

Utjecaj bisfenola A na sadržaj polifenola u lukovicama običnog luka (*Allium cepa* L.)

Dorđević, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:629211>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Anja Đorđević

Utjecaj bisfenola A na sadržaj polifenola u
lukovicama običnog luka (*Allium cepa* L.)

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan. Istraživanje je provedeno u sklopu bilateralnog hrvatsko-slovenskog znanstveno-istraživačkog projekta „Toksikološki profil i interakcije bisfenola A i njegovih analoga“ financiranog iz sredstava Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na izvanrednoj podršci tijekom provedbe diplomskog rada. Njezina susretljivost, profesionalnost i dragocjeni savjeti značajno su doprinijeli mom uspjehu. Naučila sam iznimno puno od nje i zahvalna sam joj na ulozi koju je imala u mom akademskom razvoju. Veliko hvala dr.sc. Vujčić Bok na uzastopnoj pomoći i savjetima tijekom cijele provedbe ovog istraživanja te neizmjernom razumijevanju i podršci koju mi je iskazala, ponajviše tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Bisfenol A.....	1
1.2. Utjecaj BPA na okoliš.....	2
1.3. Mehanizmi toksičnosti BPA u čovjeka.....	3
1.4. Polifenoli.....	4
1.5. Flavonoidi.....	6
1.6. Fenolne kiseline.....	7
1.7. Stilbeni i lignani.....	8
1.8. Običan luk (<i>Allium cepa</i> L.).....	8
2. Obrazloženje teme	9
3. Materijali i metode	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Kemikalije.....	10
3.1.2. Oprema.....	10
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Biološki pokus.....	11
3.2.1.1. Biljni organizam.....	11
3.2.1.2. Priprema otopina BPA.....	11
3.2.1.3. Postupak provođenja biološkog pokusa.....	12
3.2.1.4. Priprema fosfatnog pufera.....	12
3.2.1.5. Priprema homogenata biljnog tkiva.....	13
3.2.2. Određivanje razine BPA u lukovicama pomoću FTIR-a.....	13
3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida.....	13
3.2.3.1. Princip metode.....	13
3.2.3.2. Postupak izvođenja mjerenja.....	14
3.2.4. Određivanje ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina.....	14
3.2.4.1. Princip metode.....	14
3.2.4.2. Postupak izvođenja mjerenja.....	14

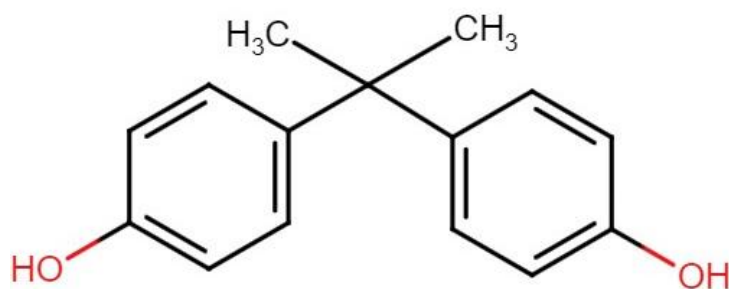
3.3. Statistička obrada rezultata.....	15
4. Rezultati i diskusija	16
4.1. Akumulacija BPA u lukovicama luka.....	16
4.2. Utjecaj BPA na sadržaj polifenola u lukovicama luka.....	19
5. Zaključci.....	23
6. Popis kratica	24
7. Literatura.....	25
8. Sažetak / Summary.....	30

Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

1. Uvod

1.1. Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) ili 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan, derivat je difenilmetana s dvije hidroksifenilne skupine (slika 1). To je bijela krutina kemijske formule $C_{15}H_{16}O_2$ (www.pubchem). Pripada skupini bisfenola, fenolnih organskih spojeva. BPA se koristi u proizvodnji plastike za razne potrošačke proizvode, uključujući polikarbonate i epoksidne smole (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623>).



Slika 1. Strukturna formula BPA.

Iako je BPA prvi put sintetiziran 1891. godine, istraživanje komercijalnih mogućnosti ostvarilo se tek kasnije. Njegova proizvodnja započela je početkom 1950-ih, a epoksidne smole brzo su našle široku primjenu u industrijskoj proizvodnji kao zaštitni premazi na metalnoj opremi, cijevima, čeličnim bačvama i unutrašnjosti limenki za hranu (Vogel, 2008). 1957. godine otkrivena je nova mogućnost upotrebe BPA - polimeriziran tvori tvrdi plastiku nazvanu polikarbonat. Ova plastika dovoljno je snažna da zamijeni čelik i dovoljno prozirna da zamijeni staklo. Pronašla je široku primjenu u elektronici, sigurnosnoj opremi, automobilima i spremnicima za hranu (Greiner i sur., 2004). Do kraja 1970-ih proizvodnja BPA u Sjedinjenim Američkim Državama dostigla je pola milijarde funti (Vogel, 2008). Danas BPA ima veliku primjenu o čemu govori podatak da je 2021. godine proizvodnja BPA u svijetu premašila 8 milijuna tona (mcgroup.co.uk). Kao posljedica masovne proizvodnje i potrošnje, BPA danas nalazimo u cijelom ekosustavu te se može reći da je gotovo sveprisutan u okolišu (Wazir i Mokbel, 2019; Coralles i sur., 2015; Tsai, 2006). Istraživanje Calafat i suradnika (2008)

pokazalo je da 93% Amerikanaca starijih od šest godina ima u svojem urinu razinu BPA koju je moguće detektirati, što potvrđuje sveprisutnost BPA.

1.2. Utjecaj BPA na okoliš

Okolišni izvori BPA-a mogu se klasificirati kao „izvori prije upotrebe“ i „izvori nakon upotrebe“. Izvori prije upotrebe uključuju one pripisane proizvodnji BPA i proizvodima koji sadrže BPA, gdje je prvi izvor BPA ispuštanje otpadnih voda iz proizvodnih postrojenja. Transport i obrada BPA i proizvoda koji sadrže BPA dodatni su izvori otpuštanja u okoliš (Coralles i sur., 2015). Najveće količine BPA pronađene su u filtratu deponija i otpadnim vodama industrije papira (do 17 mg/L), dok su nešto niže koncentracije (u µg/L) nađene u površinskim vodama. Prisustvo BPA utvrđeno je u rijekama (od 43 do 191 µg/kg suhog ostatka tla) i morskom sedimentu (u koncentraciji od otprilike 100 µg/kg suhog ostatka tla). Izvori BPA u tlu mogu biti mulj i otpadne vode, kao i biološki muljevi koji se koriste kao poboljšivači tla (Kim i sur., 2018).

BPA se zadržava u tlu neko vrijeme, a iz tla ga onda mogu apsorbirati biljke (Vujčić Bok i sur., 2023; Xiao i sur., 2020). Korijen biljke gotovo u potpunosti opskrbljuje listove vodom i mineralima. Nedostatak hranjivih tvari i vode remeti rast i metabolizam izdanaka, a posebno fotosintezu u listovima. Izlaganje biljaka BPA može dovesti do oštećenja korijenja što rezultira smanjenjem fotosinteze u listovima. BPA, kojega su apsorbirale biljke, može se prenijeti na izdanke i nakupljati u lisnoj plojci, što posljedično može ometati fotosintezu u listovima (Li i sur., 2018). Nie i suradnici (2014) proveli su istraživanje u kojem su ispitali utjecaj BPA na mlade biljke soje. Pokazali su da BPA smanjuje apsorpciju minerala u korijenu mladih biljaka soje te inhibira enzime povezane s respiratornim metabolizmom. Slično drugim fenolnim spojevima, BPA se u biljkama podvrgava glikozilaciji, što je važan put detoksifikacije koji utječe i na njegovu koncentraciju u biljnim organima i na posljedičnu fitotoksičnost (Ferrara i sur., 2006).

Istraživanja su također pokazala da različite biljne vrste mogu različito reagirati na izloženost BPA. Na primjer, Ferrara i suradnici (2006) pokazali su da otopine BPA u koncentracijama od 10 mg/L i 50 mg/L u hidroponskim kulturama značajno inhibiraju rast korijena i izdanka te smanjuju svježiu i suhu biomasu rajčice, durum pšenice i salate, ali te iste koncentracije BPA nisu imale utjecaj na navedene parametre kod boba. BPA utječe na

biokemijske čimbenike rasta i razvoja biljaka uglavnom putem oksidativnog stresa. Prekomjerna proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) poput superoksidnog radikala (O_2^-) i vodikovog peroksida (H_2O_2) dovodi do oksidativnog stresa u kloroplastima, staničnoj membrani, mitohondrijima i peroksisomima. Ovo prekomjerno nakupljanje ROS-a oštećuje stanične membrane i organele te uzrokuje promjene u vitalnim fiziološkim procesima i na kraju zaustavlja rast biljaka (Ali i sur., 2018). Nakupljanje ROS-a pokreće složeni mehanizam obrane od ROS-a uključujući neenzimatske sustave, poput sinteze polifenola i enzimske sustave kako bi se spriječila nekontrolirana oksidacija.

U životinja, prvenstveno vodozemaca, pokazano je da BPA uzrokuje razvojne i reproduktivne poremećaje, uključujući smanjenje razine muških hormona, smrt stanica testisa, smanjenje gustoće i pokretljivosti spermija, inhibiciju spermatogeneze i oogeneze, zajedno s odgođenom ili odsutnom ovulacijom. Osim toga, BPA utječe i na druge sustave, na primjer, remeti funkciju imunološkog sustava i metabolizma (Canesi i Fabbri, 2015).

1.3. Mehanizmi toksičnosti BPA u čovjeka

Istraživanja su pokazala da se BPA u ljudi nakuplja u tkivima te potencijalno šteti ljudskom zdravlju putem različitih molekularnih mehanizama (Molina-Lopez i sur., 2023; Cimmino i sur., 2020).

BPA ulazi u ljudski organizam preko probavnog sustava, udisanjem ili u kontaktu s kožom i očima, ali je moguć i vertikalni prijenos s majke na dijete (Cimmino i sur., 2020). BPA karakterizira brza peroralna apsorpcija te se primjerice može otpustiti kroz termalni papir računa i doći u kontakt s epidermisom (Cimmino i sur., 2020; Valentino i sur., 2015). Djelomično se inaktivira u jetri i crijevima konjugacijom s uridin 5'-difosfo-glukuronozil-transferazom (UDP-UGT) (Valentino i sur., 2015). Fetalna jetra nema potpuno razvijen sustav detoksifikacije ksenobiotika, posebice aktivnosti UDP-UGT. Embrijska/fetalna izloženost BPA može oštetiti tkivo i funkciju embrija, a posebno utječe na funkciju masnog tkiva, osjetljivost na inzulin i povećanje masti (Valentino i sur., 2015).

BPA se svrstava u endokrine disruptore, odnosno pripada klasi spojeva koji remete endokrini sustav i pokazuju svojstva slična hormonima (Nohynek i sur., 2013). Zbog svoje sposobnosti oponašanja estrogenske aktivnosti, BPA može pojačati ili inhibirati aktivnost endogenih estrogena, djelujući uglavnom putem nuklearnih estrogenskih receptora (ER) i to

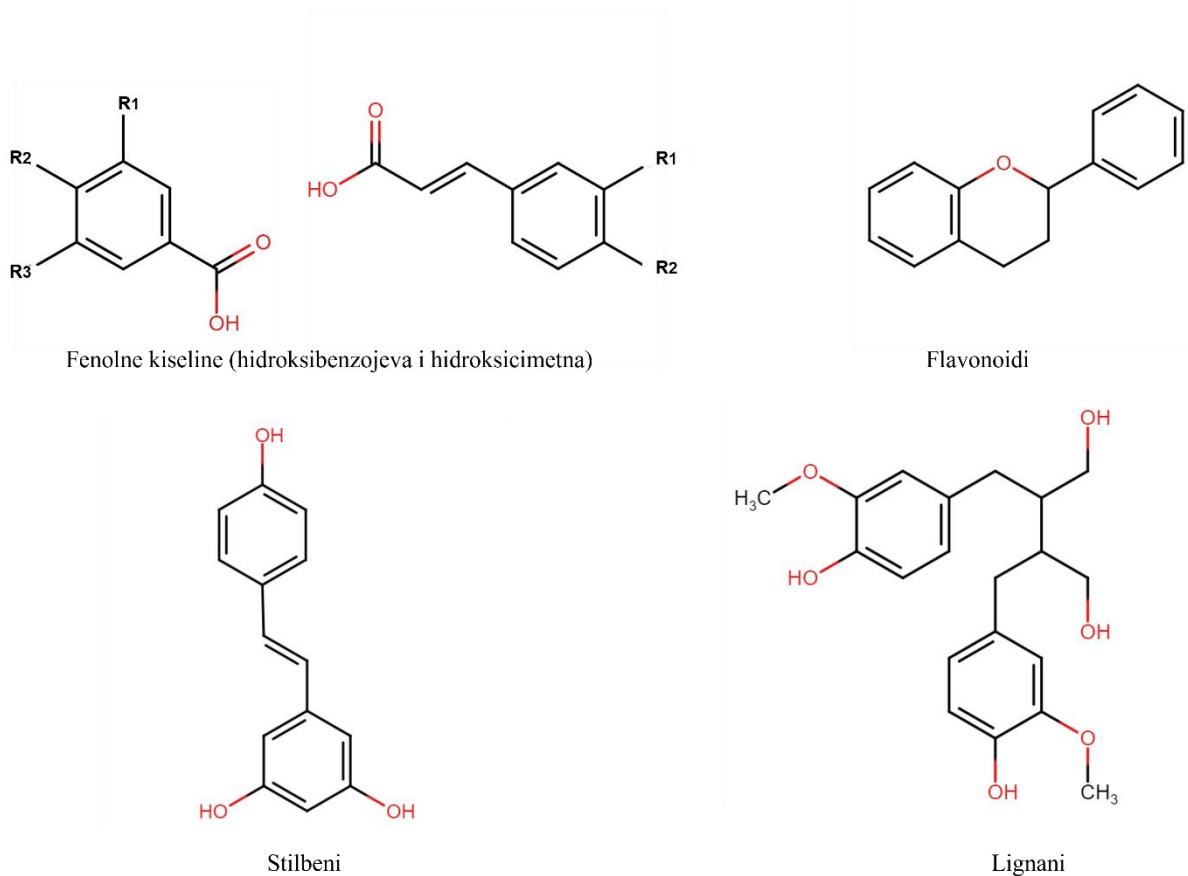
estrogenskog receptora alfa ($ER\alpha$) i estrogenskog receptora beta ($ER\beta$), ali također se veže i na G-protein spregnuti estrogenski receptor (GPR30). Nadalje, BPA se može natjecati s 5α -dihidrotestosteronom (DHT) za vezanje na androgeni receptor (AR), uzrokujući antiandrogene učinke, što može dovesti do muške neplodnosti (Valentino i sur., 2015).

Vezanje BPA na ER može igrati važnu ulogu u tumorigenezi (Cimmino i sur., 2020). Pokusima na nekoliko linija stanica raka jajnika pokazano je da vezanje BPA na ER povećava njihovu proliferaciju i migraciju putem Stat3 i ERK1/2 signalizacije (Ptak i sur. 2012). Veliki broj studija dokazao je da nanomolarne doze BPA značajno povećavaju proliferaciju ER-pozitivnih i ER-negativnih stanica raka dojke (Song i sur., 2015). Također, pokazano je da se BPA veže za receptor za tireodine hormone (TR), izazivajući i agonističke i antagonističke učinke, te izravno utječe na funkciju štitnjače povećavajući ekspresiju nekoliko gena uključenih u proliferaciju i aktivnost stanica štitnjače.

Brojni transkripcijski faktori, uključujući $PPAR\gamma$, C/EBP, Nrf2, HOX i HAND2, sudjeluju u djelovanju BPA na homeostazu masnog tkiva i jetre, kardiovaskularni sustav i nastajanje raka. Naposljetku, epigenetske promjene, poput metilacije DNA, modifikacije histona i promjene u ekspresiji mikroRNA, doprinose patološkim učincima BPA (Cimmino i sur., 2020). Danas se sa sigurnošću može tvrditi da BPA predstavlja rizični čimbenik u nastajanju endokrinih, imunskih i onkoloških bolesti stoga smanjenje izloženosti BPA može biti cilj u prevenciji ozbiljnih bolesti koje predstavljaju globalan, socio-ekonomski problem poput pretilosti, metaboličkog sindroma i šećerne bolesti (Cimmino i sur., 2020; Valentino i sur., 2015).

1.4. Polifenoli

Polifenoli su najveća i najistraženija skupina biljnih metabolita koja uključuje više od 8000 molekula (González-Sarrías i sur., 2020). Mogu se klasificirati u različite skupine ovisno o broju fenolnih prstenova koje sadrže i na temelju strukturnih elemenata koji povezuju ove prstenove međusobno. Glavne skupine uključuju fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Šamec i sur., 2021; Pandey i Rizvi, 2009). Različite grupe polifenola i njihove kemijske strukture prikazane su na slici 2. Polifenoli predstavljaju širok spektar spojeva prisutnih u biljkama i algama, a njihova je prirodna uloga obrana organizma od UV zračenja, infekcija i biljojeda.

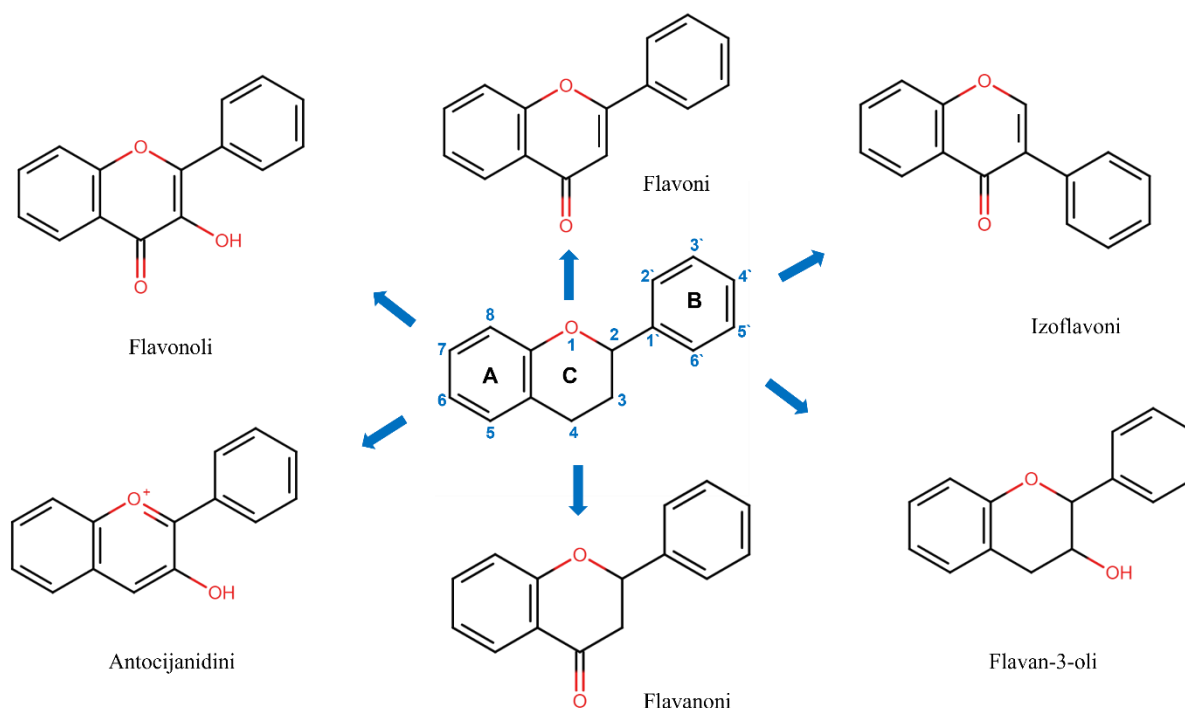


Slika 2. Strukturne formule glavnih skupina polifenola.

Fenolni spojevi mogu biti prisutni u biljkama u slobodnoj formi, ali češće se nalaze u konjugiranim oblicima s jednim ili više šećernih ostataka povezanih β -glikozidnim vezama s hidroksilnom skupinom (O-glikozidi) ili ugljikovim atomom aromatskog prstena (C-glikozidi). Biosinteta se odvija putem šikiminske kiseline (Šamec i sur., 2021). Polifenoli imaju sposobnost mijenjati enzimsku aktivnost i, posljedično, mehanizme prijenosa signala u mnogim procesima koji se odvijaju u biljnim stanicama. To se može pripisati njihovim fizikalno-kemijskim, antioksidacijskim svojstvima, koja im omogućuju sudjelovanje u brojnim metaboličkim staničnim redoks procesima. Polifenoli predstavljaju najzastupljenije antioksidanse u ljudskoj prehrani, prisutne do 20 puta više nego vitamin E i karotenoidi te 10 puta više nego vitamin C (Iqbal i sur., 2023). Pokazano je da konzumacija polifenola u ljudi ima značajan utjecaj na prevenciju razvoja raka, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

1.5. Flavonoidi

Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka, koji se sastoje od benzopiranskog prstena s fenolnim ili polifenolnim skupinama na različitim pozicijama (Ullah i sur., 2020). Flavonoidi su uključeni u fotosenzitizaciju, tranfer energije, djelovanje na hormone i regulatore rasta kod biljaka, kontrolu respiracije i fotosinteze, morfologiju i spol biljaka. Sastavni su dio ljudske i životinjske prehrane, ali ih ni ljudi, ni životinje ne mogu sintetizirati (Kurtagić, 2017). Pokazano je da djeluju antikancerogeno, antimikrobno i antivirusno, antiangiogeno, antimalarijski, antioksidativno te neuroprotektivno. Svrstani su u različite skupine ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi, stupnju nezasićenosti i oksidaciji ugljikovog prstena (Ullah i sur., 2020). Na temelju varijacija heterocikličkog prstena mogu se podijeliti u šest podskupina: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni, a svaki od ovih flavonoida široko je rasprostranjen u prirodi (Ullah i sur., 2020; Kurtagić, 2017; Pandey i Rizvi, 2009). Različite podskupine flavonoida i njihove kemijske strukture prikazane su na slici 3.



Slika 3. Strukturne formule i podjela flavonoida.

Flavonoidi se pojavljuju u različitim dijelovima biljaka, kao i unutar staničnih organela, uglavnom u vakuoli i kloroplastima mezofilnih stanica. Opći mehanizmi kojima flavonoidi

djeluju protiv stresa su: hvatanje slobodnih radikala, keliranje metala, ometanje enzima povezanih s nastajanjem slobodnih radikala i aktiviranje prirodnih antioksidacijskih enzima biljaka. Flavonoidi su izravno uključeni u hvatanje ROS-ova. Sudjeluju u keliranju slobodnih radikala doniranjem vodikovog atoma ili prijenosom pojedinačnog elektrona. Dodatno, flavonoidi djeluju kao unutarnji antioksidacijski enzimi inhibiranjem enzima koji pokreću slobodne radikale, poput ksantin oksidaze, lipooksigenaze, protein kinaze C, ciklooksigenaze, mikrosomske monooksigenaze, mitohondrijske sukcinooksidaze i NADPH oksidaze (Shomali i sur., 2022).

Flavanoli su podskupina flavonoida koje karakterizira odsutnost dvostruke veze između C-2 i C-3 te odsutnost karbonilne skupine na C prstenu (C-4), dok sadrže hidroksilnu skupinu(e) na C-3 ili C-4. S obzirom na navedene strukturne karakteristike, u prirodi su pronađene četiri glavne vrste flavanola: flavan-3-oli, flavan-4-oli, izoflavan-4-oli, i flavan-3,4-oli (Luo i sur., 2022). Kvercetin i kempferol najzastupljeniji su flavanoli u povrću. Kvercetin se često istražuje u *in vitro* uvjetima i dokazano je njegovo antikancerogeno djelovanje. Poznat je kao snažan hvatač slobodnih radikala i antioksidans, a pruža i zaštitu od kardiovaskularnih bolesti. Kempferol isto pokazuje snažnu antioksidacijsku aktivnost, a utvrđeno je da zajedno s kvercetinom sinergistički djeluje na inhibiciju proliferacije stanica raka debelog crijeva (Rochfort i sur., 2006).

1.6. Fenolne kiseline

Ovisno o njihovoj strukturi, fenolne kiseline mogu se razvrstati u dvije podskupine: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C6–C1) i derivati cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline, C6–C3). Hidroksicimetine kiseline (HCA) uključuju p-kumarinsku, kavenu, feruličnu i sinapinsku kiselinu, te njihove esterificirane/eterificirane konjugate (npr. klorogensku kiselinu) (Šamec i sur., 2021). Djeluju antioksidativno, antiinflamatorno, antikancerogeno te antimikrobno, a pokazale su i pozitivan učinak u liječenju mnogih kardiovaskularnih bolesti i sprječavanju ateroskleroze. Za biološku aktivnost je zaslužan isključivo aglikonski dio molekula (Kurtagić, 2017). Fenolne kiseline u biljkama moćni su antioksidansi koji mogu posredovati u odgovoru na štetne ROS-ove pod različitim abiotičkim stresorima, uključujući i nanočestice. HCA su se pokazale kao učinkovitiji antioksidansi od hidroksibenzojevih kiselina (Šamec i sur., 2021).

1.7. Stilbeni i lignani

Stilbeni se sastoje od dva aromatska prstena povezana metilenskim mostom (Šamec i sur., 2021). Većina stilbena u biljkama djeluje kao antifungalni fitoaleksini, spojevi koji se sintetiziraju samo kao odgovor na infekciju ili ozljedu.

Lignani su difenolni spojevi koji imaju strukturu 2,3-dibenzilbutana, formiranu dimerizacijom dva ostatka cimetine kiseline (Pandey i Rizvi, 2009). Imaju kemijsku strukturu sličnu estrogenima stoga djeluju kao fitoestrogeni u ljudskom tijelu (Baldi i sur., 2023).

1.8. Običan luk (*Allium cepa* L.)

Običan luk (*Allium cepa* L.) višegodišnja je biljka sa stabljikom i podzemnom lukovicom. Pripada obitelji Liliaceae, iako ga neki autori spominju kao Alliaceae (Chakraborty i sur., 2022). Korijenski sustav je površan, a stabljika u svojoj bazi vrlo kratka i spljoštena, a povećava se u promjeru kako raste. Listovi luka su dugi, linearni, šuplji i cilindrični. Kada biljka dosegne određenu fazu rasta, baze listova odebljaju i formiraju lukovicu (Kianian i sur., 2020).

Luk je izvor brojnih fitokemikalija, poput polifenola, fenolnih kiselina, flavonoida (fisetin, kvercetin), askorbinske kiseline i sumpornih spojeva, koji su odgovorni za njegovu boju, okus i aromu (Dorrigiv i sur., 2021). Luk je također bogat izvor hidrofилnih vitamina (vitamin C, B, A) i lipofilnih vitamina (vitamin D i E) te minerala poput željeza, selena, joda, kalija, kalcija, sumpora i mnogih drugih (Kavalcová i sur., 2015). Djeluje antioksidativno sprečavajući peroksidaciju lipida, što se uglavnom pripisuje fenolnim spojevima, uključujući flavonoide (Kim i sur., 2024). Sadržaj flavonoida varira u različitim slojevima (vanjski tanji sloj, prvi sloj tkiva, drugi sloj tkiva i unutarnji sloj) luka, a istraživanja su pokazala da je značajno veći sadržaj flavonoida opažen u prvom sloju u usporedbi s drugim slojevima (Metrani i sur., 2020). U ljudskoj prehrani luk je jedan od najbogatijih izvora flavonoida, a u najzastupljenije pripadaju kvercetin, kvercitrin i rutin (Kim i sur., 2024; Lachman i sur., 2003).

Različita istraživanja pokazala su da luk posjeduje brojna farmakološka svojstva, uključujući antikancerogena, antidiabetička i antitrombotična svojstva, kao i pozitivan učinak na kosti, kardiovaskularni, gastrointestinalni, živčani, respiratorni i urogenitalni sustav (Kianian i sur., 2020).

2. Obrazloženje teme

BPA se koristi u proizvodnji brojnih proizvoda za opću upotrebu te je njegovo prisustvo u okolišu neminovno (Wazir i Mokbel, 2019). Istraživanja pokazuju da se BPA nakuplja u okolišu (voda, tlo) te da se u tlu može zadržati duže vrijeme. Iz tla ga onda lako mogu apsorbirati biljke (Xiao i sur., 2020; Nie i sur., 2014). Dosadašnja istraživanja pokazala su da u biljkama BPA ometa proizvodnju hormona, utječe na proces fotosinteze inhibirajući asimilaciju ugljika, potiče oksidativni stres inducirajući povećanu proizvodnju ROS-ova i oštećuje stanični citoskelet ometanjem organizacije mikrotubula (Vujčić Bok i sur., 2023; Nie i sur., 2014).

U stanici oksidacijski stres posljedica je povećane razine prooksidansa kao što su ROS-ovi. ROS-ovi mogu oksidirati nukleinske kiseline, proteine, lipide i tako dovesti do oštećenja tih makromolekula i posljedično razvoja bolesti. Biljna stanica ima razvijen antioksidacijski sustav u borbi protiv prooksidansa te antioksidansi mogu zaštititi stanicu od oštećenja uzrokovanih prooksidansima (Iqbal i sur., 2023; Šamec i sur., 2021). Prvu liniju obrane protiv prooksidansa predstavljaju antioksidativni spojevi poput fenolnih kiselina i flavonoida koji su „hvatači“ prooksidansa poput peroksida, hidroperoksida ili lipidnih peroksida. Poznato je da se fenolni biosintetski putovi obično aktiviraju u nepovoljnim okolišnim uvjetima, poput suše, ekstremnih temperatura, onečišćenja metalima i izloženosti ultraljubičastom zračenju (Malea i sur., 2022; Šamec i sur., 2021).

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi utjecaj BPA na razinu polifenola i to ukupnih flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina kao biomarkera antioksidacijske obrane biljaka te ispitati akumulaciju BPA u biljaka. Kao modelni organizam koristio se obični luk. Lukovice luka preko korjenčića bile su izložene tri dana otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L. Nakon izlaganja BPA sakupljene su lukovice luka. Prvo je u lukovicama pomoću Fourierove transformacijske infracrvene spektroskopije (FTIR-a) provjereno prisustvo BPA. Potom je u lukovicama luka, spektrofotometrijski, određena razina ukupnih flavonoida, flavonola i hidroksicimetnih kiselina.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za istraživanje su korištene sljedeće kemikalije:

- 96 % etanol (Lach-Ner, Češka),
- aluminijev triklorid, AlCl_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- bisfenol A, BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- di-natrij hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- kalij dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- kalijev klorid, KCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- kavena kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- klorovodična kiselina, HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- kvercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- natrijev hidroksid, NaOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- natrijev klorid, NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- natrijev nitrat, NaNO_2 (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Sve kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su *pro analysi* čistoće. Za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

3.1.2. Oprema

Za istraživanje je korištena sljedeća oprema:

- čitač mikropločica SpectraMax i3x (Molecular Devices, San Jose, CA, SAD),
- FTIR spektrometar Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham SAD),
- analitička vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, SAD),
- magnetska miješalica s grijanjem MSH-A (Witeg, Njemačka),

- centrifuga, Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska),
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach),
- mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Biološki pokus

3.2.1.1. Biljni model

Kao biljni model u ovome istraživanju korišten je običan luk (*A. cepa*). Upravo zbog jednostavnog načina čuvanja i rukovanja te niske cijene, običan luk predstavlja pogodan modelni organizam za ekotoksikološka istraživanja (Fiskesjö, 1985).

Lukovice običnog luka korištene u ovom istraživanju nabavljene su u lokalnoj sjemenari.

3.2.1.2. Priprema otopina BPA

Za izvođenje pokusa bilo je potrebno pripremiti „štok“ otopinu BPA. To je postignuto vaganjem 2 g BPA na analitičkoj vagi, a zatim je prebačen u odmjernu tikvicu volumena 10 mL. Budući da BPA nije topljiv u vodi, otapao se u etanolu. Otapanje je ubrzano grijanjem smjese na grijaćoj ploči. Nakon toga, odmjerna tikvica je nadopunjena do oznake, pri čemu je koncentracija pripremljene otopine BPA iznosila 200 g/L ili 2×10^5 mg/L.

Iz „štok“ otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/L pripremljene su radne otopine BPA željenih koncentracija (1, 5, 10, 25 i 50 mg/L) u destiliranoj vodi. Za izračun korištena je formula:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

Na primjer, za pripremu 250 mL (V_2) otopine BPA koncentracije 1 mg/L (c_2), uzet je volumen (V_1) od 0,00125 mL (ili 1,25 μ L) „štok“ otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/L (c_1). Volumeni „štok“ otopine BPA potrebni za izradu 250 mL (V_2) radnih otopina BPA ostalih koncentracija prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Priprema radnih otopina BPA iz „štok“ otopine koncentracije 2×10^5 mg/L

Koncentracija otopine BPA (mg/L)	1	5	10	25	50
V „štok“ otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/L	1,25	6,25	12,5	31,25	62,5

3.2.1.3. Postupak provođenja biološkog pokusa

Za biološki pokus odabrane su lukovice luka jednake veličine, bez znakova truljenja, plijesni, zelenih listova ili sušenja. Lukovice su pripremljene tako da su im uklonjeni osušeni korijenčići s baze i vanjske ljuske koje su se počele ljuštiti, nakon čega su stavljene u epruvete napunjene destiliranom vodom. Postavljene su na vrh epruveta s bazom uronjenom u destiliranu vodu. Pripremljene epruvete ostavljene su dva dana na mjestu bez izravnog sunčevog zračenja, na temperaturi od oko 20 °C. Nakon dvodnevnog naklijavanja, lukovice su pripremljene za trodnevni tretman. Odabrane su samo one lukovice koje su proklijale i imale pravilno razvijeno korijenje, dok su lukovice s izrazito kratkim ili dugim korijenjem isključene iz pokusa. Lukovice su nasumično podijeljene u 6 skupina, a svaka skupina sadržavala je 10 lukovica ($n=10$). Potom su lukovice prebačene u epruvete s pripremljenim otopinama BPA u rasponu koncentracija od 1 do 50 mg/L, ili u epruvetu s negativnom kontrolnom otopinom (destiliranom vodom). Epruvete su smještene na mjesto bez izravnog sunčevog zračenja, pri temperaturi od oko 20 °C tijekom iduća 3 dana (72 sata).

3.2.1.4. Priprema fosfatnog pufera

Za izradu fosfatnog pufera korišteni su NaCl, KCl, Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 . Prvo je na analitičkoj vagi odvagano 8 g NaCl, potom 1,44 g Na_2HPO_4 pa 0,2 g KCl i zadnje 0,24 g KH_2PO_4 . Sve odvagane soli prebačene su u odmjernu tikvicu od 1 L koja je nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. Potom je pripremljenoj otopini pomoću pH metra podešen pH na 7,4.

3.2.1.5. Priprema homogenata biljnog tkiva

Nakon izlaganja BPA prikupljene su lukovice luka i osušene u sušioniku na 60 °C (slika 4). Osušeni biljni materijal pospremljen je do analize na suhome i tamnome mjestu. Prije same analize pripremljen je homogenat homogeniziranjem usitnjenog biljnog materijala u fosfatnom puferu koncentracije 50 mg/mL. Za homogeniziranje korišten je tarionik s tučkom. Homogenati su potom centrifugirani (10000 g tijekom 10 minuta).



Slika 4. Osušena lukovica običnog luka.

3.2.2. Određivanje razine BPA u lukovicama pomoću FTIR-a

Prisustvo BPA u lukovicama određeno je pomoću FTIR-a. Mali dio usitnjenog biljnog materijala (usitnjene lukovice luka) stavljen je u držač uzorka FTIR-a. Potom je svakom od uzoraka izmjeren spektar u rasponu 4000-400 cm^{-1} . Prije svake analize napravljen je snimak pozadine s praznim držačem uzorka. Svaki je uzorak snimljen u triplikatu. IR spektar obrađen je uspoređivanjem vibracija atoma u uzorku.

3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

3.2.3.1. Princip metode

Sadržaj ukupnih flavonoida (TF) u ekstraktima određen je spektrofotometrijskim mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini 510 nm (Zhishen i sur., 1999). Metoda

za određivanje flavonoida temelji se na njihovoj sposobnosti da tvore komplekse s aluminijevim kloridom (AlCl_3), pri čemu je intenzitet boje proporcionalan količini prisutnih flavonoida. Koncentracija TF u uzorcima izračunava se pomoću baždarne krivulje koja se dobiva mjerenjem apsorpcije otopina kvercetina poznatih koncentracija te se izražava u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm).

3.2.3.2. Postupak izvođenja mjerenja

Sadržaj TF ekstrakta lukovica pripremljenih u fosfatnom puferu određen je pomoću AlCl_3 . Prvo je volumen od 10 μL ekstrakta lukovica razrijeđen u 40 μL destilirane vode, nakon čega je dodan volumen od 3 μL NaNO_2 (5%). Nakon inkubacije od 5 minuta, dodan je volumen od 3 μL AlCl_3 (10%) i smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi još 6 minuta. Nakon toga, dodano je 20 μL NaOH (1 M) i destilirane vode do konačnog volumena od 100 μL . Apsorpcija reakcijske smjese očitana je na 510 nm.

Sadržaj TF u pojedinim uzorcima izračunat je iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorpcije etanolnih otopina kvercetina poznatih koncentracija (0 – 0,5 mg/mL) i izražen je u miligramima ekvivalenta kvercetina po gramu suhe mase uzorka (mg QE/g sm).

3.2.4. Određivanje ukupnih flavonola i hidroksicimetnih kiselina

3.2.4.1. Princip metode

Jednostavan način za detekciju flavonola i HCA uključuje dodavanje klorovodične kiseline ekstraktu što rezultira pojavom crvene boje (Howard i sur., 2003).

3.2.4.2. Postupak izvođenja mjerenja

Za određivanje ukupnog sadržaja hidroksicimetnih kiselina (THC) i ukupnih flavonola (TFL) ekstrakata lukovica luka pripremljenih u fosfatnom puferu kao standardi koristili su se kavena kiselina i kvercetin. Volumen od 25 mL ekstrakta lukovica (50 g/L) pomiješan je s 25 mL HCl (1 g/L u etanolu) i 455 mL HCl (2 g/L). Apsorpcija otopine očitana je na 320 nm i na 360 nm. Sadržaji THC i TFL izračunati su iz odgovarajućih kalibracijskih krivulja i izraženi kao ekvivalenti kavene kiseline i kvercetina po gramu suhe mase uzorka.

3.3. Statistička obrada rezultata

Dobiveni rezultati sadržaja TF, ukupnih TFL i THC prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD). Statistička analiza rezultata napravljena je pomoću računalnog programa Statistica 14.0.1.25. (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Podaci su obrađeni na način da su se pojedinačno i međusobno usporedili kontrola i tretmani pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA test) te primjenom *Duncan's New Multiple Range Test*-a. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Akumulacija BPA u lukovicama luka

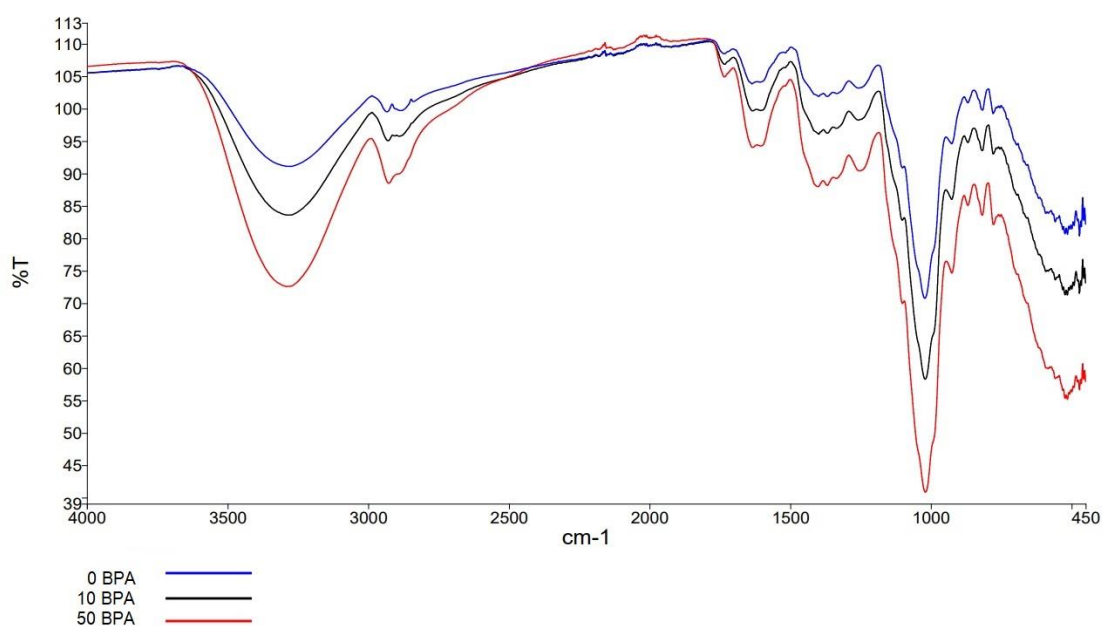
U ovom istraživanju za određivanje akumulacije BPA u lukovicama luka nakon izlaganja BPA korišten je FTIR. Fourierova transformacijska infracrvena, FTIR spektroskopija, jedna je od najvažnijih nedestruktivnih analitičkih tehnika koja se koristi za identifikaciju funkcionalnih skupina kemijskih spojeva. To je brza, visoko ponovljiva, jeftina i jednostavna tehnika koja se može koristiti i u utvrđivanju biljnih sastavnica (Wongsa i sur., 2022).

Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) dolazi do promjene vibracijske energije molekule. Uzorak koji je izložen infracrvenom (IR) zračenju, uz kontinuiranu promjenu valne duljine, apsorbira zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskim vibracijama. Apsorpcijska vrpca IR spektra pojavljuje se kada inducirana vibracija uzrokuje promjenu dipolnog momenta molekule rastezanjem i savijanjem veza, a ovisi o čvrstoći veze, masi atoma, susjednim skupinama i vanjskim čimbenicima poput otapala. Vibracijski spektar kemijske molekule smatra se jedinstvenim fizičkim svojstvom, a spektri snimljeni u IR području pokazuju karakteristične vrhove. Transmisija infracrvenog spektra je mjera koliko svjetlosti prolazi kroz uzorak tijekom mjerenja spektra. To je omjer intenziteta svjetlosti koja prolazi kroz uzorak i intenziteta svjetlosti koji se apsorbira. Kada se IR spektrofotometrija koristi u svrhu identifikacije određenog spoja, potrebno je snimljeni spektar usporediti sa snimljenim spektrom poredbene tvari ili njezinim poredbenim spektrom iz spektralne knjižice. Snimljeni IR spektar mora imati apsorpcijske maksimume na istim valnim duljinama te približno jednak intenzitet apsorpcijskih vrhova, koji se moraju slagati u oba spektra pod uvjetom da se uzorak priprema i mjeri u istim uvjetima kao i poredbena tvar. Usporedba može biti vizualnim putem ili programskim matematičkim izračunom (Nigović i sur., 2019).

Spektri apsorpcije sušenih biljnih ekstrakata prema istraživanju Wongsa i suradnika (2022) u rasponu od 4000 do 1800 cm^{-1} su slični. Općenito, područje od $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na simetrično i asimetrično rastezanje polimernih hidroksilnih skupina (O–H), rastezanje vodikovih veza, što je karakteristično za polifenolne spojeve, a biljke su bogate polifenolima. Osim toga, rastezanje fenolnog C–O vidljivo je na otprilike 1200 cm^{-1} . Ovo rastezanje uzrokovano je C–O vezama pirana, što je tipično za C-prstene flavonoida. Područje u rasponu od 1400 do 900 cm^{-1} često se naziva "regijom otiska prsta" zbog velikog broja

karakterističnih pojedinačnih vrhova niskog intenziteta koji se pripisuju specifičnim funkcionalnim skupinama. Među ovim skupinama uključene su C–H, C–O, C–N i P–O veze (Wongsa i sur., 2022).

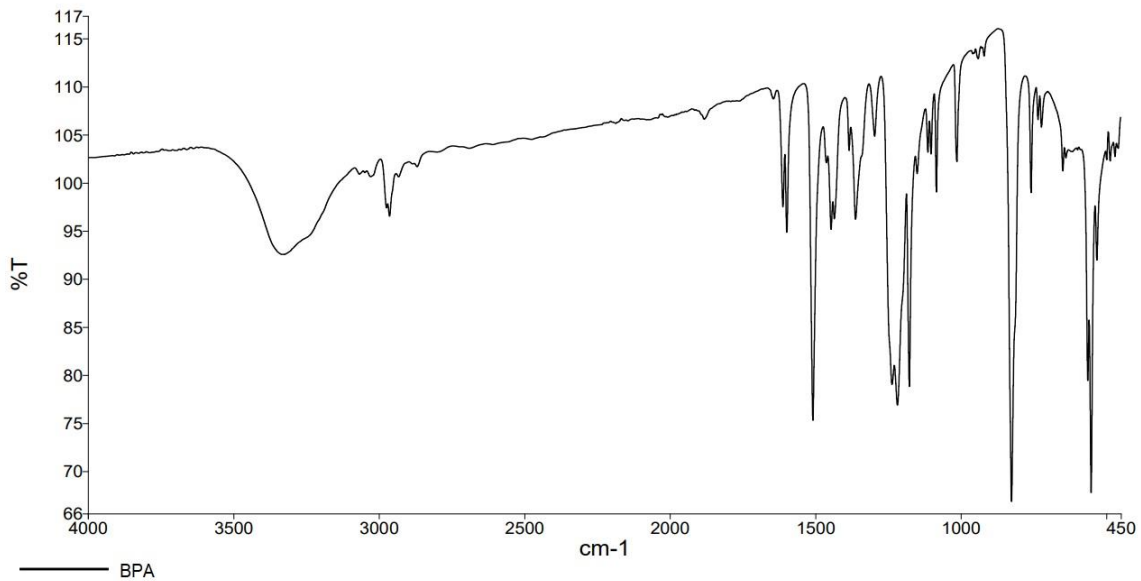
U ovom istraživanju luk je bio izložen otopinama BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L tijekom tri dana, a lukovice su potom osušene te je prisustvo BPA utvrđeno pomoću FTIR-a. Rezultati su prikazani na slici 5. Snimljeni spektri uzoraka lukovica luka pokazali su jedinstven signal između 3500 i 3000 cm^{-1} , karakterističan za polifenole (slika 5). Navedeni signal vidljiv je kod svih uzoraka, uključujući i kontrolni uzorak koji nije tretiran s BPA. To nije iznenađujuće jer je luk bogat polifenolima te se u tom području (3500 i 3000 cm^{-1}) i očekivao signal polifenola.



Slika 5. Apsorpcijski spektri lukovica izloženih destiliranoj vodi (kontrola) i BPA (u koncentraciji od 10 i 50 mg/L) određeni pomoću FTIR-a.

Stoga, kako bi se lakše utvrdilo prisustvo BPA u lukovicama luka, snimljen je pomoću FTIR-a spektar samo BPA (slika 6). Pokazano je da je signal BPA u području u kojem je i signal karakterističan za polifenole (3500 i 3000 cm^{-1}). To se može objasniti činjenicom da je i BPA po kemijskoj strukturi fenol. Stoga rastezanje polimernih hidroksilnih skupina i vodikovih veza

koje se nalaze u strukturi BPA također stvaraju signal u istom karakterističnom području kao i polifenoli.



Slika 6. Apsorpcijski spektar BPA određen pomoću FTIR-a.

Dobiveni spektar BPA i apsorpcijske vrpce tretiranih uzoraka uspoređene su te je identificirana i potvrđena prisutnost BPA. Kontrolni uzorak (koji nije bio izložen BPA) imao je najveću transmisiju od 93%. S porastom koncentracije BPA dolazi do pada transmisije. Prema Beer – Lambertovom zakonu, s povećanjem koncentracije tvari povećava se i apsorpcija IR svjetlosti u uzorku. S povećanjem apsorpcije, smanjuje se količina svjetlosti koja prolazi kroz uzorak, a rezultat je smanjenje transmisije. Tretmani prate trend pada transmisije s porastom koncentracije BPA. Na slici 5 vidljiv je pad transmisije s 93% na 85% kod tretmana BPA od 10 mg/ L te pad transmisije na 75% kod tretmana BPA od 50 mg/L.

Taj pad transmisije ukazuje na akumulaciju BPA u uzorcima lukovica luka s povećanjem koncentracije BPA u otopini. Najveći pad transmisije u tretmanu od 50 mg/L sugerira najveći porast u nakupljanju BPA. U usporedbi s kontrolnim uzorkom, u kojem snimljeni spektar prikazuje karakterističan signal prirodnih polifenola u luku, u tretmanima od 10 i 50 mg/L vidljiv je pad transmisije. S obzirom da su lukovice tretirane otopinama BPA, koji daje signal u istom području kao i drugi polifenoli, može se zaključiti da je pad transmisije uvjetovan porastom koncentracija BPA u uzorku, odnosno dokazano je nakupljanje BPA u lukovicama običnog luka.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja potvrđuju istraživanje koje su proveli Ferrara i suradnici (2006). I u tom istraživanju zabilježeno je nakupljanje BPA u klijancima rajčice. Za određivanje BPA u biljnom materijalu, za razliku od ovoga istraživanja Ferrara i suradnici (2006) koristili su tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti. Važno je naglasiti da u ovom istraživanju lukovice nisu bile direktno izložene otopinama BPA, već je do akumulacije došlo nakon trodnevnog izlaganja putem korjenčića. Isti se proces može odvijati u prirodi kada je u tlu ili vodi prisutan BPA.

4.2. Utjecaj BPA na sadržaj polifenola u lukovicama luka

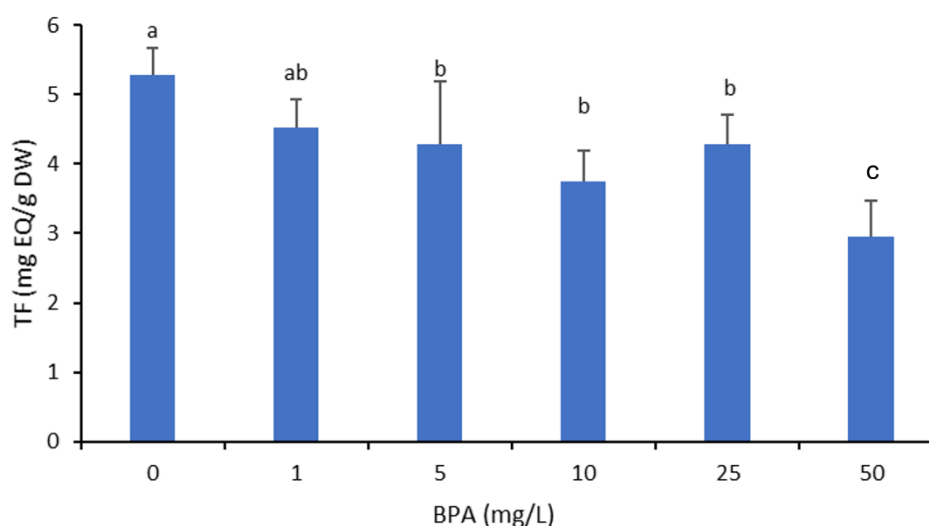
Usvajanjem raznih mehanizama preživljavanja biljke mogu izbjeći oštećenja i osigurati svoj rast i razvoj u nepovoljnim uvjetima okoliša. Glavni metaboliti biljaka koji joj omogućuju preživljavanje u stresnim uvjetima su polifenoli (Šamec i sur., 2021; Pandey i Rizvi, 2009). S obzirom da biljke različito reagiraju na abiotske i biotske čimbenike stresa, tako i različiti polifenoli imaju različit mehanizam djelovanja u obrani i zaštiti biljke od stresa. Stoga je u ovom istraživanju ispitan učinak BPA na više polifenola i to TF, THC i TFL u lukovicama običnog luka.

Prethodna istraživanja pokazala su da je jedan od mehanizama toksičnosti BPA proizvodnja ROS-ova (Vujčić Bok i sur., 2023). Izloženost luka BPA dovela je do porasta razine ROS-ova te porasta sadržaja malondialdehida (MDA), koji se smatra biomarkerom oštećenja lipida u membranama stanica biljaka. ROS-ovi također mogu aktivirati antioksidacijski sustav i mogu potaknuti proizvodnju antioksidacijskih neenzimskih tvari poput polifenola (Malea i sur., 2022).

U ovom je istraživanju nakon trodnevnog izlaganja luka BPA u lukovicama izmjeren sadržaj TF. Na slici 7 je vidljivo da je već BPA u koncentraciji od 5 mg/L doveo do statistički značajnog smanjenja sadržaja TF. Sadržaj TF u kontroli (koja nije bila izložena BPA) bio je oko 5,26 mg EQ/g suhe tvari, dok je nakon izloženosti BPA u koncentraciji 5 mg/L bila oko 4,28 mg EQ/g suhe tvari. Najviša koncentracija BPA od 50 mg/L uzrokovala je najveći pad u sadržaju TF na oko 2,93 mg EQ/g suhe tvari što predstavlja najveću statistički značajnu razliku u sadržaju TF u usporedbi s kontrolom.

Flavonoidi sudjeluju u obrambenim procesima kako bi zaštitili biljke kada su izložene različitim štetnim čimbenicima. Sudjeluju u detoksikaciji, imaju antimikrobni učinak te služe

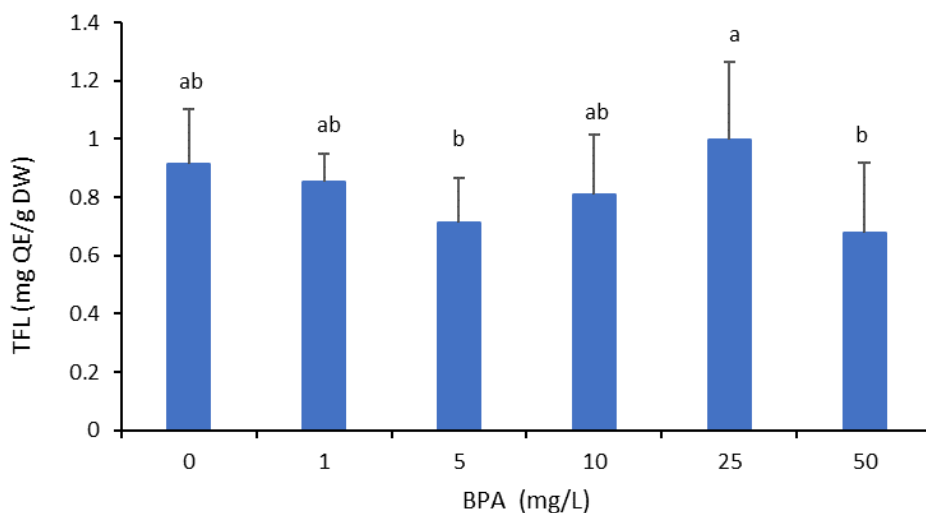
kao filter za UV zračenje. Djeluju antioksidativno stoga što mogu neutralizirati ROS-ove kada se biljka nađe u biotičkim i abiotičkim uvjetima stresa. Mogu inhibirati aktivnosti enzima koji sudjeluju u nastanku ROS-ova, čime potiču antioksidativni obrambeni sustav (Shomali i sur., 2022). Kako bi se nosile s oksidativnim oštećenjem, biljke proizvode antioksidacijske enzime (npr. katalazu, askorbat peroksidazu, glutation peroksidazu, glutation reduktazu). Međutim, u ekstremnim uvjetima okolišnog stresa, proizvodnja antioksidansa u biljkama ne može pratiti opseg oksidacije, što rezultira povećanom koncentracijom ROS-ova u stanicama (Gupta i sur., 2018). U takvim okolnostima, antioksidacijska svojstva flavonoida pomažu biljkama da uravnoteže pretjeranu proizvodnju ROS-a i poprave nastalu štetu. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se upravo to dogodilo i u ovom istraživanju. Izloženost luka BPA dovela je do pada sadržaja TF što je bilo ovisno o koncentraciji BPA. To znači da je BPA inducirao stres u stanicama lukovica luka, koje su, da bi se obranile od stresa „trošile“ TF.



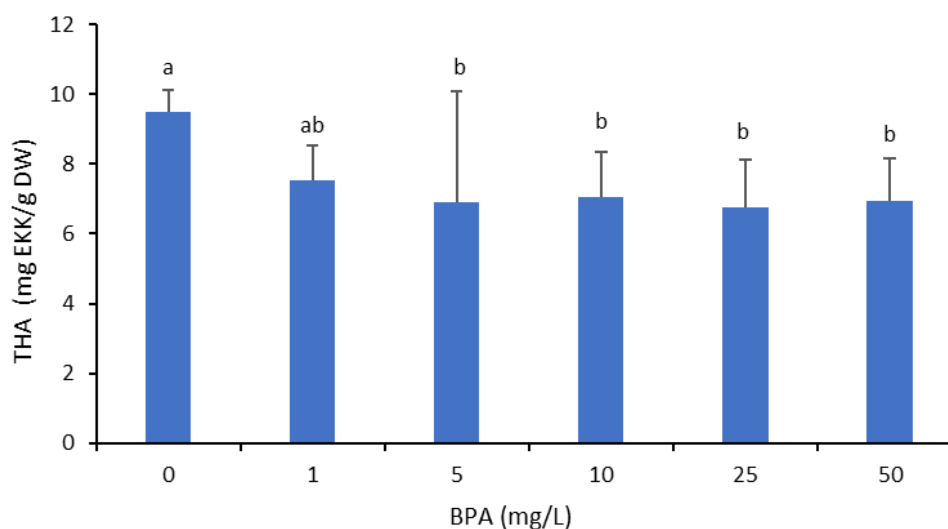
Slika 7. Sadržaj TF u lukovicama luka nakon trodnevne izloženosti BPA u koncentracijskom rasponu 0-50 mg/L. Stupići označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju.

U sljedećem koraku u lukovicama luka koje su bile izložene BPA u koncentracijskom rasponu 0-50 mg/L izmjeren je sadržaj TFL. Rezultati su prikazani na slici 8. Sadržaj TFL nije se razlikovao između kontrole i tretmana od 1 mg/L i 10 mg/L. Najviši sadržaj TFL izmjeren je u uzorku od 25 mg/L te je iznosio oko 0,99 mg QE/g suhe tvari, a najniže vrijednosti TFL izmjerene su u uzorcima od 5 mg/L i 50 mg/L, a iznosile su oko 0,71 te oko 0,68 mg QE/g suhe

tvori, no nisu se značajno razlikovale od kontrole koja nije bila izložena BPA. Ovi rezultati pokazuju da BPA nema značajnijeg utjecaja na sadržaj TFL.



Slika 8. Sadržaj TFL u lukovicama luka nakon trodnevne izloženosti BPA u koncentracijskom rasponu 0-50 mg/L. Stupići označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju.



Slika 9. Sadržaj THC u lukovicama luka nakon trodnevne izloženosti BPA u koncentracijskom rasponu 0-50 mg/L. Stupići označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju.

Slika 9 prikazuje sadržaj THC u lukovicama luka nakon trodnevnog izlaganja BPA u koncentracijskom rasponu 0-50 mg/L. Do statistički značajnog smanjenja THC došlo je nakon izloženosti BPA u koncentraciji 5 mg/L kada je izmjeren pad THC s oko 9,48 mg EKK/g suhe tvari na oko 6,89 EKK/g suhe tvari u usporedbi s kontrolom. Nakon izloženosti BPA u koncentracijama 10, 25 i 50 mg/L također je zabilježen pad sadržaja THC na vrijednost oko 6,44, 6,74 te 6,53 mg EKK/g suhe tvari. U uzorcima izloženim BPA u koncentraciji 1 mg/L nije zabilježena statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom.

Kako bi se obranile od oksidativnog stresa, biljke se različito prilagođavaju uvjetima u kojima se nalaze. Fenolne kiseline biljke luče kao odgovor na abiotički ili biotički stres (Khawula i sur., 2023). HCA igraju ključnu ulogu u preživljavanju i rastu biljaka u izazovnim uvjetima. Mogu aktivirati obrambene gene, ojačati stanične stijenke, regulirati oksidativni stres i poticati nakupljanje lignina (González-Rodríguez i sur., 2024). Mehanizam djelovanja uključuje smanjenje oksidativnih oštećenja radi održavanja stanične homeostaze i zaštite vitalnih staničnih komponenti od oštećenja (Khawula i sur., 2023). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je izloženost BPA dovela do smanjenja sadržaja THC, odnosno da je biljka trošila THC u obrani od vanjskog stresa koji predstavlja BPA.

Malea i suradnici (2022) pokazali su da je izloženost biljnog modela *Cymodocea nodosa* niskim koncentracijama BPA (0,3 µg/L tijekom jednog dana) povećala razinu ukupnih polifenola, međutim viša koncentracija BPA (3 µg/L tijekom jednog dana) smanjila je njihovu razinu. Drugo istraživanje pokazalo je da je izloženost višim koncentracijama BPA (30 i 120 µg/mL) u korijenju modela *Vicia faba* povećalo razinu TF (Nie i Wang, 2022). Budući da biljke, kako bi se nosile sa stresom, sintetiziraju polifenole, Malea i suradnici (2022) objasnili su povećanje TF-a činjenicom da je BPA aktivirao antioksidativni zaštitni mehanizam biljaka.

U ovome istraživanju korjenčići luka bili su izloženi BPA u koncentracijskom rasponu 1-50 mg/L kroz tri dana. Potom je u lukovicama luka koje nisu bile direktno izložene BPA pomoću FTIR-a utvrđeno prisustvo BPA. Time je potvrđeno da i nakon samo trodnevnog izlaganja lukovice luka mogu akumulirati BPA. Pored toga u lukovicama luka zabilježen je pad sadržaja TF i THC, a nije zabilježena značajnija razlika u sadržaju TFL. Stoga se može zaključiti da je izloženost BPA uzrokovala oksidacijski stres i trošenje antioksidansa, točnije TF i THC u obrani od stresa kojega za biljku predstavlja BPA.

5. Zaključci

Iz dobivenih rezultata ovoga istraživanja može se zaključiti:

1. Biljke mogu akumulirati BPA nakon vrlo kratkog izlaganja (samo tri dana) i u onim organima koji nisu bili direktno izloženi BPA.
2. Izloženost BPA dovodi do smanjenja sadržaja polifenola i to TF i THC što pokazuje da je BPA uzrokovao oksidacijski stres u lukovicama luka.

6. Popis kratica

AR – androgeni receptor

BPA - bisfenol A

C/EBP - proteini koji vežu CCAAT (engl. *CCAAT-enhancer-binding proteins*)

DHT - dihidrotestosteron

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

ER - estrogenski receptor

FTIR - infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)

GPR – G protein spregnuti receptor

HCA – hidroksicimetne kiseline

MDA - malondialdehid

NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat

Nrf2 - Faktor 2 povezan s nuklearnim faktorom eritroidom 2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

PPAR - peroksisom proliferator aktivirani receptor

RNA – ribonukleinska kiselina

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive oxygen species*)

STAT3 - transduktor signala i aktivator transkripcije 3

THC – ukupne hidroksicimetne kiseline (engl. *Total hydroxy cinnamic acids*)

TF – ukupni flavonoidi (engl. *Total flavonoids*)

TFL – ukupni flavonoidi (engl. *Total flavonols*)

UDP – UGT – uridin 5'-difosfo-glukuronozil transferaza

7. Literatura

A Closer Look at the Global Bisphenol A Market: Demand, Regulations & Sustainability, 2023., A Closer Look at the Global Bisphenol A Market: Demand, Regulations & Sustainability | Merchant Research & Consulting, Ltd. (mcgroup.co.uk), pristupljeno 18.04.2024.

Ali I, Wakeel A, Upreti S, Liu D, Azizullah A, Jan M, Ullah W, Liu B, Ali A, Daud MK, Gan Y. Effect of Bisphenol A-induced Oxidative Stress on the Ultra Structure and Antioxidant Defence System of *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Polish J Environ Stud*, 2018, 27(3), 967-978.

Baldi S, Tristán Asensi M, Pallecchi M, Sofi F, Bartolucci G, Amedei A. Interplay between Lignans and Gut Microbiota: Nutritional, Functional and Methodological Aspects. *Molecules*, 2023, 28, 343.

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(1), 39-44.

Canesi L, Fabbri E. Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. *Dose Response*, 2015, 13(3).

Cimmino I, Fiory F, Perruolo G, Miele C, Beguinot F, Formisano P, Oriente F. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16), 5761.

Chakraborty AJ, Uddin TM, Matin Zidan BMR, Mitra S, Das R, Nainu F, Dhama K, Roy A, Hossain MJ, Khusro A, Emran TB. *Allium cepa*: A Treasure of Bioactive Phytochemicals with Prospective Health Benefits. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022, 4586318.

Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, Brooks BW. Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-response*, 2015, 13(3), 1559325815598308.

Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot*, 2015, 109, 212–228.

Dorrigiv M, Zareiyan A, Hosseinzadeh H. Onion (*Allium cepa*) and its Main Constituents as Antidotes or Protective Agents against Natural or Chemical Toxicities: A Comprehensive Review. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(1), 3-26.

Ferrara G, Loffredo E, Senesi N. Phytotoxic, clastogenic and bioaccumulation effects of the environmental endocrine disruptor bisphenol A in various crops grown hydroponically. *Planta*, 2006, 223, 910-6.

Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 1985, 102, 99-112.

González-Rodríguez T, García-Lara S. Maize hydroxycinnamic acids: unveiling their role in stress resilience and human health. *Front Nutr*, 2024, 11, 1322904.

González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA, García-Villalba R. Structural diversity of polyphenols and distribution in foods. U: *Dietary Polyphenols: Their Metabolism and Health Effects*, Wiley, 2020, str. 1-29.

Greiner E, Kaelin T, Toki, G. Bisphenol A. U: *A Chemical Economics Handbook*. SRI Consulting Menlo Park, CA, USA, 2004.

Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ. Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Springer Nature, 2018, str. 1-300.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*, 2002, 347, 284-287.

Howard LR, Clark JR, Brownmiller C. Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Blueberries as Affected by Genotype and Growing Season. *J Sci Food Agric*, 2003, 83, 1238–1247.

Iqbal I, Wilairatana P, Saqib F, Nasir B, Wahid M, Latif, MF, Iqbal A, Naz R, Mubarak MS. Plant Polyphenols and Their Potential Benefits on Cardiovascular Health: A Review. *Molecules*, 2023, 28, 6403.

Kavalcová P, Bystrická J, Trebichalský P, Kopernická, M, Hrstková M, Lenková M. Content of total polyphenols and antioxidant activity in selected varieties of onion (*Allium cepa* L.). *Pot Slovak J Food Sci*, 2015, 9(1), 494–500.

Khawula S, Gokul A, Niekerk LA, Basson G, Keyster M, Badiwe M, Klein A, Nkomo M. Insights into the Effects of Hydroxycinnamic Acid and Its Secondary Metabolites as Antioxidants for Oxidative Stress and Plant Growth under Environmental Stresses. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 46(1), 81-95.

Kim D, Kwak JI, An YJ. Effects of bisphenol A in soil on growth, photosynthesis activity, and genistein levels in crop plants (*Vigna radiata*). *Chemosphere*, 2018, 209, 875-882.

Kim JJ, Kumar S, Kumar V, Lee YM, Kim YS, Kumar V. Bisphenols as a legacy pollutant, and their effects on organ vulnerability. *Int J Environ Res Public Health*, 2020 17(1), 112.

Kim Y, Kim YJ, Shin Y. Comparative Analysis of Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Different Parts of Five Onion Cultivars Harvested in Korea. *Antioxidants*, 2024, 13, 197.

Kianian F, Marefati N, Boskabady M, Ghasemi SZ, Boskabady MH. Pharmacological Properties of *Allium cepa*, Preclinical and Clinical Evidences; A Review. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(2), 107-134.

Kurtagić H. Polifenoli i flavonoidi u medu. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2017, 6(1), 28-35.

Lachman J, Pronek D, Hejtmánková A, Dudjak J, Pivec V, Faitová K. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Horticul Sci*, 2003, 142-147.

Li YT, Liang Y, Li YN, Che XK, Zhao SJ, Zhang ZS, Gao HY. Mechanisms by which Bisphenol A affect the photosynthetic apparatus in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. *Sci Rep*, 2018, 8(1), 4253.

Luo Y, Jian Y, Liu Y, Jiang S, Muhammad D, Wang W. Flavanols from Nature: A Phytochemistry and Biological Activity Review. *Molecules*, 2022, 27(3), 719.

Malea P, Kokkinidi D, Kevrekidou A, Adamakis I-DS. The Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant System Response of the Seagrass *Cymodocea nodosa* to Bisphenol-A Toxicity. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 1348.

Metrani R, Singh J, Acharya P, K Jayaprakasha G, S Patil B. Comparative Metabolomics Profiling of Polyphenols, Nutrients and Antioxidant Activities of Two Red Onion (*Allium cepa* L.) Cultivars. *Plants*, 2020, 9(9), 1077.

Molina-López AM, Bujalance-Reyes F, Ayala-Soldado N, Mora-Medina R, Lora-Benítez A, Moyano-Salvago R. An Overview of the Health Effects of Bisphenol A from a One Health Perspective. *Animals*, 2023, 13(15), 2439.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6623, Bisphenol A, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>, pristupljeno 18.04.2024.

Nie M, Yang Y, Liu M, Yan C, Shi H, Dong W, Zhou JL. Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: occurrence, colloidal contribution and risk assessment. *Sci Total Environ*, 2014, 487, 785-91.

Nie X, Wang L. Plant species compositions alleviate toxicological effects of bisphenol A by enhancing growth, antioxidant defense system, and detoxification. *Environ Sci Pollut Res*, 2022, 29, 65755–65770.

Nigović B, Mornar Turk A, Sertić M, Klarić Amidžić D. Vježbe iz Analitike lijekova - Priručnik za studente farmacije. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022, str. 15-17.

Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicol Lett*, 2013, 223 (3), 295–305.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2(5), 270-8.

Ptak A, Gregoraszczyk EL. Bisphenol A induces leptin receptor expression, creating more binding sites for leptin, and activates the JAK/Stat, MAPK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways in human ovarian cancer cell. *Toxicol Lett*, 2012, 210(3), 332-337.

Rochfort SJ, Imsic M, Jones R, Trennery VC i Tomkins B. Characterization of flavonol conjugates in immature leaves of Pak Choi [*Brassica rapa* L. Ssp. *chinensis* L. (Hanelt.)] by HPLC-DAD and LC-MS/MS. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(13), 4855-4860.

Shomali A, Das S, Arif N, Sarraf M, Zahra N, Yadav V, Aliniaiefard S, Chauhan DK, Hasanuzzaman M. Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. *Plants (Basel)*, 2022, 11(22), 3158.

Song H, Zhang T, Yang P, Li M, Yang Y, Wang Y, Du J, Pan K, Zhang K. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR γ signals. *Toxicol In Vitro*, 2015, 30 (1 Pt B), 521-528.

Šamec D, Karalija E, Šola I, Vujčić Bok V, Salopek-Sondi B. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants (Basel)*, 2021, 10(1), 118.

Tsai WT. Human health risk on environmental exposure to Bisphenol-A: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2006, 24(2), 225-255.

Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 2020, 25(22), 5243.

Wazir U, Mokbel K. Bisphenol A: a concise review of literature and a discussion of health and regulatory implications. *In Vivo*, 2019, 33(5), 1421-1423.

Wongsa P, Phatikulrungsun P, Prathumthong S. FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions. *Sci Rep*, 2022, 12, 6631.

Xiao C, Wang L, Zhou Q, Huang X. Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: A systematic review of plant toxicology studies. *J Hazard Mat*, 2020, 384, 121488.

Valentino R, D'Esposito V, Ariemma F, Cimmino I, Beguinot F, Formisano P. Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population?. *J Endocrinol Invest*, 2016, 39(3), 259-263.

Vogel SA. The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a “safety”. *Am J Public Health*, 2009, 99(3), 559-566.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chem*, 1999, 64, 555–559.

8. Sažetak / Summary

Bisfenol A (BPA) ima široku primjenu te se stoga nalazi u okolišu u sve većoj koncentraciji. Zbog toga je izloženost BPA neminovna. Izloženost BPA povezuje se s nizom negativnih učinaka na zdravlje ljudi. Provode se brojna istraživanja na biljnom i na animalnom modelu kako bi se razjasnio mehanizam djelovanja BPA. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak BPA na razinu polifenola i njegovu akumulaciju u biljkama. Kao biljni model korišten je običan luk (*Allium cepa* L.). Luk (šest skupina po 10 lukovica) izložen je otopinama BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/L. U istraživanje je uključena skupina lukovica koja je bila izložena samo destiliranoj vodi (10 lukovica, kontrola). Nakon trodnevnog izlaganja u lukovicama luka određena je razina BPA pomoću FTIR-a, a sadržaj ukupnih fenola (TF), ukupnih flavnola (TFL) i ukupnih hidrokisicimernih kiselina (THC) spektrofotometrijski.

Rezultati istraživanja pokazali su da se BPA može detektirati u lukovicama luka već i nakon tri dana izloženosti otopinama BPA. Također, izloženost BPA dovela je do smanjenja sadržaja TF i THC ovisno o koncentraciji BPA. Stoga se može zaključiti da biljke akumuliraju BPA te da BPA u biljkama uzrokuje oksidacijski stres koji se očituje smanjenjem sadržaja polifenola koji se troše u obrani od stresa.

Bisphenol A (BPA) has numerous uses and as consequence its concentration in the environment is increasing. That makes exposure to BPA inevitable. Human exposure to BPA is associated with a range of adverse effects. Numerous studies are conducting in both, plant and animal models in order to clarify the mechanisms of BPA action. The aim of this study was to investigate the effect of BPA on the level of polyphenols and its accumulation in plants. As study model common onion (*Allium cepa* L.) was used. Onions (six groups of 10 bulbs each) were exposed to BPA solutions in concentrations range 1-50 mg/L. The study also included a control group (one group of 10 bulbs) that was exposed to distilled water. After three days of exposure, in the onion bulbs the BPA levels were determined using FTIR, while the total phenol (TF), total flavanol (TFL), and total hydroxycinnamic acid (THC) contents were determined spectrophotometrically.

The results of this study showed that BPA could be detected in the onion bulbs even after three days of exposure to BPA. Additionally, exposure to BPA led to a reduction in TF and

THC content, that was depended on the BPA concentration. Therefore, it can be concluded that plants accumulate BPA and that BPA in plants causes oxidative stress, which is manifested by a reduction in polyphenol content that is consumed for defence against oxidative stress.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj bisfenola A na sadržaj polifenola u lukovicama običnog luka (*Allium cepa* L.)

Anja Đorđević

SAŽETAK

Bisfenol A (BPA) ima široku primjenu te se stoga nalazi u okolišu u sve većoj koncentraciji. Zbog toga je izloženost BPA neminovna. Izloženost BPA povezuje se s nizom negativnih učinaka na zdravlje ljudi. Provede se brojna istraživanja na biljnom i na animalnom modelu kako bi se razjasnio mehanizam djelovanja BPA. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak BPA na razinu polifenola i njegovu akumulaciju u biljkama. Kao biljni model korišten je običan luk (*Allium cepa* L.). Luk (šest skupina po 10 lukovica) izložen je otopinama BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/L. U istraživanje je uključena skupina lukovica koja je bila izložena samo destiliranoj vodi (10 lukovica, kontrola). Nakon trodnevnog izlaganja u lukovicama luka određena je razina BPA pomoću FTIR-a, a sadržaj ukupnih fenola (TF), ukupnih flavnola (TFL) i ukupnih hidroksicimetnih kiselina (THC) spektrofotometrijski.

Rezultati istraživanja pokazali su da se BPA može detektirati u lukovicama luka već i nakon tri dana izloženosti otopinama BPA. Također, izloženost BPA dovela je do smanjenja sadržaja TF i THC ovisno o koncentraciji BPA. Stoga se može zaključiti da biljke akumuliraju BPA te da BPA u biljkama uzrokuje oksidacijski stres koji se očituje smanjenjem sadržaja polifenola koji se troše u obrani od stresa.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 31 stranicu, 9 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bisfenol A, *Allium cepa*, polifenoli, flavonoidi, flavonoli, hidroksicimetne kiseline, FTIR

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lovorka Vujić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Emerik Galić, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The effect of bisphenol A on polyphenol content in bulbs of common onion (*Allium cepa* L.)

Anja Dorđević

SUMMARY

Bisphenol A (BPA) has numerous uses and as consequence its concentration in the environment is increasing. That makes exposure to BPA inevitable. Human exposure to BPA is associated with a range of adverse effects. Numerous studies are conducting in both, plant and animal models in order to clarify the mechanisms of BPA action. The aim of this study was to investigate the effect of BPA on the level of polyphenols and its accumulation in plants. As study model common onion (*Allium cepa* L.) was used. Onions (six groups of 10 bulbs each) were exposed to BPA solutions in concentrations range 1-50 mg/L. The study also included a control group (one group of 10 bulbs) that was exposed to distilled water. After three days of exposure, in the onion bulbs the BPA levels were determined using FTIR, while the total phenol (TF), total flavanol (TFL), and total hydroxycinnamic acid (THC) contents were determined spectrophotometrically.

The results of this study showed that BPA could be detected in the onion bulbs even after three days of exposure to BPA. Additionally, exposure to BPA led to a reduction in TF and THC content, that was depended on the BPA concentration. Therefore, it can be concluded that plants accumulate BPA and that BPA in plants causes oxidative stress, which is manifested by a reduction in polyphenol content that is consumed for defence against oxidative stress.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 31 pages, 9 figures, 1 table and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: bisphenol A, *Allium cepa*, polyphenoles, flavonoids, hidroxycinnamic acids, FTIR

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Emerik Galić, Ph.D. Senior Research Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: June 2024.