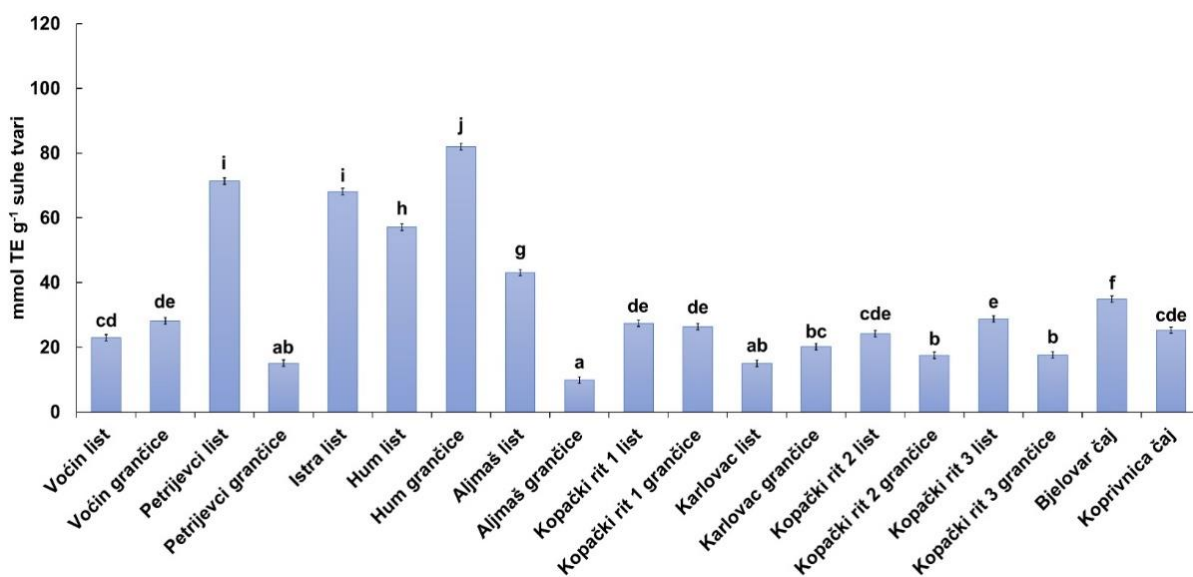
Najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti određenu DPPH metodom pokazuju uzorci listova iz Petrijevac (62,2 mmol/g suhe tvari) i grančica iz Huma (61,6 mmol/g suhe tvari). Zatim slijede uzorci listova iz Istre (60,6 mmol/g suhe tvari) i Huma (58,9 mmol/g suhe tvari) te Aljmaša (50,7 mmol/g suhe tvari). Najmanje vrijednosti izmjerene su u uzorcima grančica na lokacijama u Kopačkom ritu (15,7, 17,4 i 17,1 mmol/g suhe tvari) te u Petrijevcima (17,7 mmol/g suhe tvari). Uzorci listova iz Karlovca i čaja iz Bjelovara pokazuju sličnu aktivnost (slika 9). Uzorak čaja iz Bjelovara ujedno pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost izmjerenu DPPH metodom (27,1 mmol/g suhe tvari) nakon čega slijedi čajna mješavina iz Voćina te čaj iz Koprivnice. Uzorak čaja iz Koprivnice pokazuje sličnu aktivnost kao i uzorci grančica iz Aljmaša i Karlovca te listova na lokacijama Kopački rit 1 i 2.



Slika 9. Antioksidativna aktivnost u svježe ubranim listovima i grančicama imele te čaju izmjerena DPPH metodom nakon 48 sati ekstrakcije u 70% metanolu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

4.3. Antioksidativna aktivnost izmjerena FRAP metodom

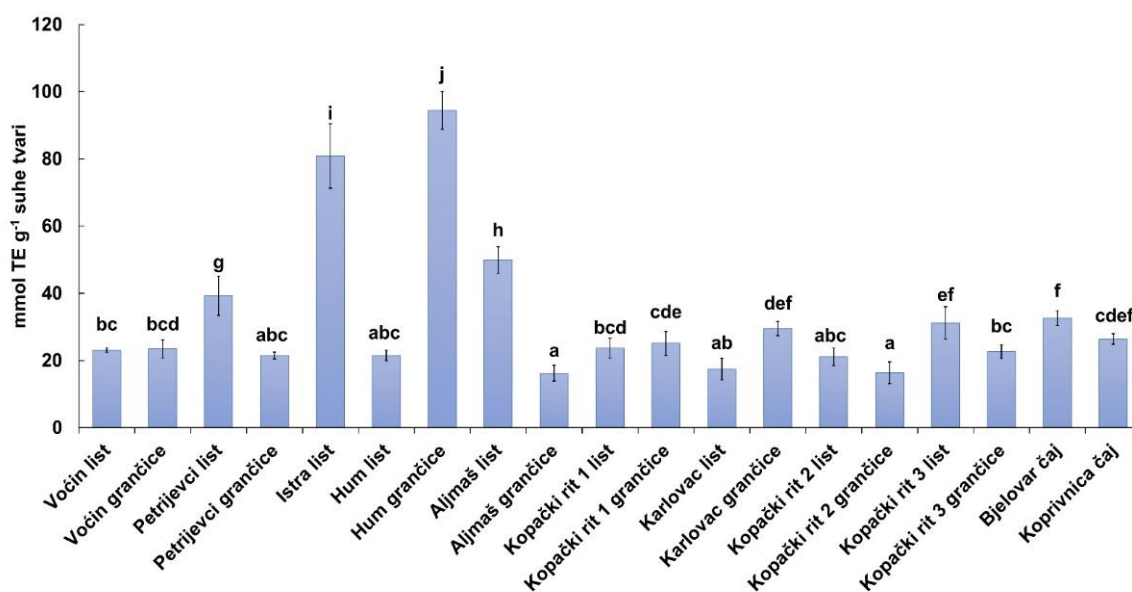
Antioksidativna aktivnost određena FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom ukazuje na sličan trend izmjerenih vrijednosti kao i DPPH metoda (slika 10). Najviše vrijednosti izmjerene su u uzorcima grančica imele iz Huma (82 mmol/g suhe tvari). Zatim slijede uzorci listova iz Petrijevac (71,4 mmol/g suhe tvari), Istre (68,1 mmol/g suhe tvari), Huma (57,1 mmol/g suhe tvari) i Aljmaša (43,1 mmol/g suhe tvari). Uzorak koji je pokazao najnižu antioksidativnu aktivnost je uzorak grančica iz Aljmaša (9,9 mmol/g suhe tvari). Također, nižu antioksidativnu aktivnost pokazali su i uzorci grančica iz Petrijevac i listova iz Karlovca. Kao i kod DPPH metode, uzorci čaja iz Bjelovara pokazuju najvišu antioksidativnu aktivnost (34,9 mmol/g suhe tvari), određenu FRAP metodom, u usporedbi s čajem iz Koprivnice i čajnom mješavinom iz Voćina. Antioksidativna aktivnost u uzorcima prikupljenim na lokacijama Kopački rit 1 (listovi i grančice) te Kopački 2 i 3 (listovi) pokazuje niže i slične vrijednosti kao i uzorak čaja iz Koprivnice (slika 10).



Slika 510. Antioksidativna aktivnost u svježe ubranim listovima i grančicama imele te čaju izmjerena FRAP metodom nakon 48 sati ekstrakcije u 70% metanolu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

4.4. Antioksidativna aktivnost izmjerena iRAC metodom

Analizom i statističkom obradom rezultata antioksidativne aktivnosti izmjerene IRAC (*Iron (III) Reducing Antioxidant Capacity*) metodom većina uzoraka pokazala je vrijednosti u rasponu od 20-30 mmol/g suhe mase. Uzorak koji je imao najvišu vrijednost je uzorak grančica iz Huma (94,4 mmol/g suhe tvari), dok je uzorak grančica iz Aljmaša imao najnižu vrijednost od 16,2 mmol/g, suhe tvari (slika 11). Visoke vrijednosti antioksidativne aktivnosti pokazali su i uzorci listova iz Istre (80,8 mmol/g suhe tvari), Aljmaša (49,9 mmol/g suhe tvari) i Petrijevac (39,2 mmol/g suhe tvari). Slično kao i kod DPPH i FRAP metode, uzorak čaja iz Bjelovara imaju najvišu antioksidativnu aktivnost (35,6 mmol/g suhe tvari) u odnosu na ostale uzorke čajeva iz Koprivnice i Voćina. Ostali uzorci pokazu sličan trend izmjerenih vrijednosti antioksidativne aktivnosti kao i kod DPPH i FRAP metode (slika 9-11).

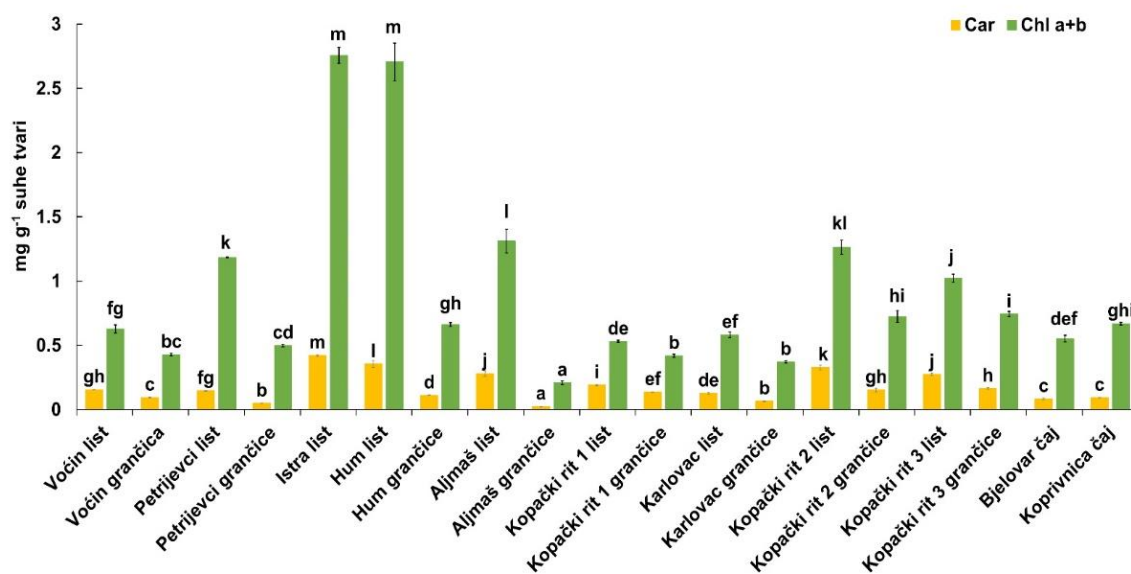


Slika 611. Antioksidativna aktivnost u svježe ubranim listovima i grančicama imele te čaju izmjerena iRAC metodom nakon 48 sati ekstrakcije u 70% metanolu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

4.5. Sadržaj karotenoida i ukupnog klorofila

Koncentracija ukupnog klorofila (Chl $a+b$) najviša je u uzorcima listova iz Istre (2,76 mg/g suhe tvari), Huma (2,7 mg/g suhe tvari), Aljmaša (1,3 mg/g suhe tvari) i Petrijevac (1,19 mg/g suhe tvari). Zatim slijede uzorci listova prikupljenih na lokacijama Kopački rit 2 (1,26 mg/g suhe tvari) i 3 (1,0 mg/g suhe tvari). Najniže koncentracije ukupnog klorofila izmjerene su u uzorcima grančica iz Aljmaša (0,21 mg/g suhe tvari), Kopačkog rita 1 (0,42 mg/g suhe tvari) i Karlovca (0,37 mg/g suhe tvari). Uzorci čajeva također pokazuju niže vrijednosti u odnosu na svježije ubrane uzorke s tim da uzorak čaja iz Koprivnice (0,67 mg/g suhe tvari) ima najvišu vrijednost u usporedbi s čajem iz Bjelovara i čajnom mješavinom iz Voćina (slika 12).

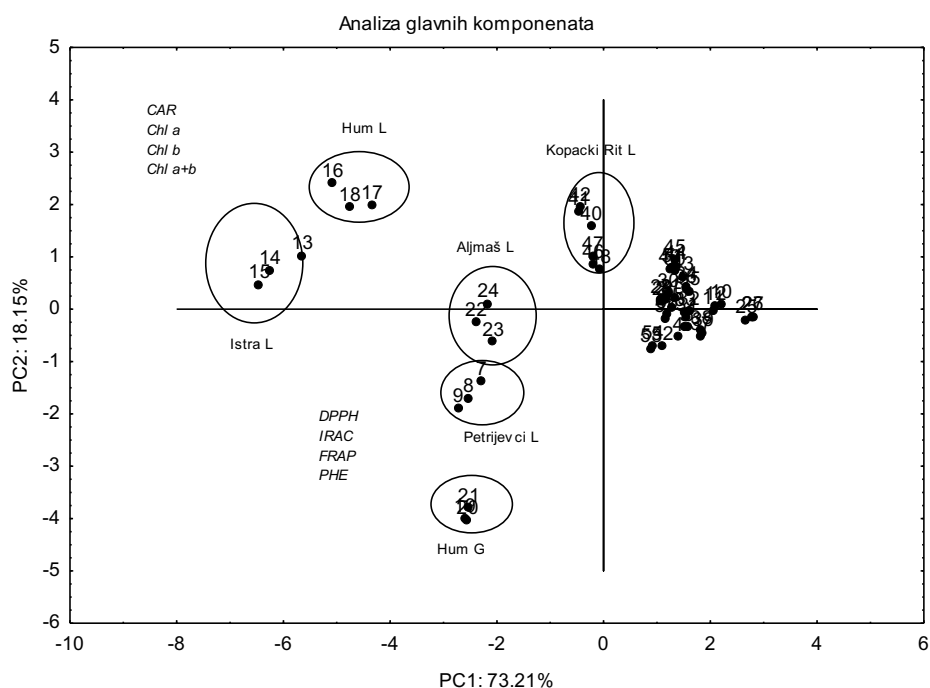
Najveću koncentraciju karotenoida (Car) sadrži uzorak lista iz Istre (0,42 mg/g suhe tvari), a najmanju uzorak grančica iz Aljmaša (0,03 mg/g suhe tvari). Čajevi imaju niže vrijednosti koncentracije karotenoida u odnosu na svježije ubrane uzorke listova i grančica imele s tim da čajna mješavina iz Voćina ima veću koncentraciju karotenoida u grančicama u odnosu na čajeve iz Bjelovara i Koprivnice (slika 12).



Slika 712. Koncentracija karotenoida (Car) i ukupnog klorofila (Chl $a+b$) u svježije ubranim listovima i grančicama imele te čaju nakon 24 sata ekstrakcije u 100% acetonu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između grupa testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa ($p \leq 0,05$).

4.6. Analiza glavnih komponenata (PCA)

Analiza glavnih komponenata s varimax rotacijom učinjena je na podatkovnoj matrici koja je sadržavala 10 varijabli: rezultati analize antioksidativne aktivnosti (DPPH, iRAC i FRAP), polifenola i analize pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Car, Chl *a*+*b*, Chl *a*/Chl *b* i Chl *a*+*b*/Car) i 20 redaka (broj uzoraka). Dobiveni je rezultat pokazao da za opis rezultata nisu važni svi mjereni parametri, a u ovom slučaju su to Chl *a*/Chl *b* i Chl *a*+Chl *b*/Car jer zbog malog faktorskog opterećenja (< 0.7) nisu doprinosili opisu podataka. U daljnjem računu upotrijebljena je podatkovna matrica koja je sadržavala varijable čija su faktorska opterećenja imala vrijednost veću od **0.7**, a to su bili rezultati: analize antioksidativne aktivnosti (DPPH, iRAC i FRAP), polifenola (PHE), analize pigmenata (Chl *a*, Chl *b*, Car, Chl *a*+*b* i Car) i 20 redaka (broj prikupljenih uzoraka). Na njih je nakon pojave manjeg broja novih varijabli ponovno primijenjena PCA. Rezultat je prikazan je na slici 13.



Slika 13. Rezultat PCA (*Principal Component Analysis*) dobiven na podacima analize mjerenih biokemijskih parametara u svježe ubranim uzorcima listova i grančica te čaju imele (*Viscum album L.*).

Podatci su opisani s dvije komponente, pri čemu je prva sadržavala visok postotak (73,21%), a druga 18,15%, stoga je s dvije glavne komponente opisano približno 90% varijacija u podacima (slika 13).

5. RASPRAVA

Bijela imela (*Viscum album* L.) široko je rasprostranjena biljna vrsta u Europi koja raste na različitim drvenastim vrstama kao poluparazit. Imela samostalno sintetizira dio hranjivih tvari, a dio uzima od biljke domaćina [31]. Mnoge biljne vrste, uključujući i imelu, imaju značajna antioksidativna svojstva. Istraživanja na imeli pokazala su da antioksidativna svojstva ove vrste ovise o vremenu uzorkovanja i vrsti domaćina na kojem parazitira [14, 15, 32, 33]. Razne kemijske i farmakološke studije identificirale su različite vrste spojeva među njima i flavonoide i fenolne kiseline koji su prirodni antioksidansi. Bijela imela pokazuje značajna antioksidativna, protuupalna i antibakterijska svojstva te se koristi u liječenju različitih bolesti i stanja [20].

Fenolni spojevi u biljkama značajno doprinose antioksidativnom djelovanju [34], a polifenoli imaju značajnu ulogu u neutralizaciji reaktivnih kisikovih jedinki [35]. Dobiveni rezultati, u ovom radu, pokazuju da u uzorcima prikupljenim u Petrijevcima, Istri, Aljmašu i Kopačkom ritu 3 list ima značajno veću količinu polifenola u usporedbi s grančicama za razliku od uzoraka prikupljenih u Humu gdje grančice sadrže veću količinu ukupnih topljivih polifenola nego uzorci listova. Najveći sadržaj polifenola u uzorcima čajeva uočen je u čaju iz Bjelovara. U usporedbi sa svježim prikupljenim biljnim materijalom čajevi pokazuju sličan sadržaj kao i većina uzoraka osim u odnosu na uzorke iz Istre, Aljmaša i Petrijevac. Polifenoli mogu neutralizirati slobodne radikale služeći kao njihovi akceptori, stoga se promjene sadržaja fenola odražavaju na redoks potencijal u biljnoj stanici [35]. Uzorci prikupljeni u Istri sadrže veću koncentraciju polifenola od uzoraka sakupljenih u Slavoniji što ukazuje da podneblje ima značajan utjecaj na sadržaj polifenola što su pokazale i prethodne studije [14, 36].

Na temelju dobivenih rezultata možemo vidjeti da sadržaj ukupnih topljivih polifenola u uzorcima ima sličan trend kao i antioksidativna aktivnost. Naime, porastom koncentracije polifenola raste i antioksidativna aktivnost. Rezultati antioksidativne aktivnosti mjereni su s tri različite metode (DPPH, FRAP, iRAC) i pokazuju slične rezultate. Veća razlika u metodama se pokazala kod uzoraka listova iz Petrijevac i Huma koji pokazuju znatno nižu vrijednost kod iRAC metode u usporedbi s DPPH i FRAP metodom. Kod iRAC metode uzorci lista iz Huma, Aljmaša i Petrijevac pokazuju znatno niže vrijednosti nego u metodama FRAP i DPPH. Uzorci prikupljeni u Aljmašu i Petrijevcima su pokazali da uzorci lista imaju znatno bolju antioksidativnu aktivnost nego uzorci grančica dok je kod uzorka iz Huma obrnuto, odnosno uzorak lista ima nižu antioksidativnu aktivnost od grančica.

Antioksidativna aktivnost izmjerena DPPH i FRAP metodom kod većine uzoraka iz Kopačkog rita pokazuje da list ima sličnu ili bolju aktivnost od grančice. Antioksidativna aktivnost, izmjerena FRAP, DPPH i iRAC metodom, ukazuje na značajnu razliku između uzorka iz Bjelovara i ostalih čajeva što odgovara i povišenom sadržaju ukupnih topljivih polifenola u uzorcima čaja iz Bjelovara. Antioksidativna vrijednost izmjerena iRAC metodom kod nekih uzoraka pokazala je nešto niže vrijednosti, razlog za takva odstupanja mogu biti razlike u kemiji i osjetljivost između tri primijenjene metode.

Uzorci listova prikupljeni u Istri pokazuju znatno veću koncentraciju ukupnog klorofila i karotenoida u usporedbi s uzorcima prikupljenim u Slavoniji dok uzorci čajeva pokazuju slične vrijednosti. Utjecaj perioda u kojem je ubran uzorak i vrsta drveta pokazali su u svojem istraživanju Kleszken i sur. [37], gdje su na temelju rezultata zaključili da su koncentracije klorofila a i b bile najviše u uzorku prikupljenom s marelice, vrbe, a najniže u uzorcima prikupljenim s gloaga i šipka.

Prema rezultatima dobivenim u ovom radu, uočavaju se razlike i varijacije od podneblja do podneblja te utjecaj perioda uzorkovanja na sadržaj ukupnih topljivih polifenola i antioksidativne aktivnosti. Uzorci listova prikupljeni listopadu (Istra, Petrijevcima i Aljmaš), osim uzorka iz Karlovca, pokazuju znatno veće vrijednosti polifenola i antioksidativnu aktivnost u usporedbi s uzorcima iz Kopačkog rita koju su ubrani u veljači. Uzorci lista iz Petrijevacima i Aljmaša u usporedbi s uzorcima grančica imaju znatno veću razliku dok kod uzoraka prikupljenih u veljači nema znatnog odstupanja kao kod onih u listopadu. Razlike koje su se pokazale u ovom radu, vezane uz ovisnost o mjesecu uzorkovanja, također su uočili Vicas i sur. [36]. Sličan zaključak su donijeli i Pietrzak i Nowak [20] koji su u svojem istraživanju pokazali da su kemijski sastav i biološka aktivnost biljke vrlo usko povezani s klimatskim uvjetima. Iznijeli su da je period od jeseni do zime najbolji za uzorkovanje i da tada imela sadrži najveće količine flavonoida i polifenola.

Uzorci prikupljeni u listopadu, izuzev uzorka iz Karlovca, pokazuju više vrijednosti ukupnog klorofila. Rezultati ukazuju i na to da uzorci lista u prosjeku imaju veći udio pigmentata u usporedbi s uzorcima grančica što je očekivano uzimajući u obzir da su listovi, u odnosu na grančice, primarni fotosintetski organi biljaka [38]. Nadalje, uzorci prikupljeni u zimi su imali više koncentracije pigmentata od onih u prikupljenih u proljeće [37].

Osim utjecaja podneblja, biljka domaćin na kojem parazitira imela, značajno može utjecati na njezin fitokemijski sastav i biološku aktivnost [14, 36]. Također, uz podneblje i vrstu

drveta domaćina, na sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakta uvelike može utjecati i otapalo korišteno za ekstrakciju. Primijećeno je, u većini slučajeva, da su etanol i metanol su bolja otapala od vode [19, 20, 36].

Istraživanja su pokazala da sadržaj sekundarnih metabolita u biljkama nije stabilan odnosno da on varira i ovisi o različitim biotičkim i abiotičkim čimbenicima, razvojnem stadiju biljke, dijelu biljke i karakteristikama okoliša [39, 40]. Razlike u biokemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti imele povezane su s okolišnim uvjetima kao što su temperatura, koncentracija ugljičnog dioksida, zagađenje, plodnost tla i godišnje doba [41].

Trenutno, lijekovi na bazi bilja koji se proizvode u većini zemalja nemaju odgovarajuće specifikacije i standarde kvalitete. Kvaliteta tih proizvoda temelji se na samoj kvaliteti sirovina koja ovisi o različitim genetskim i okolišnim čimbenicima koji utječu na biosintezu sekundarnih biljnih metabolita i varijacije u njihovom sadržaju [42,43]. Posebno u slučaju parazitskih biljaka, kao što je imela, čimbenici poput regije/lokacije i sezonskih varijacije značajno utječu na fitokemijski sastav biljke.

Metoda analize glavnih komponenata pokazala se učinkovitom u analizi podataka dobivenih analizom potpuno različitih uzoraka imele, ukoliko se uzme u obzir činjenica da su se uzorci osim u načinu pripreme (ubrani te potom osušeni uzorci / čajevi) razlikovali i po lokacijama, sezoni kada su prikupljeni, lokaciju (podneblju) i vrsti drveta s kojeg su ubrani. Rezultat analize glavnih komponenata (PCA) prikazan u obliku bi-plot prikaza (slika 13) ukazao je na grupiranje uzoraka listova prema lokacijama u tri glavne skupine: prva: Pazin, Hum; druga: Aljmaš, Petrijevc (Kopački rit kao „prijelazna“ lokacija) i treća koja je sadržavala preostale uzorke iz Koprivnice, Bjelovara i Karlovca. PCA je također ukazala na sličnosti među uzorcima čajeva (Bjelovar, Voćin i Koprivnica) i svježe ubranih listova prikupljenih s područja Karlovca, ali i Kopačkog rita kao tzv. prijelazne lokacije. Uzorci iz Huma i Istre okarakterizirani su većim koncentracijama klorofila od uzoraka smještenih na desnoj strani slike na kojoj su pretežno grupirani uzorci čajeva. Istovremeno, uzorci s područja Aljmaša, Petrijeva, Huma i Istre, ubrani tijekom listopada, pokazali su veću antioksidativnu aktivnost i sadržaj ukupnih topljivih polifenola.

6. ZAKLJUČAK

Vrijeme prikupljanja uzoraka i lokacija utjecali su na biokemijski sastav imele (*Viscum album* L.). Uzorci ubrani u listopadu su pokazali veći sadržaj ukupnih topljivih polifenola, antioksidativnu aktivnost i koncentracije karotenoida i ukupnog klorofila u usporedbi s uzorcima ubranima u veljači. Također, nije se pokazala znatna razlika između većine svježih uzoraka i čaja, izuzev uzoraka u Istri, Petrijevcima i Aljmašu. Uočene su i razlike između svježe ubranih uzoraka listova i grančica. Čaj iz Bjelovara pokazao je bolju antioksidativnu aktivnost i viši sadržaj ukupnih topljivih polifenola u odnosu na čajeve iz Koprivnice i Voćina. PCA analiza također je potvrdila sličnost čaja s nekim od svježe ubranih uzoraka. Uzorci prikupljeni u listopadu su zasebno grupirani odnosno odstupaju od ostalih što potvrđuje i utjecaj perioda berbe. Ovo istraživanje potvrdilo da na fitokemijski sastav parazitskih biljaka, kao što je imela, čimbenici poput regije/lokacije i sezonskih varijacija imaju značajan utjecaj.

7. LITERATURA

- [1] D. M. Watson, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32 (2001), 219-249.
- [2] T. Srdic-Rajic, N- Tisma-Miletic, M. Cavic, K. Kanjer, K. Savikin, D. Galun, A. Konic-Ristic, T. Zoranovic, *Phytother. Res.* 30 (2015), 485-495.
- [3] K. Neha, M. R. Haider, A. Pathak, M. S. Yar, *Eur. J. Med. Chem.* 178 (2019), 687-704.
- [4] <https://www.britannica.com/plant/mistletoe> (pristup 11.08.2021.)
- [5] <https://www.plantea.com.hr/imela/> (pristup 9.09.2021.)
- [6] J. Nazaruk, P. Orlikowski, *Nat. Prod. Res.* 30 (2016), 373-385.
- [7] B. N. Singh, C. Saha, D. Galun, D. K. Uperti, J. Bayry, S. V. Kaveri, *RSC Adv.* 28 (2016), 23837-23857.
- [8] T. Khan, S. Ali, R. Oayyum, I. Hussain, F. Wahid, A. J. Shah, *BMC Complement Altern. Med.* 16 (2016).
- [9] D. D. Orhan, E. Küpeli, E. Yesilada, F. Ergun, *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* 61 (2006), 26-30.
- [10] M. Sengul, H. Yildiz, N. Gungor, B. Cetin, Z. Eser, S. Ercisli, *Pak J Pharm Sci.* 22 (2009), 102-106.
- [11] K. W. Kim, S. H. Yang, J. B. Kim, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* (2014), 703624.
- [12] V. Sndhi, V. Gupta, K. Sharma, S. Bhatnagar, R. Kumari, N. Dhaka, *J. Pharm. Res.* 7 (2013), 828-835.
- [13] F. Shahidi, *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Woodhead Publishing, Sawston, 2015.
- [14] E. ÖnayUçar, A. Karagöz, N. Arda, *Fitoterapia* 77 (2006), 556-560.
- [15] M. Łuczkiwicz, W. Cisowski, P. Kaiser, R. Ochocka, A. Piotrowski, *Acta Pol. Pharm.* 58 (2001), 373–379.

- [16] E. Onay-Uçar, O. Erol, B. Kandemir, E. Mertoğlu, A. Karagöz, N. Arda, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* (2012), 958740.
- [17] K. Weber, U. Mengs, T. Schwarz, T. Hajto, K. Hostanska, T. R. Allen, R. Weyhenmeyer, H. Lentzen, *Arzneimittelforschung* (1998), 497-502.
- [18] W. H. Verheye, *Land Use, Land Cover and Soil Sciences-Volume V: Dry Lands and Desertification*, EOLSS Publications, Oxford, 2009.
- [19] M. Majeed, T. B. Pirzadah, M. A. Mir, K. R. Hakeem, H. F. Alharby, H. Alsamandany, A. A. Bamagoos, R. U. Rehman, *Plants*, 10 (2021), 1191.
- [20] W. Pietrzak, R. Nowak, *Molecules*, 26 (2021), 3741.
- [21] J. Patykowski, J. Kolodziejek, *Pol. J. Environ. Stud*, 25 (2016), 725-732.
- [22] J. Michalczyk, P. Stypiński, *Ball. Herba Polonica* 27 (1981), 241–247.
- [23] A. Blainski, G. C. Lopes, J. C. Palazzo de Mello, *Molecules*, 18 (2013). 6852-6865.
- [24] <https://bioquochem.com/phenolic-compounds/polyphenol-quantification-assay-kit-kb-03-006/> (pristup 1.9.2021)
- [25] H. Ching Wan, B. Sultana, P. Singh Nigam, R. Owusu-Apenten, *Beverages*, 4 (2018), 58.
- [26] F. Xiao, T. Xu, B. Lu, R. Liu, *Food Frontiers*, 1 (2020), 60–69.
- [27] S. Khatua, S. Ghosh, K. Acharya, *Asian J. Pharm.* 11 (2017), 327-335.
- [28] G. Kirkpatrick, P. S. Nigam, R. Owusu-Apenten, *J. Adv. Biol.* 15 (2017): 1-7.
- [29] H. K. Lichtenthaler, *Methods, Enzymol*, 148 (1987), 350-382.
- [30] S. Sharma, *Applied Multivariate Techniques*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1996.
- [31] M. Idžojtić, M. Glavaš, M. Zebec, M. Pernar, R. Bradić, D. Husak, *Sumar. List* 130, (2006), 101-110.

- [32] G. Miliauskas, P. R. Venskutonis, T. A. vanBeek, *Food. Chem.* 85 (2004), 231-237.
- [33] A. A. Oluwaseun, O. Ganiyu, (2008). *Afr. J. Biotechnol.* 7 (2008), 3138-3142.
- [34] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007), 44–84.
- [35] P. Maslennikov, G. Chupakhina, L. Skrypnik, P. Feduraev, A. Мельник, *Russian J. Ecol.* 49 (2018), 384–394.
- [36] S. I. Vicaş, D. Rugina, C. Socaciu, *J. Med. Plants Res.* 5 (2011), 2237-2244.
- [37] E. Kleszken, V. Laslo, S. I. Vicas, *Adv Mater Res-Switz*, 9 (2020), 27-33.
- [38] A. J., Brazel, D. S. Ó'Maoiléidigh, 70 (2019), 1737-1754.
- [39] B.G Brasileiro, J. P. V. Leite, V. W. D Casali, V. R. Pizziolo, O. G. L. Coelho, *Acta Sci. Agron.* 37 (2015), 249-255.
- [40] C.E. Ochoa-Velasco, R. Avila-Sosa, A. R. Navarro-Cruz, A.R. A. López-Malo, E. Palou, *Biotic and Abiotic Factors to Increase Bioactive Compounds in Fruits and Vegetables. U Food Bioconversion*, (A. M. Grumezescu, A.M. Holban, eds.) Academic Press in an Imprint of Elsevier, London, 2017, 317-349.
- [41] P. Stypiński, PAN: Kraków, Poland, (1997), 1–117.
- [42] N. Verma, S. Shukla, *J. Appl. Res. Med.Aromat. Plants* 2 (2015), 105–113.
- [43] A. K. Mohiuddin, *J. Pharm. Clin. Res.* 7 (2019), 555704.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Josip Lujanac
Datum i mjesto rođenja	05. 03. 1998., Požega
Adresa	Ulica Vladimira Nazora 60, 34552 Badljevina
e-mail	josiplujanac@gmail.com
Obrazovanje	
2019. - 2021.	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek
2016. - 2019.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek Završni rad: Izolacija metalotioneina upotrebom gel filtracije mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
2012. - 2016.	Prirodoslovno i grafička škola Rijeka (Kemijski tehničar)
Radno iskustvo	
Lipanj 2021.	Studentski posao rad na festivalu, Noćni Klub D.o.o
Srpanj 2020. – Rujan 2020.	Posao vozača u voznom parku, ICR industrial Car Repair GmbH, Neunburg vorm Wald
Kolovoz 2019.	Studentski posao u poljoprivredi, PZ Vočko - OPG Skalnik.
Osobne vještine	
Materinski jezik	hrvatski
Strani jezici	engleski – aktivno u govoru i pismu
Računalne vještine	Odlično snalaženje pri radu na računalu, poznavanje i aktivno korištenje MS Office programskog paketa
Vozačka dozvola	B kategorija