

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Dragana D. Bartolić

**Indikatori kontaminacije semena kukuruza  
(*Zea mays* L.) aflatoksinima**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Dragana D. Bartolić

**Indicators of maize (*Zea mays* L.) seed  
contamination by aflatoxins**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

**Komisija za odbranu doktorske disertacije:**

**Mentori:**

**dr Rada Baošić, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

**dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik**  
Univerzitet u Beogradu - Institut za multidisciplinarna istraživanja

**Članovi komisije:**

**dr Slavica Stanković, naučni savetnik**  
Univerzitet u Beogradu - Institut za kukuruz Zemun polje

**dr Miloš Mojović, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu - Fakultet za fizičku hemiju

**dr Milan Nikolić, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

**Datum odbrane:**

**U Beogradu, \_\_\_\_\_ 2022.**

# Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Odseka za nauke o živim sistemima Univerziteta u Beogradu-Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI). Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. OI173017.

Za ostvarenje ove doktorske disertacije zahvaljujem se svojim mentorima *dr Kseniji Radotić Hadži-Manić*, naučnom savetniku Univerziteta u Beogradu-Instituta za multidisciplinarna istraživanja, i *dr Radi Baošić*, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru *dr Kseniji Radotić Hadži-Manić*, za uvođenje u naučnoistraživački rad, na izboru tematike, na svesranoj pomoći i podršci u svim fazama izrade ove doktorske disertacije, kao i na poverenju koje mi je ukazala. Takođe, želela bih da se zahvalim na njenom pozitivom stavu i kritikama koje su od mene načinile boljeg naučnika i pre svega bolju osobu. Mentoru, *dr Radi Baošić* veliko hvala, na neizmernoj podršci i strpljenju, veoma korisnim savetima i svesrdnoj pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije, kao i na njenoj kritičkoj analizi.

Veliku zahvalnost dugujem *dr Slavici Stanković*, što je prihvatila da bude član komisije ove doktorske disertacije, i *dr Milici Nikolić* na dugogodišnjoj saradnji. Veliko hvala *dr Milošu Mojoviću*, redovnom profesoru Fakulteta za fizičku hemiju, članu komisije, na pomoći u eksperimentalnom radu koji se odnosi na EPR merenja, kao i *dr Đuri Nakaradi* na saradnji. Zahvaljujem se članu komisije *dr Milanu Nikoliću*, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, na izdvojenom vremenu, nesebičnoj pomoći i konstruktivnim primedbama koje su uticale da krajni oblik ove doktorske disertacije dobije na kvalitetu.

Veliko hvala *dr Jeleni Mutić*, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, na pomoći u eksperimentalnom delu vezanom za analizu sadržaja metala. *Dr Dragosavu Mutavdžiću*, neizmerno se zahvaljujem na pomoći oko statističke obrade rezultata, kao i na strpljenju i posvećenom vremenu koji mi je pružao. *Dr Vuku Maksimoviću* dugujem zahvalnost na pomoći pri HPLC analizi, kao i *dr Urošu Gašiću* za eksperimente vezane za orbitrap analize. Posebnu zahvalnost dugujem kolegici i prijateljici *Miri Stanković*, na nesebičnoj pomoći pri eksperimentalnom radu vezanom za spektrofotometriju i *dr Milošu Prokopijeviću* na stručnoj pomoći. Takođe, veliko hvala *dr Saši Krstoviću* na stručnoj saradnji. Hvala, *dr Slađani Žilić* i *Danki Obradović* na savetima i pomoći oko pripreme uzoraka. Kolegicama *dr Aleksandri Mitorvić* i *dr Mileni Dimitrijević*, najtoplije se zahvaljujem na lepom druženju i konstruktivnim sugestijama koje su mi pružale tokom izrade ove doktorske disertacije. Takođe, hvala *dr Branki Živanović* na inspirativnim diskusijama. Srdačno se zahvaljujem svim kolegama iz laboratorije Odseka za nauke o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu koji su bili uz mene.

Veliko hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci i razumevanju za vreme koje nisam provela sa njima. Hvala mojoj kumi *Jovani* na razumevanju, kao i sestri *Andrijani* na izutenoj podršci u svim izazovima koje sam pred sobom imala.

Neizmernu zahvalnost dugujem, ocu *Draganu*, majci *Ljiljani* i sestri *Ivani* na požrtvovanosti, ljubavi i što su uvek verovali u mene. Mojim sestricima *Lazaru* i *Lionelu*.

Ovu doktroksku disertaciju od srca posvećujem mom deki *Dragutinu*.

# Indikatori kontaminacije semena kukuruza (*Zea mays* L.) aflatoksinima

## Sažetak

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je praćenje indikatora kvaliteta semena kukuruza (*Zea mays* L.) kontaminiranog aflatoksinima, u zavisnosti od koncentracije aflatoksina prisutnog u semenu. Kako se kukuruz široko koristi u ljudskoj i životinjskoj ishrani, naučne studije o sadržaju i interakciji mikotoksina u semenima poljoprivrednih kultura su intenzivirane u poslednjoj deceniji. U okviru ove disertacije proučena je veza između nivoa kontaminacije semena kukuruza i marker molekula fenolnog tipa, ukupnog sadržaja i distribucije slobodnih organskih radikala, sadržaja metala, kao i fluorescentnog emisionog profila semena kukuruza. Fokus ovog istraživanja bio je na aflatoksinu B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), jednom od najštetnijih prirodnih kontaminanta koji se mogu naći u semenu kukuruza. Utvrđeno je da aflatoksini dovode do ozbiljnih zdravstvenih problema kod ljudi i životinja, kao i do ogromnih ekonomskih gubitaka, kao posledica smanjenja kvaliteta semena kao stočne hrane i izvozne prehrambene robe.

Prvi deo disertacije predstavlja hemijsku karakterizaciju semena kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom. Ultraefikasnom tečnom hromatografijom sa hibridnim masenim detektorom visoke rezolucije, koji kombinuje linearni trap-kvadrupol i orbitrap maseni analizator (*UHPLC-LTQOrbiTrapXL MS*), određen je fenolni profil metanolnih ekstrakata i hidrolizata ispitivanih semena. Nadalje, kvalitativna i kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja je urađena pomoću reverzno-fazne visoko-efikasne tečne hromatografije sa ultravioletnim detektorom sa više dioda (*DAD*) i masenim detektorom sa jednim analizatorom (engl. *single quadrupole*) i elektrosprej jonizacionim (*ESI*) izvorom (*RP-HPLC-DAD ESI-MS*). Rezultati pokazuju da su konjugati poliamina (hidroksicinamični kiseli amidi) i fenolne kiseline (ferulinska i *p*-kumarinska), redom, dominantna jedinjenja u metanolnim ekstraktima i hidrolizatima ispitivanih uzoraka. Utvrđeno je da sadržaj i odnos specifičnih fenolnih jedinjenja zavisi od koncentracije aflatoksina u semenu. Po prvi put, u ovoj studiji, je ustanovljena dozno-zavisna veza između odnosa zbira konjugata putrescina i spermidina i koncentracije AFB<sub>1</sub>. Rezultati dobijeni primenom UV-VIS spektrofotometrije potvrđuju postojanje dvofaznog odgovora semena na proučavani toksin. Pri višim nivoima kontaminacije u spoljašnjim frakcijama semena, utvrđen je veći sadržaj lignina, kao i veća količina jedinjenja koja se u literaturi označavaju kao markeri procesa lignifikacije, upućujući na jedan od mehanizama zaštite semena. Primenom indukovano kuplovane plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (*ICP-OES*) i masenom spektrometrijom (*ICP-MS*), određen je sadržaj mikro- i makroelemenata. Dobijeni rezultati pokazuju veći sadržaj Zn i Mn u semenima višeg nivoa kontaminacije, u poređenju sa kontrolom i nisko kontaminiranim uzorcima. Na matrice *HPLC* i *ICP* podataka, primenjena je analiza glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis, PCA*) u cilju diskriminacije semena različitih nivoa kontaminacije aflatoksinom, kao i za pronalaženje mogućih markera kontaminacije. Elektronska paramagnetna rezonantna (*EPR*) spektroskopija iskorišćena je za proučavanje sadržaja slobodnih organskih radikala u proučavanim uzorcima. Utvrđene su razlike u koncentraciji ovih radikala između spoljašnje i unutrašnje frakcije, kao i varijacije u pogledu nivoa kontaminacije.

Procena redoks statusa u ispitivanim semenima urađena je EPR imidžingom sa spinskim probama. Dobijeni rezultati daju doprinos razumevanju slobodno–radikalnog metabolizma i redoks statusa kontaminiranih semena.

Drugi deo doktorske disertacije obuhvatio je primenu naprednih metoda spektralne analize na fluorescentne emisije spektre ispitivanih uzoraka, kao što su multivarijaciona rezolucija krivih-naizmenični najmanji kvadrati (MCR–ALS), analiza glavnih komponenti, linearna diskriminaciona analiza i druge. Ovakav način obrade podataka fluorescentnih spektara analiziranih uzoraka nije bio ranije korišćen. Dobijeni rezultati se mogu uspešno koristiti kao indikator kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom. Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji su od velikog praktičnog značaja, pošto osim fundamentalnih saznanja o stanju semena kontaminiranih aflatoksinima, mogu da daju osnovu za razvoj spektroskopsko-statističkih metoda za procenu kontaminacije semena različitih poljoprivrednih kultura.

**Ključne reči:** kukuruzna semena, aflatoksin B<sub>1</sub>, polifenolni profil, *HPLC-DAD-ESI-MS*, *ICP-OES* i *ICP-QMS*, organski radikali, EPR imidžing, spektrofluorimetrija, napredne metode spektralne analize, indikatori kontaminacije.

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Analitička hemija

**UDK broj:**

# Indicators of maize (*Zea mays* L.) seed contamination by aflatoxins

## Abstract

The research topic of this doctoral dissertation is the selection of appropriate indicators for the monitoring of maize (*Zea mays* L.) seed contamination with aflatoxins and the examination of its dependence on the aflatoxin concentration. As maize (*Zea mays* L.) is widely used in human and animal nutrition, scientific research on the content and interaction of mycotoxins in agricultural seeds has intensified in the last decade. Overall, the relationship between the degree of maize seeds' contamination and marker molecules of phenolic type, total content and distribution of free radicals, metal content, as well as the fluorescence emission profile of maize seeds were studied, and the results are presented in this dissertation. The focus of this research is on aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), one of the most hazardous naturally occurring contaminants in maize seeds. As a naturally toxic contaminant, it has led to adverse health effects on humans and animals, as well as to huge economic losses, lowering the value of seeds as feed and as an export food commodity.

In the first part of this dissertation, the chemical characterization of maize seeds of different levels of aflatoxin contamination was examined. Phenolic profiles of methanolic extracts and hydrolysates from aflatoxin-containing seeds were evaluated using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to a high-resolution hybrid mass spectrometer which consists of a linear ion trap-quadrupole and an Orbitrap mass analyzer (*UHPLC-LTQOrbiTrapXL*). Furthermore, quality and quantity analysis of selected phenolic compounds was performed by reverse-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet multi-diode detector (*DAD*) and single-quadrupole mass detector and electrospray ionization (*ESI*) source (*RP-HPLC-DAD ESI-MS*). Dominant phenolic compounds which are identified in methanolic extracts and hydrolysates of analysed seeds were conjugates of polyamines (hydroxycinnamic acid amides) and phenolic acids (ferulic acid and *p*-coumaric), respectively. The obtained results show that the content and ratio between specific phenolic compounds varies depending on the concentration of aflatoxins in the seed. For the first time, in this study, it is showed that level of aflatoxins has an impact on seeds' defense strategy, such as biphasic response regarding the ratio of putrescine and spermidine conjugates. Also, we showed a positive correlation between the lignin content and the AFB<sub>1</sub> concentrations in the seeds' outer fraction, which reflects the protective role of lignin during stress conditions. For the first time, in this study, it was found that aflatoxin B<sub>1</sub> can induce a dose-dependent relationship concerning specific phenolic compounds, mainly on the sum ratio between putrescine and spermidine conjugates in methanolic extracts. The results, obtained using UV-VIS spectrophotometry, confirm the existence of a two-phase seed response to the studied stressor. At higher levels of contamination in the outer seed fractions, higher lignin content was found, as well as a higher amount of those compounds that are listed in the literature as lignification markers, which indicates the structural mechanism of seed protection. The content of individual micro- and macroelements was determined using induced coupled plasma with optical emission spectrometry (*ICP-OES*) and mass spectrometry (*ICP-MS*), respectively. Obtained results show that levels of Zn and Mn were higher in AFB<sub>1</sub> high contaminated seeds compared to the control and low-contaminated samples. Principal component analysis (*PCA*) was applied to the *HPLC* as well as *ICP* results, to distinguish between seeds with different levels of aflatoxin contamination, as well as to find possible markers of seed contamination. Electron paramagnetic resonance (*EPR*) spectroscopy was used to study the content of free organic radicals in the studied samples. Differences in the concentration of these radicals were determined between the outer and inner fractions of seeds, as well as variations concerning the level of contamination.

Estimation of redox status in the examined seeds was done by the technique of EPR imaging with spin probes. These results contribute to the understanding of free radical metabolism, redox status, in seeds containing aflatoxins.

In the second part of this dissertation, we used different methods of spectral analysis to fluorescence emission spectra of aflatoxin B<sub>1</sub> containing seeds, such as multivariate resolution curves-alternating least squares (MCR-ALS), principal components analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) and others. This method of processing fluorescence spectral data has not been used before and the obtained parameters can be successfully applied as indicators of maize seeds' contamination with aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). The results presented in this dissertation are of great importance because, in addition to fundamental knowledge about the state of seeds contaminated with aflatoxins, they may be a basis for the development of spectroscopic and statistical methods for seed contamination estimation.

**Keywords:** maize seeds, aflatoxin B<sub>1</sub>, phenolic profile, *HPLC-DAD-ESI-MS*, *ICP-OES* and *ICP-QMS*, organic free radicals, EPR imaging, spectrofluorimetry, advanced spectral analysis methods, indicators.

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Analytical Chemistry

**UDC number:**



## LISTA SKRAĆENICA I AKRONIMA

3CP	3-karbamoil-proksil
3CxP	3-karboksi-proksil
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
AcBr	acetil bromid
AFB <sub>1</sub>	aflatoksini B <sub>1</sub>
ALS	naizmenični najmanji kvadrati
ANOVA	analiza varijanse
CA	koniferil alkohol
CFP	<i>p</i> -kumaroil-feruloilputrescin
CFS	<i>N</i> -kumaroil- <i>N</i> -feruloilspermidin
DAD	detektor sa više dioda
DF	diferulinska kiselina
DFP	diferuloilputrescin
DCS	di- <i>p</i> -kumaroilspermidin
DW	suva masa
EEM	ekscitaciono-emisiona matrica
EPR	elektronska paramagnetna rezonancija
ESI	elektrosprej jonizacija
FA	ferulinska kiselina
<i>F-C</i>	engl. <i>Folin-Ciocalteu</i>
GA	galna kiselina
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
ICP-OES	induktivno spregnuta plazma - optički emisiona spektrometrija
ICP-QMS	induktivno spregnuta plazma - kvadrupol masena spektrometrija
IFA	izoferulinska kiselina
LDA	linearna diskriminaciona analiza
<i>m/z</i>	odnos mase i naelektrisanja
MCR	multivarijaciona rezolucija krivih
MS	masena spektroskopija
PCA	analiza glavnih komponenti
<i>p-CA</i>	<i>p</i> -kumarinska kiselina
ppb	delovi na milijardu
R <sup>2</sup>	koeficijent determinacije
ROS	reaktivne kiseonične vrste
TPC	sadržaj ukupnih fenola
UV	ultravioletni region apsorpcionog spektra
VIS	vidljivi region apsorpcionog spektra
WHO	Svetska zdravstvena organizacija

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	2
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	3
2.1. Aflatoksini .....	3
2.1.1. Istorija aflatoksina i značaj proučavanja aflatoksina .....	3
2.1.2. Fizičko-hemijske karakteristike aflatoksina .....	5
2.1.3. Aflatoksigene gljive i faktori koji utiču na biosintezu aflatoksina .....	6
2.2. Hemijski sastav i odbrambeni mehanizmi semena kukuruza ( <i>Zea mays</i> L.) .....	8
2.2.1. Fenolna jedinjenja .....	8
2.2.1.1. Fenolne kiseline i dehidrodimeri ferulinske kiseline .....	9
2.2.1.2. Flavonoidi .....	11
2.2.1.3. Konjugati poliamina .....	12
2.2.1.4. Lignin .....	13
2.2.2. Biološki značaj mikro- i makroelemenata .....	14
2.2.3. Slobodni radikali i oksidativni stres .....	15
2.3. Osnovne fluorofore u biljkama .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	17
3.1. Hemikalije .....	17
3.2. Ispitivani uzorci semena .....	17
3.3. Priprema uzorka semena .....	17
3.3.1. Homogenizacija uzorka .....	17
3.3.2. Priprema metanolnih ekstrakata .....	17
3.3.3. Priprema hidrolizata .....	17
3.3.4. Izolovanje ćelijskog zida .....	18
3.3.5. Mikrotalasna digestija .....	18
3.4. Hemijska analiza semena .....	18
3.4.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) .....	18
3.4.1.1. UHPLC-LTQOrbiTrapXL .....	19
3.4.1.2. RP-HPLC-DAD-ESI-MS .....	20
3.4.2. Spektrofotometrijska ispitivanja semena .....	21
3.4.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC) .....	21
3.4.2.2. Određivanje sadržaja lignina pomoću Acetil-Bromidnog (AcBr) testa .....	21
3.4.2.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti (TAA) primenom ABTS testa .....	22
3.4.3. Analiza elemenata pomoću ICP-OES i ICP-QMS .....	23
3.4.4. Elektronska paramagnetna rezonancija .....	25
3.5. Spektrofluorimetrija .....	27
3.6. Statističke metode spektralne analize .....	31

3.6.1. Multivarijaciona rezolucija krivih–naizmenični najmanji kvadrati (MCR-ALS) .....	31
3.6.2. Dekonvolucija fluorescentnih spektara pomoću log-normal modela .....	32
3.6.3. Analiza glavnih komponenti (PCA) i linearna diskriminaciona analiza (LDA).....	32
3.7. Statistička analiza podataka.....	33
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>35</b>
4.1. Ispitivanje fenolnog profila i sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u uzorcima semena kukuruza ( <i>Zea mays</i> L.) koja sadrže različitu koncentraciju aflatokisna .....	35
4.1.1. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima.....	35
4.1.1.1. Analiza sadržaja odabranih konjugata poliamina u metanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka semena .....	41
4.1.1.2. Analiza sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima frakcija ispitivanih semena .....	43
4.1.1.3. Ispitivanje korelacija između identifikovanih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima frakcija semena kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom B <sub>1</sub> .....	45
4.1.2. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u hidrolizatima ispitivanih semena .....	49
4.1.2.1. Analiza sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima frakcija ispitivanih semena.....	54
4.1.2.2. Ispitivanje korelacija između određenih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima frakcija semena kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom B <sub>1</sub> .....	56
4.2. Ispitivanje sadržaja lignina .....	61
4.3. Ispitivanje veze između ukupne antioksidativne aktivnosti (TAA), sadržaja ukupnih fenola (TPC) i koncentracije aflatoksina B <sub>1</sub> u semenu kukuruza.....	63
4.4. Ispitivanje veze između sadržaja pojedinih metala i nivoa kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom B <sub>1</sub> .....	64
4.4.1. PCA analiza primenjena na sadržaj elemenata .....	67
4.5. Analiza uzoraka EPR metodom.....	72
4.5.1. Analiza slobodnih organskih radikala u ispitivanim uzorcima pomoću EPR spektroskopije .....	72
4.5.2. Ispitivanje uticaja aflatoksina na redoks status semena <i>Zea mays</i> L. primenom dvodimenzionalnog (2D) EPR imidžinga.....	73
4.6. Analiza uzoraka fluorescentnom spektroskopijom.....	75
4.6.1. Analiza fluorescentnih EEM i primena MCR-ALS algoritma .....	75
4.6.2. Analiza EEM-a i primena log-normal algoritma .....	80
4.6.3. Primena linearne diskriminacione analize (LDA) na podatke fluorescentnih spektara dobijenih merenjem intaktnih semena .....	82
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>84</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>87</b>
<b>7. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>99</b>
<b>8. IZJAVA O AUTORSTVU.....</b>	<b>101</b>

<b>9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA.....</b>	<b>102</b>
<b>10. IZJAVA O KORIŠĆENJU .....</b>	<b>103</b>

# 1. UVOD

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jednogodišnja biljka koja pripada monokotiledonoj porodici *Poaceae*. Ekonomski je od velikog značaja, kao jedna od tri žitarice koje se najviše koristi u ishrani ljudi i životinja. Široko se uzgaja, a po proizvodnji zauzima prvo mesto u Srbiji (Nikolić i sar., 2021; Ranum i sar., 2014). Kvalitet i bezbednost semena kukuruza su često narušeni, usled prisustva patogenih gljiva, koje smanjuju prinos useva i do 50% u godinama povoljnim za razvoj bolesti (Krnjaja i sar., 2013). Pored toga, kvalitet i bezbednost semena može biti ugrožena kontaminacijom mikotoksinima. U tom smislu, najznačajniji je aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), koji je svrstan u prvu grupu dokazanih humanih kancerogenih jedinjenja (IARC, 2012) i ima brojne štetne efekte na zdravstveno stanje ljudi i životinja, kao što su mutageni, teratogeni i hepatotoksični efekti. S druge strane, kontaminacija kukuruza i drugih važnih žitarica aflatoksinima ima veliki negativan ekonomski uticaj. Prema izveštajima Organizacije za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) približno 25% svetskih useva je kontaminirano svake godine, što dovodi do gubitaka od oko milijardu dolara (Alshannaq i Yu, 2017). Usled klimatskih promena, koje su praćene porastom temperature, kontaminacija kukuruza sa AFB<sub>1</sub> postaje važan problem na globalnom nivou (Battilani i sar., 2016).

Kontaminacija semena mikotoksinima utiče na kvalitet semena, što se odražava na klijavost i kasniji normalni rast i razviće biljke. Utvrđeno je da ovi toksini dovode do oksidativnih oštećenja u biljkama (Ismail i Papenbrock, 2015).

Biljke imaju veoma efikasne neenzimske i enzimске antioksidativne odbrambene sisteme, koji zajedno kontrolišu kaskadu oksidacija, i štite biljne ćelije od oksidativnog oštećenja. Promena u sadržaju specifičnih sekundarnih metabolita, poput fenolnih jedinjenja i minerala, je zabeležena u odbrambenom odgovoru biljke na stres (Bhattacharya i sar., 2010).

Iako su reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) korisne u niskim koncentracijama, kada služe i kao signalni molekuli za pokretanje odbrambenih mehanizama, usled njihove akumulacije, kao i smanjenog nivoa antioksidanata, dolazi do stanja oksidativnog stresa. Pri poremećaju redoks ravnoteže, moguće je formiranje stabilnih organskih radikala između ROS i biomolekula u semenu. Koncentracija organskih radikala zavisi od stepena tolerancije biljke na stres i jedan je od indikatora povećanog prisustva ROS (Araújo i sar., 2016; Kurdziel i sar., 2015).

Cilj prvog dela istraživanja disertacije je odabir biomarkera (indikatora) za praćenje kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom i ispitivanje njihovog prisustva u zavisnosti od nivoa (koncentracije) aflatoksina u semenu. Osim toga, jedan od ciljeva disertacije je i ispitivanje uticaja aflatoksina na redoks status semena. Stoga, definisani su zadaci I, II, III i IV, prikazani u *poglavlju 1.1*.

Da bi se dobila bezbedna i kvalitetna hrana, potrebno je u hrani detektovati kontaminante poput aflatoksina. Naime, ovaj toksin se nalazi u niskim koncentracijama, reda veličine ppb ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), što zahteva primenu osetljivih analitičkih metoda za njegovo određivanje. Međutim, standardne analitičke metode, kao što su imunoadsorpcijski enzimski test (*ELISA*) i visoko-efikasna tečna hromatografija (*HPLC*) u kombinaciji sa masenim ili fluorescentnim detektorom, su zahtevne u smislu pripreme uzorka, cene i dr. (Wacoo i sar., 2014). Danas, sve veća pažnja usmerena je ka optičkim spektroskopskim tehnikama koje se koriste za brzu i neinvazivnu procenu kvaliteta i bezbednosti hrane (semena) (ElMasry i sar., 2019). U tom smislu, spektrofluorimetrija u kombinaciji sa naprednim statističkim metodama sve više se primenjuje za tzv. spektralni fingerprinting („otisak prsta“) u analizi hrane (Sádecká i sar., 2007; Stanković i sar., 2021), kao što je praćenje (skrining) toksičnih kontaminanata, poput aflatoksina (Wu i sar., 2019). Drugi deo

istraživanja u okviru ove disertacije se bazira na primeni spektrofluorimetrije u kombinaciji sa naprednim statističkim metodama spektralne analize (MCR-ALS, PCA, LDA i dr.), radi ispitivanja varijacija parametara fluorescentnog emisionog profila semena kukuruza i nivoa kontaminacije aflatoksinom. Dobijeni rezultati bi trebalo da pokažu da li parametri dobijeni analizom fluorescentnih emisionih spektara mogu da budu indikatori kontaminacije aflatoksinima u uzorcima semena. Stoga su definisani dodatni zadaci V, VI, VII, prikazani u poglavlju *poglavlju 1.1*.

## 1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj disertacije bio je razvoj analitičkih postupaka za određivanje parametara kvaliteta semena kukruza kontaminiranog aflatoksinom. Za realizaciju svih ciljeva ove doktorske disertacije definisani su sledeći naučni zadaci:

- *Fizičko-hemijska karakterizacija uzorka, radi pronalaženja odgovarajućih markera semena na nivo kontaminacije aflatoksinom:*
  - I Priprema ispitivanih uzoraka i određivanje fenolnog profila, sadržaja ukupnih i pojedinačnih (odabranih) fenolnih jedinjenja, kao i konjugata poliamina;
  - II Ispitivanje ukupne antioksidativne aktivnosti;
  - III Određivanje sadržaja metala, mikro- i makroelemenata, u semenu kururuza;
  - IV Određivanje sadržaja slobodnih organskih radikala i uticaja aflatoksina na redoks status semena.
- *Upotreba spektrofluorimetrije u kombinaciji sa naprednim statističkim metodama, radi ispitivanja varijacija parametara dobijenih analizom fluorescentnih emisionih spektara uzoraka semena kontaminiranih aflatoksinom, kao mogućih indikatora kontaminacije.*
  - V Analiza ekscitaciono-emisionih matrica (EEM);
  - VI Analiza rezultata dobijenih primenom dekonvolucionih algoritama (MCR-ALS, log-normal) – određivanje optimalnog broja komponenti emisionih spektrata, položaja njihovih maksimuma, površina i odnosa površina spektralnih komponenti;
  - VII Primena linearne diskriminacione analize (LDA) na podatke iz fluorescentnih spektara, dobijenih merenjem intaktnih uzoraka ispitivanih semena.

## 2. OPŠTI DEO

U prvom delu ovog poglavlja prikazan je značaj proučavanja aflatoksina, sa osvrtom na njihove fizičko-hemijske karakteristike i uslove pri kojima je favorizovana kontaminacija semena kukuruza. U drugom delu, predstavljena je hemijska karakterizacija semena kukuruza, sa posebnim osvrtom na fenolna jedinjenja i mineralni sastav. Osim toga, objašnjeni su pojmovi slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Na kraju, sažeto je prikazan pregled osnovnih fluorofora prisutnih u biljkama.

### 2.1. Aflatoksini

#### 2.1.1. Istorija aflatoksina i značaj proučavanja aflatoksina

Otkriće aflatoksina počinje u Engleskoj 1960. godine, nakon ispitivanja velike epidemije „X“, kada je došlo do masovnog uginuća ćurki i drugih pernatih životinja. Veliki broj stručnjaka iz različitih oblasti (veterinarska medicina, ishrana životinja, toksikologija, hemija, mikologija, itd.) bilo je uključeno u intenzivna multidisciplinarna istraživanja ovog problema. Pronađena je gljiva *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) u kikirikijevom brašnu kojim je živina hranjena, a izolovan toksični sekundarni metabolit (1962. godine) nazvan je po gljivi koja ga je sintetisala. Akronim aflatoksin nastao je kombinacijom prvog slova „A“ (rod *Aspergillus*), sledeća tri slova „fla“ (vrsta *flavus*) i imenice „toksin“ (otrov) (Bullerman, 1979; Benkerroum, 2019).

Kao prirodni kontaminanti, aflatoksini su nađeni u brojnim namirnicama biljnog porekla, najčešće u semenu žitarica (kukuruza, pirinča, ječma, pšenice, sirka), uljarica (kikirikiju, orašastim plodovima, npr. bademu, orasima, pistačima), začinima (crnom biberu, čiliju, kurkumi, đumbiru, korijanderu), suvom voću, grašku, pasulju. Pokazano je da su pojedine namirnice podložnije kontaminaciji aflatoksinima u odnosu na druge, na primer, žitarice u poređenju sa začinima, što se može objasniti razlikama u supstratima koje gljiva koristi za njihovu sintezu (Filazi i Sireli, 2013). U literaturi se navodi da ekstrakti nekih etarskih ulja, poput karanfilića, imaju inhibitorski efekat na sintezu ovih toksičnih jedinjenja (Boukaew i sar., 2017; Aiko i Mehta, 2013).

Za čoveka, namirnice životinjskog porekla (mleko, meso, jaja i dr.) mogu biti indirektni način unošenja aflatoksina. Aflatoksin tipa M (AFM) nastaje metabolizmom u organizmu životinje koja je prethodno konzumirala biljnu hranu kontaminiranu aflatoksinom tipa B (Peles i sar., 2019). To je izrazito stabilno jedinjenje na uobičajene tretmane koji se koriste u preradi hrane. Iz tog razloga, aflatoksini opstaju u krajnjim proizvodima (Loi i sar., 2020).

Pokazano je da aflatoksini imaju negativan uticaj na zdravlje ljudi i životinja. Do izlaganja organizma najčešće dolazi unošenjem kontaminirane hrane. Osim toga, mogu se uneti kontaminiranom vodom za piće (Paterson i sar., 1997; Banu i Sadagopan, 2016), preko kože, kao i inhalacijom toksičnih spora (Milićević i sar., 2014).

Bolesti uzrokovane aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze. Štetni efekti mogu biti hroničnog i akutnog toka, što zavisi od doze i dužine ekspozicije organizma toksinom. Izlaganje organizma niskim dozama toksina, u toku dužeg vremenskog perioda, dovodi do poremećaja hroničnog tipa, koji se češće javlja u zemljama u razvoju. Smatra se da je aflatoksinima ugroženo više od pet milijardi ljudi, putem kontaminirane hrane (Williams i sar., 2004).

U tipične simptome trovanja ubrajaju se supresija imunskog sistema, malapsorpcija, razvoj hepatocelularnog karcinoma. Za razliku od ovog tipa, akutne aflatoksikoze imaju izraženije simptome, kao što su toksični hepatitis, edem pluća i masna infiltracija jetre. Većina slučajeva se završava smrtnim ishodom. Na sreću, one se ređe javljaju, uglavnom u Africi i Aziji. Zabeležen je

slučaj u Keniji 2004. godine, gde je, usled konzumiranja kukuruza kontaminiranim visokim nivoom AFB<sub>1</sub> (5-20 mg kg<sup>-1</sup>) preminulo više od 125 osoba (Ojiambo i sar., 2018). Prema literaturnim podacima, letalne doze ovog toksina za čoveka, decu i većinu životinjskih vrsta su od 10-20 mg, 3 mg i 0,5-10 mg po kg telesne mase, redom (Afsah-Hejri i sar., 2013). Utvrđeno je da su životinje različito osetljive na aflatoksine: ptice i ribe su osetljivije na dejstvo aflatoksina od preživara (Milićević i sar., 2014; Bullerman i sar., 1979).

Mnoge svetske organizacije bave se problematikom aflatoksina. Neke od njih su: Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organisation*, FAO), Naučno savetodavno telo Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), Evropski organ za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*; EFSA), Sistem brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF), itd. (Pigłowski, 2020).

Da bi se povećala bezbednost hrane, uspostavljene su zakonske regulative za maksimalno dozvoljenu koncentraciju (MDK) aflatoksina B<sub>1</sub> i ukupnih aflatoksina u semenima kukuruza namenjenim za ishranu ljudi i životinja. Uprava za hranu i lekove u Sjedinjenim Američkim Državama (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) propisala je da je MDK aflatoksina u ljudskoj i stočnoj hrani 20 µg kg<sup>-1</sup>. Prema Pravilniku Evropske komisije (*European Commission (EC) Regulation*, No. 1881/2006), na nivou Evropske unije standardi za MDK ukupnih aflatoksina (4 µg kg<sup>-1</sup>) i AFB<sub>1</sub> (2 µg kg<sup>-1</sup>) u kukuruzu namenjenom za ishranu ljudi su strožiji. Većina razvijenih zemalja, kao i Republika Srbija („Službeni glasnik RS“, br.76/19) uskladila je dozvoljene vrednosti prema Pravilniku FDA.

Ipak, u pojedinim zemljama u razvoju ovi Pravilnici još nisu definisani, dok su kod drugih zemalja vrednosti iznad navedenih. Ovo ima značajan uticaj na međunarodnu trgovinu, tj. izvoz i uvoz kukuruza. Prema Wu i Gulcu, 2012, pokazano je da zemlje sa sličnim životnim standardima za MDK aflatoksina imaju veću tendenciju za trgovinom kukuruzom, što utiče na ekonomsko tržište.

Ogromni ekonomski gubici, od nekoliko milijardi dolara na godišnjem nivou, nastaju kao posledica uništavanja hrane u kojoj su vrednosti aflatoksina iznad propisanih (Wu i Guclu, 2012). S druge strane, izloženost visokim nivoima aflatoksina je učestalija kod pojedinih zemalja u razvoju Subsaharske Afrike i Azije. Pored klime, tome doprinosi i loša infrastruktura, nedostupnost tehnika za detekciju toksina, oskudica hrane i dr. (Ojiambo i sar., 2018, Wu i Guclu 2012).

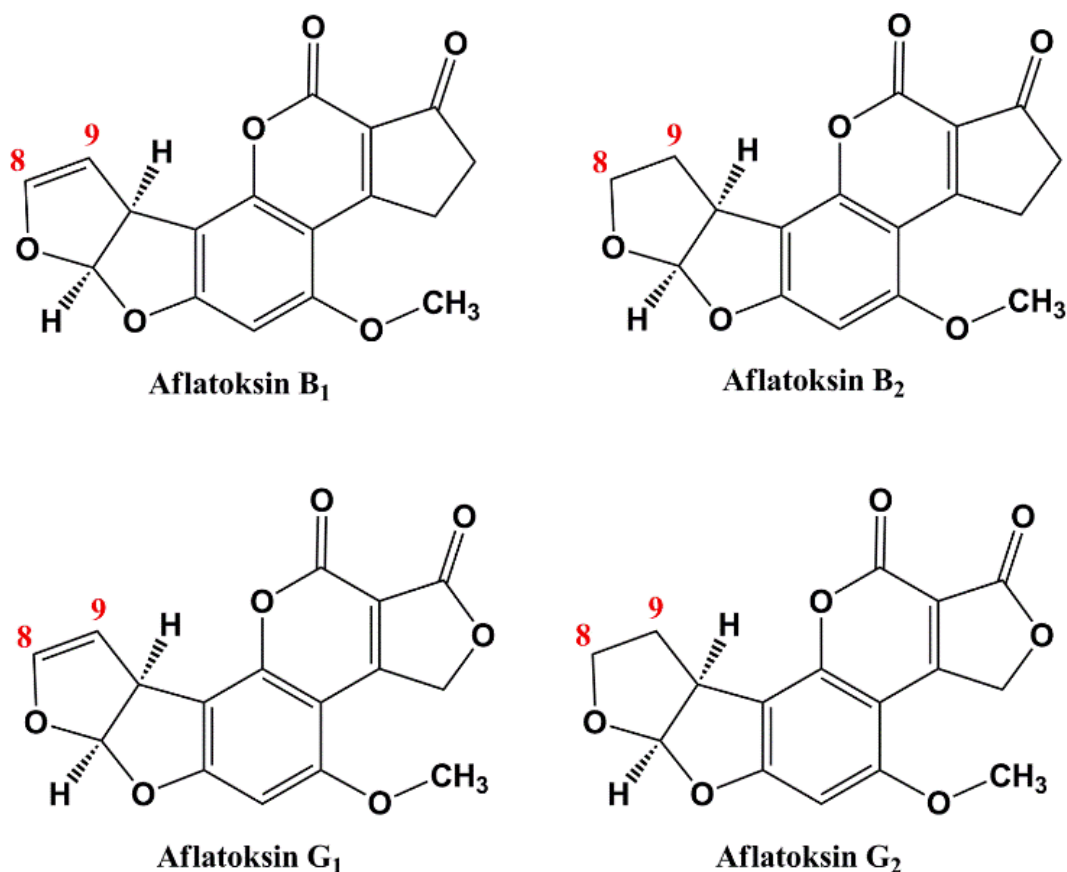


## 2.1.2. Fizičko-hemijske karakteristike aflatoksina

Do sada je poznato više od dvadeset različitih tipova aflatoksina. Najznačajniji među njima pripadaju grupama B (AFB<sub>1</sub> i AFB<sub>2</sub>), G (AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub>) i M (AFM<sub>1</sub> i AFM<sub>2</sub>). Ova jedinjenja su malih molekulskih masa: AFB<sub>1</sub> ima molekulsku masu 312,3 g mol<sup>-1</sup>. Dobro su rastvorljivi u organskim polarnim rastvaračima, poput metanola i acetonitrila. Slabo su rastvorljivi u vodi i nerastvorljivi su u nepolarnim rastvaračima. Stabilni su u rasponu pH 3,0 – 10,0. Termotabilna su jedinjenja sa tačkama topljenja višim od 200°C (Afsah-Hejri i sar., 2013; Madrigal-Bujaidar i sar., 2011).

U hemijskom smislu, aflatoksini su derivati difuranokumarina (**Slika 2.1.**). To su heterociklična jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže kumarinsko jezgro i bifuranski prsten. Za kumarinsko jezgro kod grupe B vezan je ciklopentenonski prsten, a kod grupe G šestočlani laktonski prsten (Filazi i Sireli., 2013).

Među aflatoksinima najjača mutagena i kancerogena dejstva imaju AFB<sub>1</sub> i AFG<sub>1</sub>. Tome doprinosi dvostruka veza u na furanskom ostatku (C8 i C9, **slika 2.1.**), a koja predstavlja aktivno mesto za građenje reaktivnih epoksida (8,9-egzo epoksid) (Monson i sar., 2015).



**Slika 2.1.** Hemijske strukture osnovnih aflatoksina.

Aflatoksini poseduju prirodnu fluorescenciju. Njihova autofluorescencija potiče od pentaheterociklične strukture. Nakon ekscitacije UV svetlošću (na 360 nm), aflatoksini emituju svetlost određene talasne dužine. Stoga, u njihovom nazivu slova B i G odnose se na, redom, plavu (engl. „blue“) i zelenu (engl. „green“) boju. U literaturi je pokazano da odabir rastvarača utiče na njihovu fluorescenciju. U metanolnom rastvaraču aflatoksin tipa B pokazuje maksimum emisije na 425 nm, posle ekscitacije na 365 nm (Bullerman i sar., 1979; Benkerroum i sar., 2019).

U standardne analitičke tehnike, koje se koriste za kvalitativno i kvantitativno određivanje aflatoksina u poljoprivredno prehrambenim proizvodima, ubrajaju se: tankoslojna hromatografija, gasna hromatografija, tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), enzimski imunosorbent test (ELISA) i dr. Validacija navedenih metoda sprovedena je od strane: Asocijacije zvaničnih hemičara analitičara (engl. *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC) i Evropskog komiteta za standardizaciju (engl. *The European committee for standardization*, CEN) (Tao i sar., 2018). Dugotrajno vreme analize, složena procedura ekstrakcije aflatoksina, visoka cena i destruktivnost uzorka su nedostaci svih pomenutih metoda. Trenutno, sve veća pažnja usmerena je na razvoj optičkih spektroskopskih metoda, kao što je fluorescentna spektroskopija, bliska-infracrvena spektroskopija (NIR), hiperspektralni imidžing i drugo, koje imaju prednost u nedestruktivnom praćenju aflatoksina u uzorcima hrane (Tao i sar., 2018).

### 2.1.3. Aflatoksigene gljive i faktori koji utiču na biosintezu aflatoksina

Sposobnost gljive da sintetiše mikotoksine bila je predmet ispitivanja brojnih studija i do danas još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da ovi sekundarni metaboliti pružaju gljivi kompetitivnu prednost za izvore nutritijenata u odnosu na druge organizme u istoj ekološkoj niši. Osim toga, aflatoksini učestvuju u oksidativnom odgovoru na stres i pružaju gljivi zaštitu od različitih predatora (Pfliegler i sar., 2020; Peles i sar., 2019).

Gljive koje proizvode aflatoksine nazivaju se aflatoksigenim, i pripadaju rodu *Aspergillus*, koji obuhvata tri sekcije - *Flavi*, *Ochraceorosei* i *Nidulantes* (Peles i sar., 2019).

U pogledu zdravstvene bezbednosti hrane, najznačajniji su predstavnici iz sekcije *Flavi*, u koje se ubrajaju *A. flavus* i *A. parasiticus*. Ove dve vrste se razlikuju po tipu aflatoksina koje sintetišu, kao i po adaptiranosti na uslove sredine i rasprostranjenosti. Na kukuruзу prvenstveno dominira *A. flavus*, kome pogoduju vazdušni i folijarni uslovi (Abbas i sar., 2009). Druge aflatoksigene vrste retko se sreću u prirodi. Neke od njih su *A. nominus*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. ochraceoroseu*. Vrste koje nemaju sposobnost da sintetišu aflatoksine su atoksigene: one se široko koriste u industriji hrane i proizvodnji enzima. Na primer, vrsta *A. sojae* sekcije *Flavi* primenjuje se u proizvodnji soja sosa (Abbas i sar., 2009).

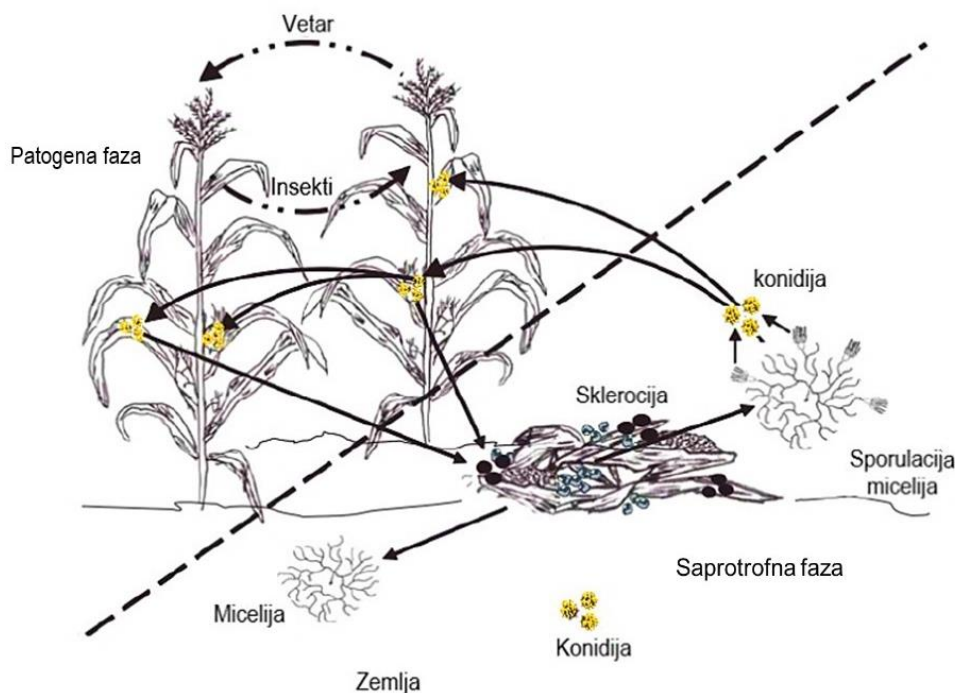
Biosinteza aflatoksina se odvija preko poliketidnog puta, koji obuhvata 27 enzimskih reakcija. Geni za ove enzime svrstani su unutar jednog genskog klastera. Regulatorni geni *aflR* i *aflS* učestvuju u ekspresiji većine gena za biosintezu aflatoksina. Naime, transkripcioni faktor *AflR* je Zn(II)<sub>2</sub>Cys klaster protein (Abbas i sar., 2009; Caceres i sar., 2020). Biosinteza aflatoksina se odvija kroz seriju oksido-redukcionih reakcija, a glavni intermedijeri su poliketidni prekursori, antrahinoni, ksantoni i bisfuranokumarini (aflatoksini) (Uka i sar., 2020; Bhatnagar i sar., 2006).

Osim genetske predispozicije gljive, na produkciju aflatoksina utiču i drugi faktori. Najznačajniji su temperatura i aktivnost vode ( $a_w$ ). Vrsta *A. flavus* sposobna je da raste u širokom temperaturnom opsegu od 19°C do 35°C, sa optimalnom temperaturom rasta i sinteze aflatoksina na 28°C i 30°C, redom. Optimalni uslovi za sintezu aflatoksina su pri  $a_w$  od 0,99 i temperaturi na 30°C. Kontaminacija žitaričnih useva aflatoksinima neravnomerno je distribuirana širom sveta i zavisi od geografske zone, kao i klimatskih uslova. Ugroženost poljoprivrednih kultura je veća u državama tropskih i subtropskih zona (Benkerroum, 2019). Poslednjih godina pojava mikotoksina je zabeležena u umerenom pojasu Evrope, u Italiji, Srbiji, Rumuniji i Španiji. Prva ozbiljna kontaminacija kukuruza se dogodila u Italiji 2003. godine. Promena u klimi koju prate učestalije suše, vlažno vreme i visoke temperature doprinosi ovoj pojavi (Leggieri i sar., 2021). Kao što je navedeno, spoljašnji faktori, poput vlažnosti i suše, favorizuju kontaminaciju useva aflatoksinom, posebno u polju (Tao i sar., 2018). S druge strane, do ozbiljne kontaminacije može doći pri neadekvatnim uslovima u toku skladištenja žitarica (Bullerman, 1979). S obzirom da rast aflatoksigenih gljiva favorizuju vlažni uslovi, preporučeno je da sadržaj vlage u semenu bude ispod 12% pre skladištenja. Iz tog razloga, usevi se podvrgavaju tretmanima sušenja, na temperaturama

koje su niže od 90°C. Na ovaj način suzbija se dalja infekcija gljivom. Međutim, koncentracija ovih toksina ostaje neizmenjena, pošto se odlikuju visokom termostabilnošću (Peles i sar., 2019).

Vrsta *A. flavus* pripada saprotrofima; shodno tome, sposobna je da raste na brojnim organskim hranljivim supstratima, kao što su kompostna gomila, biljni ostaci, pamuk, uskladišteno žito, leševi životinja, stočna hrana (Kumar i sar., 2021). Izvor ugljenika, azota, nitrita, nitrata, aminokiselina (glutamat, prolin, trioizin), lipida, elemenata u tragovima (Zn) neki su od hemijskih faktora koji utiču na biosintezu aflatoksina (Bhatnagar i sar., 2003; Caceres i sar., 2020). Aktivacijom lipaza u odgovoru biljke na biotički stres, iz ćelijskih membrana mogu da se oslobode slobodne polinezasićene masne kiseline; one su direktni prekursori oksilipina. U zavisnosti od strukture, ova jedinjenja mogu da deluju kao inhibitori ili aktivatori u sintezi aflatoksina (Pfliegler i sar., 2020). Aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze gljive *A. flavus* može prouzrokovati porast sadržaja pojedinih ugljenih hidrata u biljci, kao što su glukoza, saharoza i ksiloza (Woloshuk i sar., 1997). Ustanovljeno je da fenolna jedinjenja i etarska ulja mogu delovati kao aktivatori ili inhibitori biosinteze aflatoksina (Klich, 2007). Tanini prisutni u omotaču obojenih semena imaju inhibitorne efekte na kolonizaciju gljive *A. flavus* (Corso i sar., 2020).

Vrsta *A. flavus* široko je rasprostranjena filamentozna gljiva (**Slika 2.2.**). U zemljištu se nalazi u vidu konidija ili sklerocija. Sklerocije, kompaktna masa micelijuma, se formiraju u nepovoljnim sredinskim uslovima (Klich, 2007). Pokazano je da oksidativni stres utiče na diferencijaciju sklerocija gljive *A. flavus* i sintezu aflatoksina (Grintzalis i sar., 2014). Pri postizanju pogodnih uslova, koji su ranije navedeni, dolazi do klijanja sklerocija u nove konidije, ili konidiofore sa konidijom. Raspršene u vazduhu, putem vetra i insekata lako dospevaju na druge useve. Ove gljive su oportunistički patogeni i favorizuju kolonizaciju useva koji su oslabljeni usled stresa, i to, uglavnom, putem kukruzne svile ili zrna (Abbas i sar., 2009; Soni i sar., 2020). Važno je istaći da njihova pojava na kukuruznom klipju nije uvek pokazatelj prisustva aflatoksina. Nasuprot tome, naizgled zdrava semena mogu biti kontaminirana visokim koncentracijama toksina (Bullerman i sar., 1979, Abbas i sar., 2009). Utvrđeno je da ovi toksini dovode do fitotoksičnih efekata, koji mogu da inhibiraju klijanje semena, ometaju fotosintezu i prouzrokuju ćelijsku smrt (Ismail i Papenbrock, 2015; Pfliegler i sar., 2020).



**Slika 2.2.** Ciklus razvoja gljive *Aspergillus flavus* (modifikovano iz Abbas i sar., 2009).

## 2.2. Hemijski sastav i odbrambeni mehanizmi semena kukuruza (*Zea mays* L.)

### 2.2.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja čine značajnu klasu sekundarnih metabolita u biljkama. Utvrđeno je da imaju antioksidativne, antiradikalske i antifungalne efekte (Atanasova-Penichon i sar., 2016). Ukupan sadržaj ovih jedinjenja je veći u spoljašnjoj frakciji semena nego u unutrašnjoj (Bento-Silva i sar., 2020). Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti biljaka, koji primarno nastaju iz fenilpropanoidnog biosintetskog puta - ciklusa šikiminske kiseline. Ukratko, šikiminska kiselina od eritrozo-4-fosfata se prevodi u horizmat, koji je prekursor aminokiselina tirozina (Tyr) i fenilalanina (Phe). Enzim fenilalaninamonijum lijaza (PAL) katalizuje deaminaciju Phe u cimetnu kiselinu, iz koje nastaje *p*-kumarinska kiselina (*p*-CA). Ova kiselina ima ključnu ulogu u biljkama, i predstavlja početnu tačku grananja fenilpropanoidnog puta. Prekursor je brojnih fenolnih jedinjenja, poput drugih fenolnih kiselina, lignina, antocijanina itd. (Gauthier i sar., 2015).

U hemijskoj smislu, to su aromatična jedinjenja, koja sadrže benzenov prsten (C<sub>6</sub>) sa jednom ili više hidroksilnih grupa. U **tabeli 2.1.** prikazana je klasifikacija fenola na osnovu broja ugljenikovih atoma u molekulu. Prema složenosti hemijske strukture, rangiraju se od prostih fenola do složenih polimernih jedinjenja (Balasundram i sar., 2006).

**Tabela 2.1.** Podela fenolnih jedinjenja na osnovu broja atoma ugljenika u molekulu (adaptirano iz Balasundram i sar., 2006).

Pojedine klase fenolnih jedinjenja	Ugljovodnični skelet
Benzohinoni	C <sub>6</sub>
Hidroksibenzoeve kiseline	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Hidroksicinaminske kiseline, fenilpropanoidi	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Flavonoidi, izoflavonoidi	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Lignani, neolignani	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoidi	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Lignini	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Kondezovani tanini	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

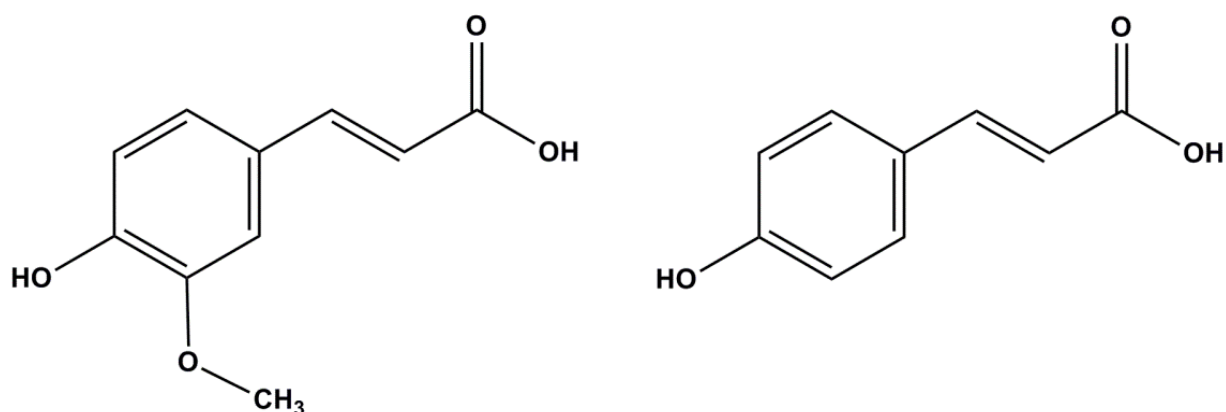
Fenolna jedinjenja imaju važne fiziološke uloge u biljkama, kao što su procesi rasta i razvića. Učestvuju u antioksidativnoj zaštiti od uticaja abiotičkog i biotičkog stresa (Pratyusha 2022, Corso i sar., 2020). U literaturi se navodi da, zavisno od tipa fenolnog jedinjenja, mogu da stimulišu ili inhibiraju produkciju određenih mikotoksina (Atanasova-Penichon i sar., 2016).

Biljke u odbrambenom odgovoru koriste fenolna jedinjenja u ćeliji, kao i ona nastala nakon stresa u reakcijama hidrolize ili oksidacije postojećih fenolnih jedinjenja (Lule i Xia, 2005). U stresnim uslovima može biti indukovana sinteza i akumulacija ovih jedinjenja u biljci (Brett i sar., 1999). Opšti odgovor biljke na stres se ogleda u povećanju sadržaja ukupnih fenola. Naime, razlike u antioksidativnoj efikasnosti fenolnih jedinjenja proističu od njihove strukture, odnosno broja aromatičnih prstenova i prirodi, broju i poziciji supstituenata na prstenu (Balasundram i sar., 2006). Njihova antioksidativna aktivnost je povezana sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala (engl. *free radical*, FR). Oni su „hvatači“ (engl. *scavenger*) FR, kao što su reaktivne kiseonične i azotove vrste. Pojedina fenolna jedinjenja deluju i kao helatori jona prelaznih metala, npr. Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup> jona. Na taj način utiču na redoks status u biljnim ćelijama, što može dovesti do aktivacije

ekspresije gena koji kodiraju antioksidativne enzime, kao što su superoksid-dismutaza, katalaza i dr. S druge strane, povećana dostupnost redoks aktivnih metala može dovesti do ubrzanja reakcija (Fentonova reakcija) u kojim nastaju štetne reaktivne kiseonične vrste (ROS) (Sharma i sar., 2012; Eghbaliferiz i sar., 2016). S obzirom da mogu da povećaju ili smanje nastajanje ROS, fenoli se ponašaju kao prooksidanti ili antioksidanti (Maurya, 2010). Ova jedinjenja imaju i strukturnu ulogu: učestvuju u umrežavanju konstituenata polimera ćelijskog zida, utičući na njegova mehanička svojstva i otpornost na patogene (Rose i Bennett, 1999). Oksidacijom fenolnih jedinjenja nastaju i *O*-hinoni, koji podležu oksidativnoj polimerizaciji i imaju antimikrobnu aktivnost (Lule i Xia, 2005). Za analizu fenolnih jedinjenja u biljnim uzorcima uglavnom se koristi *HPLC*, u kombinaciji sa različitim detektorima, poput masenog (Kumar i Ramesh, 2017). Prethodna priprema uzorka je korak koji prethodi ovim analizama, koji se razlikuje u zavisnosti od ciljanog jedinjenja. Obično se koriste polarni vodeno/organski rastvarači za analizu rastvornih fenolnih jedinjenja konjugovanih sa poliaminima i šećerima. Međutim, za analizu vezanih fenolnih jedinjenja, priprema uzorka je znatno složenija i podrazumeva i hidrolizu kiselinama i/ili bazama (Wang i sar., 2020).

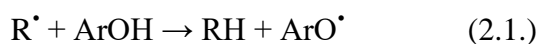
### 2.2.1.1. Fenolne kiseline i dehidrodimeri ferulinske kiseline

Fenolne kiseline se dele u dve velike grupe: derivati hidroksibenzoeve i cinaminske kiseline (Herrmann i Nagel, 1989). Hidroksibenzoeve kiseline nalaze se u visokim koncentracijama u voću i povrću (Lule i Xia, 2005), dok su žitarice bogatije derivatima hidroksicinaminske kiseline. U semenu kukuruza, dominantna je ferulinska kiselina (*FA*). Pored nje, u manjim količinama nalaze se kafeinska, *p*-kumarinska (*p-CA*) i izoferulinska kiselina (Bauer 2012). Strukture formule *FA* i *p-CA* prikazane su na slici 2.3.



Slika 2.3. Hemijske strukture *FA* (levo) i *p-CA* (desno).

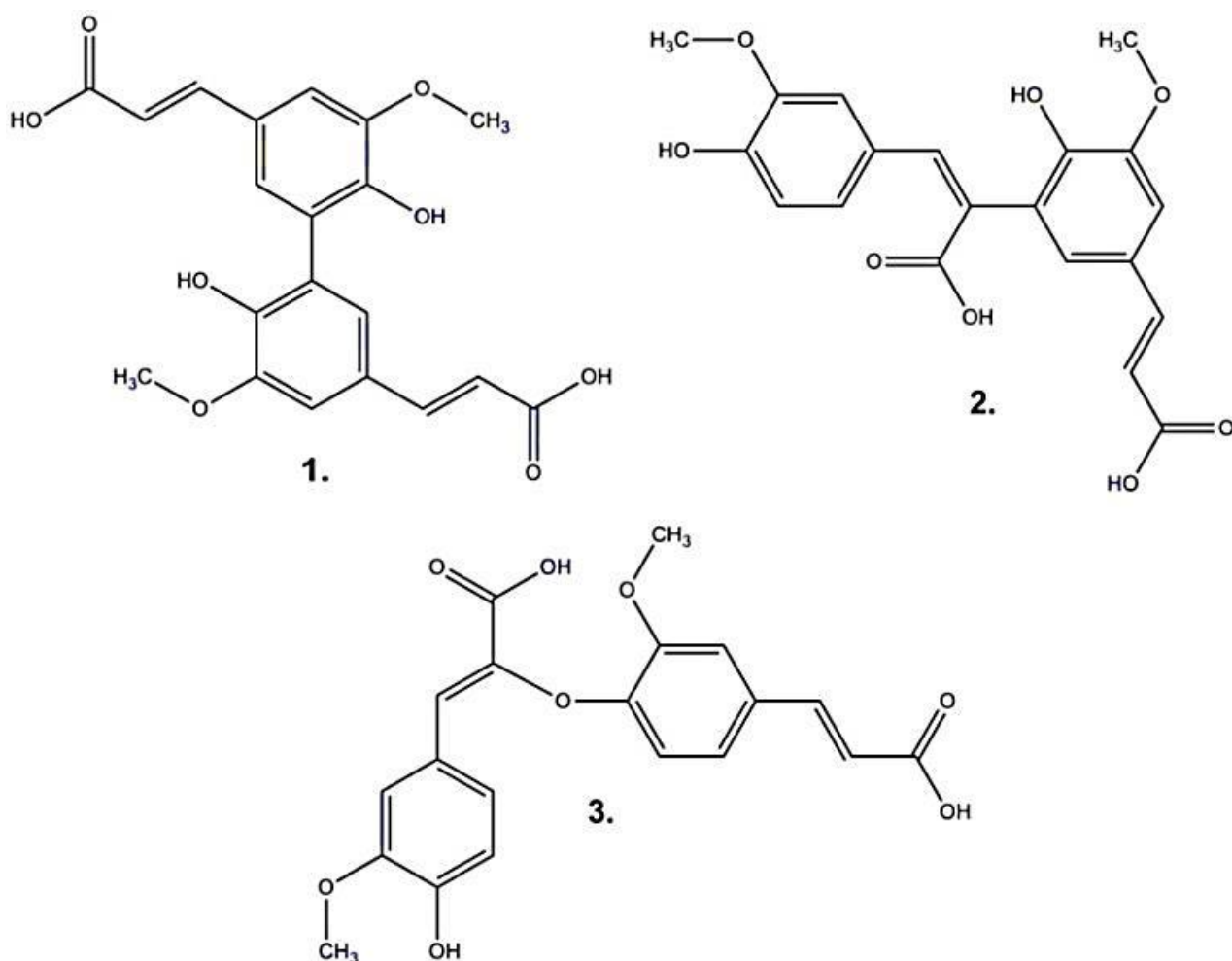
Predloženi su različiti antioksidativni mehanizmi kojim ove kiseline inaktiviraju FR. Jedan od njih je preko mehanizma transfera atoma vodonika (2.1.), prikazan sledećim izrazom:



U reakciji sa antioksidansom (fenolnim jedinjenjem), slobodni radikal ( $R^{\bullet}$ ) se neutrališe i prevodi do  $RH$ , uz nastajanje fenoksi radikala ( $ArO^{\bullet}$ ). Energija disocijacije O-H veze uzima se uobzir prilikom procene antioksidativne aktivnosti jedinjenja: manja energija podrazumeva veću antioksidativnu aktivnost. Stabilnost fenoksi radikala potiče od: delokalizacije nesparenog elektrona, mogućnost postojanja više rezonantinih formi, *orto* i *para* pozicija hidroksilnih grupa na prstenu. Veća antioksidativna aktivnost *FA* u odnosu na *p-CA* potiče od prisustva metoksi grupe u *orto* položaju (Urbaniak i sar., 2012).

U literaturi je pokazano da fenolne kiseline imaju antifungalnu aktivnost. Direktno mogu da deluju na gljivu i sintezu pojedinih mikotoksina, umanjujući njihovo nagomilavanje u biljci (Gauthier i sar., 2015). Ove kiseline su obično prisutne u vezanom obliku (estarski i/ili estarskim vezama) za komponente polimera ćelijskog zida biljke. One doprinose očvršćavanju ćelijskog zida i pospešuju mehaničku barijeru na različite patogene (Santiago i sar., 2013).

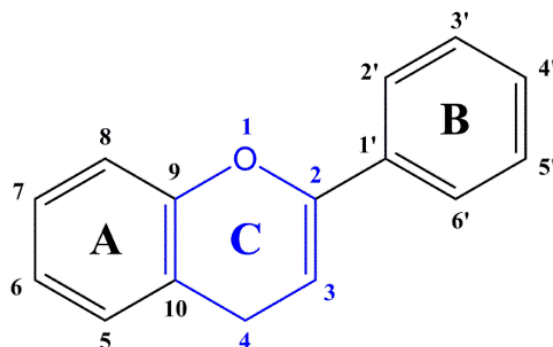
Pokazano je da *p*-CA gradi estarske veze sa polisaharidima i ligninom. Prema literaturnim podacima, *p*-CA se smatra indikatorom lignifikacije ćelijskog zida biljke. Utvrđeno je i da *FA* može biti mesto nukleacije za polimerizaciju lignina (Ralph, 2010). Zabeleženo je prisustvo različitih oblika dimera ferulinske kiseline, kao što su 5-5', 8-*O*-4', 8-5', 8-8' i 4-*O*-5' (Slika 2.4.) (Bauer, 2012). Pokazana je uloga ovih jedinjenja u strukturalnoj otpornosti semena na bolesti izazvane gljivama, unakrsnim povezivanjem polimera u ćelijskom zidu (Santiago i Malvar, 2010).



**Slika 2.4.** Hemijske strukture izomera dehidrodimera ferulinske kiseline: (1) 5-5', (2) 8-5' i (3) 8-*O*-4'.

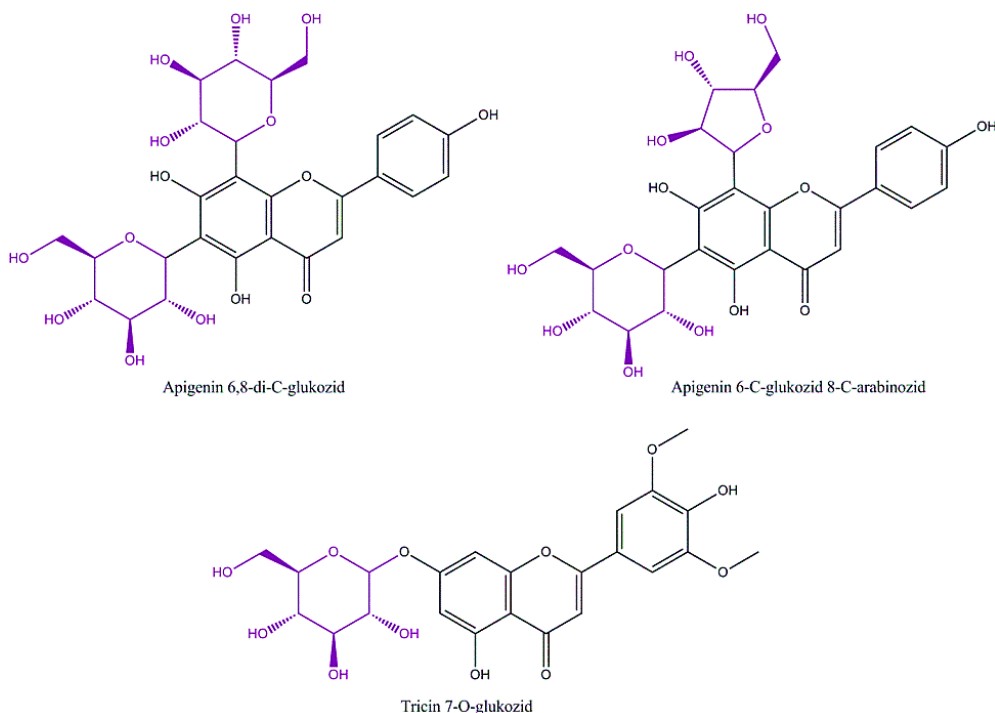
### 2.2.1.2 Flavonoidi

Flavonoidi su najbrojnija i najraznovrsnija grupa fenolnih jedinjenja. Hemijsku strukturu čini ugljenični skelet  $C_6-C_3-C_6$ . Sadrže dva benzenova prstena A i B, međusobno povezana sa heterocikličnim pirenim prstenom C (Slika 2.5.). Prema oksidacionom stanju na prstenu C, dele se na flavone, flavanone, flavanole, flavane, katehine, izoflavone, halkone, antocijanidine, itd. (Corso i sar., 2020).



Slika 2.5. Hemijska struktura osnovnog skeleta flavonoida.

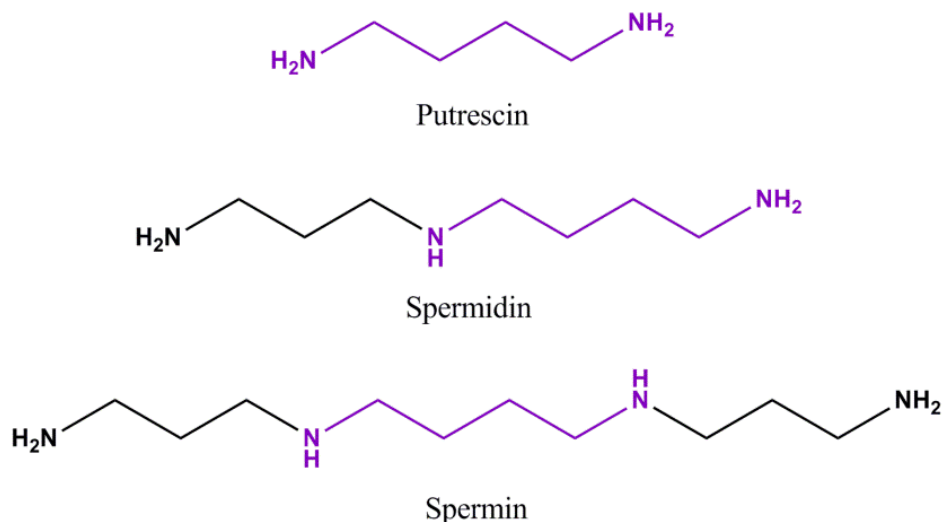
U biljnim ćelijama, većina flavonoida obično se nalazi u obliku glikozida. Supstitucija šećera (obično glukozom i ramanozom) na flavonoidnom skeletu se odvija preko hidroksilnih grupa (*O*-glikozidi), ili direktno na ugljenikovim atomima prstena A (*C*-glikozidi) (Corso i sar., 2020). U semenu, flavoni suprisutni u obliku *C*- i *O*-glikozida (Slika 2.6.); dominantan oblik kod monokotila je flavon *C*-glikozid (Tohge i sar., 2017). Nešećerni deo strukture se naziva aglikon. U žitaricama najzastupljeniji flavonoidi su apigenin, luteolin, hrizin i tricin. Oni doprinose otpornosti biljke na stres (Treutter, 2006) i imaju antifungalnu aktivnost, kao i inhibiraju aktivnost nekih enzima patogenih gljiva. Pokazano je da utiču na biosinetzu i akumulaciju aflatoksina u semenu (Castano-Duquel i sar., 2021), a imaju i antiradikalisku ulogu. B-prsten flavonoida sposoban je da donira elektrone, pri čemu nastaju stabilniji i manje reaktivni organski radikali.



Slika 2.6. Hemijske strukture flavonoid glikozida karakterističnih za seme *Zea mays* L. Ljubičasto je prikazan deo šećernog ostataka vezan za aglikon (nešećernu komponentu).

### 2.2.1.3 Konjugati poliamina

Semena žitarica su dobri izvori poliamina i njihovih konjugovanih oblika (Walters 2003, Bassard i sar., 2010). Poliamini su niskomolekularni alifatični ugljovodoni, polikationske prirode na fiziološkom pH. U biljkama najznačajniji poliamini su: diamin-putrescin, triamin-spermidin i tetramin-spermin (**Slika 2.7.**) (Ghughe i sar., 2015).

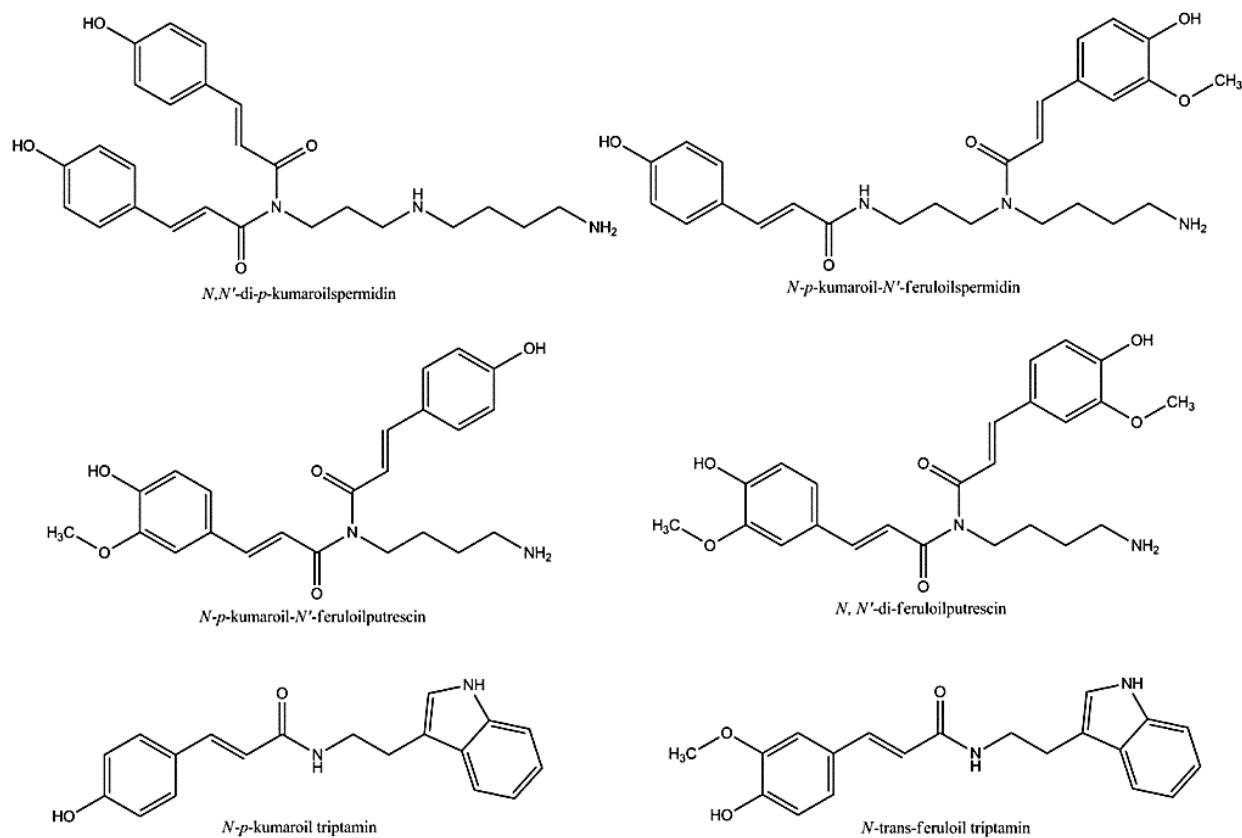


**Slika 2.7.** Hemijske strukture najzastupljenijih poliamina.

Kao pozitivno naelektrisani molekuli, poliamini se elektrostatički vezuju za različite negativno-naelektrisane unutarćelijske makromolekule (proteine, nukleinske kiseline i fosfolipide), uzrokujući njihovu (de)stabilizaciju. Imaju brojne fiziološke i biohemijske uloge, poput regulacije transkripcije, translacije, ćelijske deobe, elongacije, fotosinteze, transporta jona, signalizacije, itd. (Pál i sar., 2021).

Zabeleženo je da ova jedinjenja imaju i antioksidativnu odbrambenu ulogu u odgovoru na faktore stresa. Usled infekcije patogenom, dolazi do varijacija u sadržaju određenih poliamina (Kusano i sar., 2008; Walters 2003). Katabolizmom poliamina, posredstvom enzima poliamin- i diamin-oksidaaza, nastaje vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ), koji učestvuje u putevima prenosa signala u odbramenom odgovoru biljke, na primer, na sintezu fitoaleksina. Sa katabolizmom poliamina povezani su i drugi odbrambeni mehanizmi, poput očvršćavanja ćelijskog zida, lignifikacije i programirane ćelijske smrti (Walters 2003; Handa i sar., 2018). Takođe, ova jedinjenja imaju ulogu u održavanju redoks homeostaze u ćeliji. Nivo unutarćelijske koncentracije slobodnih oblika poliamina regulisan je konjugacijom sa hidroksicinaminskim kiselinama (*FA*, *p-CA*, kafeinska kiselina) i arilmonoaminima (tiraminom, triptaminom) (Bassard i sar., 2010; Herrmann i Nagel, 1989). Hidroksicinaminski kiseli amidi imaju antioksidativnu i antifungalnu aktivnost (Pál i sar., 2021). Pojedini konjugati putrescina imaju inhibitorne efekte na biosinetzu  $AFB_1$  (Mellon i Moreau, 2004). Na **slici 2.8.** prikazane su hemijske strukture pojedinih konjugata poliamina.

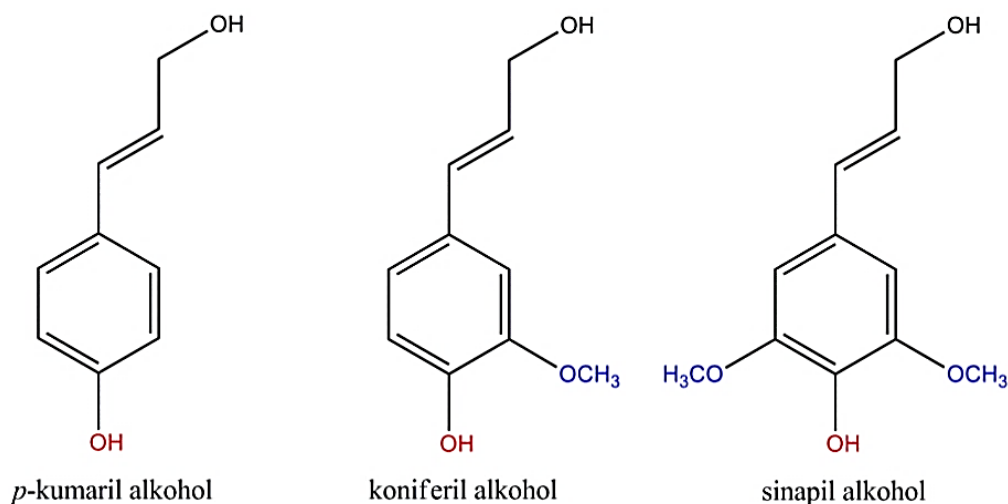




Slika 2.8. Hemijske strukture pojedinih konjugata poliamina.

#### 2.2.1.4 Lignin

U semenu kukuruza mali je udeo lignina (oko 5,5%) (del Río i sar., 2018). Lignin je funkcionalni aromatični polimer u ćelijskom zidu biljke. Nastaje oksidativnim vezivanjem 4-hidroksi-fenilpropanoida (Ralph i sar., 2004). Izgrađen je od monolignola *p*-kumarila, koniferila i sinapil alkohola i odgovarajućih kiselina, koje se razlikuju po stepenu metoksilacije (Slika 2.9.). Rio i sar. (2018) su pokazali da pojedini nekonvencionalni monomeri, poput diferuloilputrescina, mogu biti ugrađeni u polimer lignina semenog omotača kukuruza. Isti autori su ustanovili da u toku lignifikacije dolazi do kuplovanja ovog jedinjenja, otvarajući mogućnost njegove primene u modifikaciji lignina. Enzimi fenol-oksidoreduktaze, kao što su O<sub>2</sub>-zavisne lakaze i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-zavisne peroksidaze, učestvuju u formiranju monolignol radikala. Delokalizacija elektrona na ovim radikalima omogućava njihovo dalje neenzimsko kuplovanje na različitim mestima u rastućem polimeru lignina (del Río i sar., 2018). U studijama Radotić i sar. (1994) i Mičić i sar. (2004), postavljen je model supermolekularne modularne strukture lignina, kojim je utvrđeno da je lignifikacija visoko uređen proces (Radotić i sar., 1994; Mičić i sar., 2004). Kod biljaka je promena u sadržaju i sastavu lignina utvrđena kao adaptivni odgovor na različite tipove stresa (Moura i Bonine, 2010). Navedeni tip lignina razlikuje se od onog koji se formira pri normalnim fiziološkim uslovima: „stresirani“ lignin (Santiago i sar., 2013). Lignifikacija semenog omotača je mehanizam zaštite semena od progresije bolesti izazvanih patogenima i njihovim toksinima (Vance i sar., 1980); uglavnom se javlja kao prva linija odbrane nakon promena redoks statusa usled nagomilavanja ROS (Cesarino, 2019).



**Slika 2.9.** Osnovna struktura monolignola.

### 2.2.2. Biološki značaj mikro- i makroelemenata

Elementi neophodni za normalan rast i razviće biljaka nazivaju se esencijalnim. Među makroelementima, kalijum je najzastupljeniji u žitaricama. On ima katalitičku ulogu u aktivaciji više od 40 različitih enzima koji učestvuju u sintezi proteina, fotosintezi, osmoregulaciji, katjonajnon ravnoteži, itd. Osim toga, kalijum doprinosi i mehanizmima otpornosti biljke na stres (Maathuis, 2009; Nešković i sar., 2003). Kalcijum ima važnu ulogu u regulaciji metaboličkih procesa i razvića. Sekundarni je glasnik i signalni molekul, kao i aktivator je mnogih enzima, npr. kinaza i fosfataza (Demidchik, 2015). Signalni putevi Ca interaguju sa drugim sistemima ćelijske signalizacije kao što su ROS (Görlach i sar., 2015). Učestvuje u održavanju strukturnog integriteta ćelijske membrane i njene permeabilnosti, kao i na rigidnost ćelijskog zida biljaka i čvrstinu ploda (Maathuis, 2009).

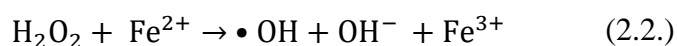
Od mikroelemenata poseban značaj imaju joni prelaznih metala, kao što su mangan (Mn), bakar (Cu), gvožđe (Fe), cink (Zn), nikel (Ni) i kobalt (Co). Osim fizioloških uloga u procesima razvića semena, metabolizmu lipida i nukleinskih kiselina, ekspresiji i regulaciji gena, sintezi proteina, fotosintezi, respiraciji, zabeleženo je da oni učestvuju i u zaštitinim mehanizmima od uticaja abiotičkog i biotičkog stresa (Hänsch i Mendel, 2009; Nešković i sar., 2003; Tripathi i sar., 2015). Pored toga, pojedini mikroelementi (npr. Cu, Mn) doprinose strukturnoj stabilnosti i mehaničkoj otpornosti ćelijskog zida (Assunção i sar., 2022) i učestvuju u procesu lignifikacije i metabolizmu fenolnih jedinjenja (Tripathi i sar., 2015). Elementi Cu, Fe, Mn, Zn su kofaktori različitih antioksidativnih enzima, poput superoksid-dismutaza, peroksidaza i katalaza. Takođe, sastavni su deo oksidaza, poput polifenol-oksidaza, diamin-oksidaza, citohrom-oksidaza. Veliku podgrupu Zn-proteina čine transkripcioni faktori (Hänsch i Mendel, 2009). Kao što je navedeno, najznačajniju ulogu u biosintezi aflatoksina ima transkripcioni faktor AflR koji je Zn(II)<sub>2</sub>Cys klaster protein (Caceres i sar., 2020).

Izuzev Zn, joni prelaznih metala Cu, Fe, Mn su redoks aktivni. Stoga, prisutni u višku mogu da ispolje pro-oksidativnu ulogu, kada dolazi do porasta koncentracije ROS (Rodrigo-Moreno i sar., 2013). Održanje homeostaze jona metala od ključnog je značaja, kroz procese njihove mobilizacije, usvajanja i raspodele unutar biljke, procese unutarćelijskog transporta i skladištenja (Rai i sar., 2021).

### 2.2.3. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su hemijske vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskim ili molekulskim orbitalama. Nespareni elektroni daju im značajan stepen reaktivnosti (Phaniendrai sar., 2015, Suzen i sar.,2017). Zbog kratkog poluživota, njihova *in vivo* detekcija je otežana. Elektronska paramagnetna rezonantna (EPR) spektroskopija predstavlja metodu izbora za direktno merenje i karakterizaciju FR (Gallez i Swrtz, 2004). Ova tehnika široko se primenjuje u proučavanju slobodno-radikalnih procesa kod biljaka (Mojović i sar., 2005; Gallez i Swrtz, 2004).

Literaturni podaci ukazuju na značajnu primenu EPR imidžinga ne samo u biomedicinskim sferama, već i za izučavanje oksidativnog stresa kod biljaka (Khramtsov, 2012; Gulaboski i sar., 2019; Mojović i sar.,2005). Molekulski kiseonik (O<sub>2</sub>) je centralni molekul ćelijske respiracije u svim aerobnim živim sistemima. Naime, O<sub>2</sub> poseduje dva elektrona paralelnih spinova u dve degenerisane orbitale. Slabo je reaktivan prema biomolekulima, zbog spin restrikcije koja dovodi do kinetičke barijere, za čije prevazilaženje je potrebna količina energije koja omogućava prelaz u singletno stanje (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), ili redukciju u aktivne oblike kiseonika. Nađeni su različiti oblici ROS. Oni se javljaju kao radikali (npr. hidroksil radikal (<sup>•</sup>OH), superoksid-anjon-radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), azot-oksidi radikal (<sup>•</sup>NO)) i neradikalne vrste (npr. singletni kiseonik (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>)) (Apel i Hirt,2004; Nikolova, 2012). ROS neprekidno nastaju tokom aerobnog metabolizma. Učestvuju u brojnim fiziološkim procesima, kao što su unutarćelijska i međućelijska signalizacija, regulacija, razviće i rastenje biljaka (Suzen, i sar., 2017). Korisni efekti ROS ispoljavaju se pri niskim/umerenim koncentracijama. S druge strane, kao odgovor na abiotički i biotički stres, može doći do akumulacije FR (Apel i Hirt, 2004; Shetty i sar., 2008). Vodonik-peroksid ima direktnu ulogu u odbrani protiv patogena. Pored toga, učestvuje u signalnoj transdukciji mnogih puteva koji dovode do umnožavanja drugih sistema odbrane. Svrstava se u dugoživeće ROS; lako difunduje kroz ćelijsku membranu do različitih (sub)ćelijskih odeljaka. U biološkim sistemima, ako je u višku, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovodi do oksidativnog stresa kroz Fentonovu reakciju (2.2) (Nikolova, 2012).



Kao proizvod reakcije (2.2) nastaje hidroksil radikal (<sup>•</sup>OH), u prisustvu jona prelaznog metala kao što je Fe. Pokazano je da <sup>•</sup>OH ima kratko vreme poluživota (ns); u reakciji sa biomolekulima može prouzrokovati njihova oksidativna oštećenja. Uključen je u brojne procese, kao što su lipidna peroksidacija, signalizacija oksidativnog stresa, programirana ćelijska smrt, aktivacija jonskih kanala za Ca<sup>2+</sup> i K<sup>+</sup> jone. Pokazano je da ne postoje specifični antioksidansi koji bi omogućili njegovo uklanjanje (Mittler, 2017; Akter i sar., 2021). Biljke imaju razvijene antioksidativne odbrambene sisteme koji kontrolišu kaskadu nekontrolisanih reakcija oksidacije, i tako štite ćelije od oksidativnog oštećenja, uklanjanjem ROS (Gill i Tuteja, 2010). To su raznovrsne enzimske i neenzimske komponente. ROS mogu indukovati ekspresiju gena koji kodiraju različite antioksidativne enzime, kao što su superoksid-dismutaza, katalaza, peroksidaza i dr. Fenolna jedinjenja, da ponovimo, čine jednu od najznačajnijih grupa neenzimskih antioksidanata. Veličina i lipofilnost ovih jedinjenja određuje njihovu lokalizaciju u ćeliji, tako da se nalaze u unutarćelijskim i vanćelijskim odeljcima (Nimse i Pal, 2015). U biološkim sistemima, kada postoji prekomerna produkcija FR, a smanjeni sadržaj antioksidanata, dolazi do stanja tzv. oksidativnog stresa. Njega odlikuje narušeni ravnotežni status između antioksidanata i prooksidanata. Pod fiziološkim uslovima, redoks stanje se održava ka više negativnijim vrednostima redoks potencijala. Za razliku od toga, kod oksidativnog stresa vlada oksidujuće okruženje (Kunwar i Priyadarsini, 2011) koje može dovesti do oštećenja ćelijskih membrana, biomolekula, kao i smrti ćelije pri produženom trajanju stresa (Phaniendra i sar., 2015). U reakciji ROS i biomolekula mogu nastati organski radikali koji su izrazito stabilni u suvom i imobilizovanom okruženju kakvo je u semenu. Kako koncentracija organskih FR zavisi od stepena tolerancije biljke na stres, mogu se smatrati

indirektnim indikatorom povećanja ROS odnosno oksidativnog stresa (Araújo i sar., 2016; Nakagawa i Maeda 2017; Kurdziel i sar.,2015).

### 2.3. Osnovne fluorofore u biljkama

U biljkama se nalaze različita organska jedinjenja (fluorofore) koja emituju svetlost (autofluoresciraju) posle pobuđivanja (Donaldson, 2020). Ova jedinjenja se odlikuju karakterističnim fluorescentnim spektrima, koji zavise od strukture molekula (planarna, rigidna, ili konjugovana), njegove koncentracije, kao i drugih faktora (pH, temperatura, okolina (rastvarač), itd.) (Lakowicz, 1999). Proteini imaju karakterističnu fluorescenciju, koja potiče od aromatičnih aminokiselinskih ostataka, pre svega triptofana (Trp), u manjoj meri fenilalanina (Phe) i tirozina (Tyr). Njihovi emisioni maksimumi nalaze se u spektralnom regionu od 280 nm do 355 nm (**Tabela 2.2.**). U ovoj disertaciji proučen je spektralni region iznad 355 nm, u kojem emituju *druge* fluorofore, poput različitih fenolnih jedinjenja (ferulinska kiselina, flavonoidi, lignini i dr.), vitamina, kofaktora, kumarina, pigmentata, itd. (**Tabela 2.2.**). Fluorescentne karakteristike fluorofora kod biljaka mogu biti izmenjene u stanju stresa. Stoga, razumevanje ovih promena pruža korisne fundamentalne informacije o fiziološkom stanju biljke, kao i uticaju različitih faktora stresa na biljku (Cerović i sar.,1999; Donaldson, 2020).

Takođe, fluorofore mogu biti upotrebljene za efikasno otkrivanje stresa, odnosno praćenje stepena stresa kod poljoprivrednih kultura, primenom različitih optičkih (fluorescentnih) tehnika (Cerović i sar., 1999; Donaldson, 2020; García-Plazaola i sar., 2015).

**Tabela 2.2.** Pregled endogenih fluorofora (ekscitacionih i emisionih maksimuma) prisutnih u biljkama (Lakowicz 1999<sup>1</sup>, Christenseni sar., 2006<sup>2</sup>, Cerović i sar., 1999<sup>3</sup>, Croce, 2021<sup>4</sup>).

Fluorofora	Apsorpcija/Ekscitacija (nm)	Emisija(nm)	Reference
fenilalanin (Phe)	257	282	1
tirozin (Tyr)	274	303	1,2
triptofan (Trp)	290	355	1,2
ferulinska kiselina	320	420	1,3
flavonoidi	355/488	400-600/500-700	4
karotenoidi	400-520	520-640	4
NADPH	340	460	4
FAD	376	530	4
lignin	355/488	400-600/500-700	4
hlorofil <i>b</i>	470	664	3
hlorofil <i>a</i>	430	680	3
kumarini	400-450	450-480	4

## 3. EKSPERIMENTALNI DEO

### 3.1. Hemikalije

U izradi ove doktorske disertacije korišćene su hemikalije *p.a.* stepena čistoće, ukoliko nije drugačije naznačeno. Metanol (MeOH) (*HPLC* čistoće), acetonitril (*MS* čistoće), mravlja kiselina (*MS* čistoće), natrijum-hidroksid, etil-acetat, dietil-etar, natrijum-karbonat, *Folin-Ciocalteu* reagens, galna kiselina, azotna kiselina (65%; v/v), vodonik-peroksid (30%; v/v), hlorovodonična kiselina, su nabavljeni od proizvođača firme *Merck* (Darmstadt, Nemačka). *ABTS* i standardi fenolnih kiselina (*p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, izoferulinska kiselina) su nabavljeni od *Sigma-Aldrich* (Štajnhajm, Nemačka). Osnovni rastvor, koji sadrži 0,5000 g/L makroelemenata nabavljen je od firme (*VHG Labs*, SAD). Semikvantitativni osnovni rastvor, koji sadrži 0,0100 g/L elemenata u tragovima, nabavljen je od firme (*Alfa Aesar*, SAD). Ultračista dejonizovana voda dobijena je pomoću sistema za prečišćavanje Millipore sistem *Simplicity* tip 185 (Darmstadt, Nemačka) i Merlin reverzno osmozni (RO) sistem (0,018  $\mu$ S/cm, *Purefreedom*, *Lincolnshire*, UK).

### 3.2. Ispitivani uzorci semena

Eksperimentalna ispitivanja u okviru ove studije obuhvatila su nezaražena semena *Zea mays* L. (bez prisustva aflatoksina, tj. kontrolna) i ona u kojima je standardnim analitičkim metodama (*ELISA* i/ili *HPLC*) utvrđeno prisustvo različitih koncentracija aflatoksina B<sub>1</sub>. Koncentracija aflatoksina određena je prema modifikovanoj AOAC (engl. *Association of Official Analytical Chemists*) standardnoj metodi broj 980,20 (Oliveria i sar., 2009). Istraživanja su urađena na semenima istog genotipa (tip zubana), prikupljenim na oglednim poljima Univerziteta u Beogradu-Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, nakon veštačke zaraze gljivom. Analize su obuhvatile i uzorke semena dobijena od Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, kao i komercijalno kukruzno brašno namenjeno za ljudsku ishranu proizvođača Žitko Plus d.o.o „Bačka Topola“.

### 3.3. Priprema uzorka semena

#### 3.3.1. Homogenizacija uzorka

Za usitnjavanje uzorka korišćeni su: mlin za kafu (*Bosch*, Nemačka), laboratorijski mlin (*Fritsch Mortar Grindev PULVERISETTE 2*, Nemačka), avan i tučak. Homogenizacija uzorka je urađena sa tečnim azotom, a dalja ekstrakcija fenolnih jedinjenja na ledu.

#### 3.3.2. Priprema metanolnih ekstrakata

Usitnjenim uzorcima (0,1 g) dodat je 80% MeOH (1 ml). Smeša je mešana 60 minuta, a potom centrifugirana (10,000 x g, 5 min, 4°C). Odekantovani supernatanti su čuvani na -20°C do analize.

#### 3.3.3. Priprema hidrolizata

Usitnjenim uzorcima (0,5 g) dodavan je 4M NaOH (10 ml). Dobijeni homogenati su podvrgnuti struji azota nekoliko sekundi, a potom mučkani narednih 4 h. Dobijeni bazni hidrolizati su istitrovani 6M HCl do postizanja pH vrednosti oko 2. Po 5 ml hidrolizata je mešano sa 5 ml smeše dietil-etra i etil-acetata (1:1, v/v) 3 minuta, a potom centrifugirano (12,000 x g, 4 min). Gornji sloj je pažljivo prebačen u novu kivetu, a reekstrakcija je urađena iz donjeg sloja (4-puta).

Alikvot (10 ml) hidrolizata uparen je do suva u struji azota. Po dodavanju MeOH (3ml), usledilo je snažno mućkanje u trajanju od 3 minuta. Uzorci su sačuvani na -20°C do analize.

### 3.3.4. Izolovanje ćelijskog zida

Usitnjeni uzorci (0,4 g) su homogenizovani sa 80% MeOH (10 ml), a potom mućkani narednih 60 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja (1,500 x g, 5 min), talozi su ispirani sa 80% MeOH (2 puta) i reekstrahovani serijom rastvarača: 1 M NaCl (1 put), Triton X-100 (1 put), dejonizovana voda (2 puta), 100% MeOH (2 puta) i 100% Aceton (2 puta). Nakon koraka ispiranja je usledilo sušenje na 60°C u sušnici. Odmerena masa suvog taloga pomešana je sa rastvorom NaOH (1 M) zagrejanim na 80°C. Posle 17 h inkubacije na sobnoj temperaturi, talog je dalje ispran 2 puta sa dejonizovanom vodom i osušen na 80°C. Osušeni talog je dalje korišćen za određivanje sadržaja lignina, pomoću Acetil-bromidnog testa (AcBr).

### 3.3.5. Mikrotalasna digestija

Usitnjeni uzorci semena kukuruza (0,2 g), tretirani su smešom 5 ml HNO<sub>3</sub> (65%; v/v) i 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, v/v), a potom izloženi digestiji u mikrotalasnoj sušnici (*Speedwave*, Berghof, Nemačka). U **tabeli 3.1.** nalaze se parametri korišćeni tokom procesa mineralizacije. Razoreni uzorci su ohlađeni i prebačeni u normalne sudove (25ml), nakon čega je dodavana ultračista voda do oznake. Na ovaj način pripremljeni uzorci su korišćeni za analizu mikro- i makroelemenata, pomoću *ICP-OES* i *ICP-QMS* tehnike, redom. U slučaju *ICP-QMS* analize, uzorci su dodatno razblaženi pet puta.

**Tabela 3.1.** Primenjeni režim rada za mikrotalasnu digestiju.

Temperatura (°C)	Pritisak (kPa)	Ramp time <sup>1</sup> (min)	Hold time <sup>2</sup> (min)	Snaga (%)
170	3000	10	10	100
200	3500	10	20	100

<sup>1</sup> Ramp time: vreme povećavanja temperature

<sup>2</sup> Hold time: vreme održavanja konačne temperature

## 3.4. Hemijska analiza semena

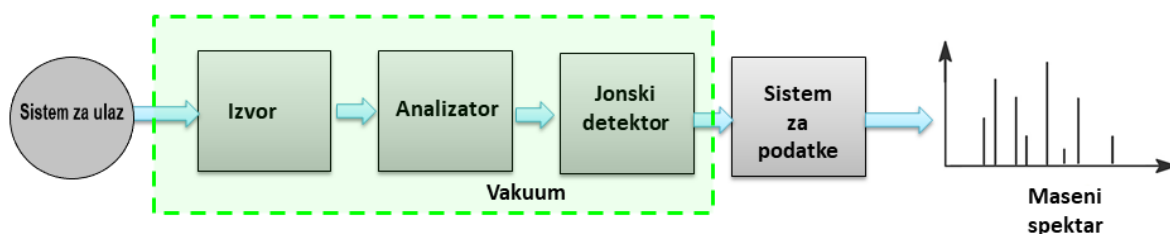
### 3.4.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi (engl. *high performance liquid chromatography*,) je metoda u kojoj dolazi do razdvajanja supstanci iz smeše na osnovu njihovog različitog koeficijenta raspodele između stacionarne i mobilne faze. Za razdvajanje molekula po hidrofobnosti uobičajeno se koristi reverzno-fazna (*RP*) hromatografija, u kojoj je mobilna faza polarnija u odnosu na stacionarnu. Rastvarač, ili mobilna faza, obično je neki organski rastvarač, kao metanol i acetonitril. Uzorak koji je rastvorljiv u mobilnoj fazi prolazi kroz poroznu čvrstu stacionarnu fazu u koloni, gde dolazi do selektivnog adsorbovanja i desorbovanja komponenata smeše koja se eluira. Sa kolone će se prvo eluirati polarna jedinjenja, a zatim nepolarna. Različiti sorbenti mogu da se primene kao stacionarna faza. Najčešće je to hemijski modifikovan silika-gel sa nepolarnim grupama (C18, C8, itd.). Nasuprot tome, kod hromatografije na normalnim fazama stacionarna faza je polarnija u odnosu na mobilnu fazu.

Različiti tipovi detektora (UV-VIS, fluorescentni, maseni i dr.), kao i njihove kombinacije, koriste se za identifikaciju i kvantifikaciju supstanci razdvojenih na koloni (Meyer, 2004).

U ovoj disertaciji, korišćen je detektor sa više dioda (engl. *diode array detector, DAD*), koji omogućava istovremeno merenje apsorbancije UV-VIS svetlosti u ispitivanom uzorku na više različitih talasnih dužina.

Ukoliko je potrebna pouzdana identifikacija nepoznatih jedinjenja, kao i određivanje njihovih struktura i masa molekula, koristi se maseni spektrometar. Osnovne komponente ovog uređaja su prikazane na **slici 3.1**.



**Slika 3.1.** Shematski prikaz osnovnih komponenti masenog spektrometra.

Masena detekcija se zasniva na sledećem principu. Pomoću sistema za unošenje uzorka (tzv. inlet) neutralni molekul analita dospeva u jonski izvor pod visokim vakuumom, gde dalje podleže jonizaciji i fragmentaciji. Postoje različiti tipovi jonskih izvora; u našem radu korišćen je elektrosprej jonizacioni (engl. *electrospray ionisation, ESI*) izvor. On pripada u tehnikama meke jonizacije, koja omogućava analizu malih i velikih molekula, nekovalentnih kompleksa, i dr. Joni, ubrzani delovanjem magnetnog i/ili električnog polja, dolaze do masenog analizatora, koji omogućava njihovo razdvajanje na osnovu odnosa mase i naelektrisanja ( $m/z$ ) (Tešević 2013; Meyer, 2004). U radu je korišćen QqQ kvadrupolni analizator, koji radi na principu da se na prvom kvadrupolu propuštene mase analiziraju na drugom kvadrupolu, čime se dostiže visoka selektivnost. Pored MS-MS detektora koji je korišćen za potvrđivanje prisustva određenih analita, korišćena je i masena detekcija sa pulsним masenim analizatorom (orbitrap). On se zasniva na tipu masenih analizatora sa jonskom zamkom, a karakteriše ga visoka rezolucija i preciznost pri određivanju molekulske mase nepoznatog jedinjenja.

#### 3.4.1.1. UHPLC-LTQOrbiTrapXL

Za hromatografsko razdvajanje i identifikaciju fenolnih jedinjenja korišćen je UHPLC sa kvaternarnom pumpom Accela 600 i Accela autosemplerom (*ThermoFisher Scientific*, Bremen, Nemačka). Ovaj sistem je povezan sa linearnim jonskim trapom – OrbiTrap hibridnim masenim spektrometrom visoke rezolucije (*LTQ OrbiTrap MS XL*), opremljenim jonskim izvorom sa elektrosprej jonizacijom (*HESI-II, ThermoFisher Scientific*).

Razdvajanje jedinjenja je urađeno na analitičkoj koloni Synchronis C18 koloni (100 x 2,1 mm; veličina čestica od 1,7  $\mu\text{m}$ ) proizvođača *Thermo Fisher Scientific*. Mobilna faza sastojala se od 0,1% rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B), koji su eluirani u linearnom gradientu koncentracija: 2% B, 0 do 1 min; 2–98% B, 1 do 14 min; 98–2% B, 14,0 do 14,1 min, uz 2% B u narednih 6 minuta. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,3 ml min<sup>-1</sup>. Snimanje masenih spektara je urađeno u negativnom jonizacionom modu. Parametri jonskog izvora i podaci podešavanja su bili podešeni kao u radu Jevtić i sar. (2017). Za određivanje monoizotopskih masa nepoznatih jedinjenja, sa nivoom fragmentacije do MS<sup>4</sup>, urađena je analiza kompletnog skeniranja (engl. *full scanning*). ChemDraw (12,0) program upotrebljen je za izračunavanje tačne mase identifikovanih jedinjenja.

### 3.4.1.2. RP-HPLC-DAD-ESI-MS

Za razdvajanje, kvalitativnu i kvantitativnu analizu konjugata poliamina i fenolnih jedinjenja iz uzoraka semena kukuruza korišćena je RP-HPLC, sa DAD masenim detektorom sa jednim analizatorom (engl. *single quadrupole*) i ESI izvorom. Uređaj je prikazan na slici 3.2. Softver Empower 2 (Waters, Milford, SAD) iskorišćen je za obradu podataka.



Slika 3.2. RP-HPLC-DAD-ESI-MS (Waters, Milford, SAD) instrument.

Pre injektiranja u HPLC sistem (Waters, Milford, MA, SAD), svi uzorci su profiltrirani kroz najlonske špic-filtre (0,22  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, Tooance, SAD). Razdvajanje fenolnih jedinjenja urađeno je na Symmetry C-18 RP koloni (125 x 4 mm, veličina čestica od 5  $\mu\text{m}$ ), povezanoj sa Symmetry pretkolonom (Waters, Milford, MA, SAD).

Mobilna faza se sastojala od 0,1% rastvora mravlje kiseline (A) i acetonitrila (B), koji su eluirani u gradientu koncentracija: 15 – 45% B, 20 min; 55% B, 5 min; 15% B, 10 min; uz dodatnih 5 min za ekvilibraciju kolone. Protok mobilne faze je bio podešen na 1,00 ml min<sup>-1</sup>. Postkolonski delilac protoka (ASI, Richmond, CA, SAD), sa odnosom razdvajanja 5:1, korišćen je za razdvajanje mobilne faze prema dva detekora (DAD i MS), kao i za dobijanje optimalnog protoka mobilne faze za ESI probu. Parametri jonskog izvora bili su: napon na kapilari, 3,0 kV; napon na konusu, 30 V i -30 V za pozitivan i negativan mod, redom; napon ekstraktora, 3,0 V i radiofrekventni napon, 0,2 V. Temperatura izvora je bila 120°C, a temperatura desolvacije 400°C, u protoku N<sub>2</sub> od 500 L h<sup>-1</sup>.

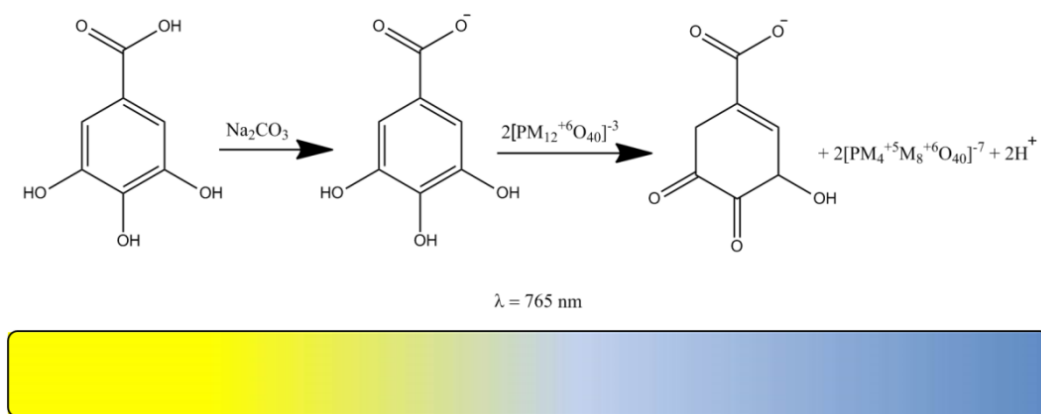
Za analizu konjugata poliamina snimanje masenih spektara je izvedeno u pozitivnom jonizacijom režimu [M+H]<sup>+</sup>, dok je za ostala fenolna jedinjenja maseni spektrometar bio podešen u negativnom jonizacionom modu [M-H]<sup>-</sup>, u oba slučaja u opsegu masa od 100 do 1000 *m/z*. Identifikacija jedinjenja u ispitivanim uzorcima urađena je na osnovu odgovarajućih spektralnih karakteristika (UV i MS spektri, retencionna vremena, karakteristične fragmentacije). Jedinjenja su identifikovana poređenjem UV i MS spektara sa standardom odgovarajućeg jedinjenja. Za jedinjenja čiji standardi nisu bili komercijalno dostupni, primenjena je tentativna identifikacija pikova, koja se zasniva na poređenju eksperimentalnih vrednosti sa podacima dostupnim u literaturi. Kvantitativna analiza jedinjenja od interesa urađena je pomoću metode eksternog standarda, gde su koncentracije analita određene sa kalibracione krive. Za jedinjenja koja nemaju komercijalno dostupne standarde, korišćena je metoda normalizacije površina pikova. Sadržaj za analite od interesa je izražen u gram ekvivalentima odgovarajuće fenolne kiselina, čiji su standardi dostupni.



### 3.4.2. Spektrofotometrijska ispitivanja semena

#### 3.4.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC)

Princip metode: Spektrofotometrijska metoda po *Folin-Ciocalteu* (FC) proceduri je korišćena za određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC) u ispitivanim uzorcima (Singleton i Rossi, 1965). Reagens FC predstavlja smešu fosfomolibdenove i fosfovolframove kiseline, koja se u prisustvu fenolnih jedinjenja redukuje u okside volframa ili molibdena. Ovi oksidi metala imaju intenzivno plavu boju, čija hromofora pokazuje maksimum apsorpcije na oko 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola u analiziranim uzorcima proporcionalna je intenzitetu apsorpcije svetlosti na posmatranoj talasnoj dužini (**Slika 3.3.**).



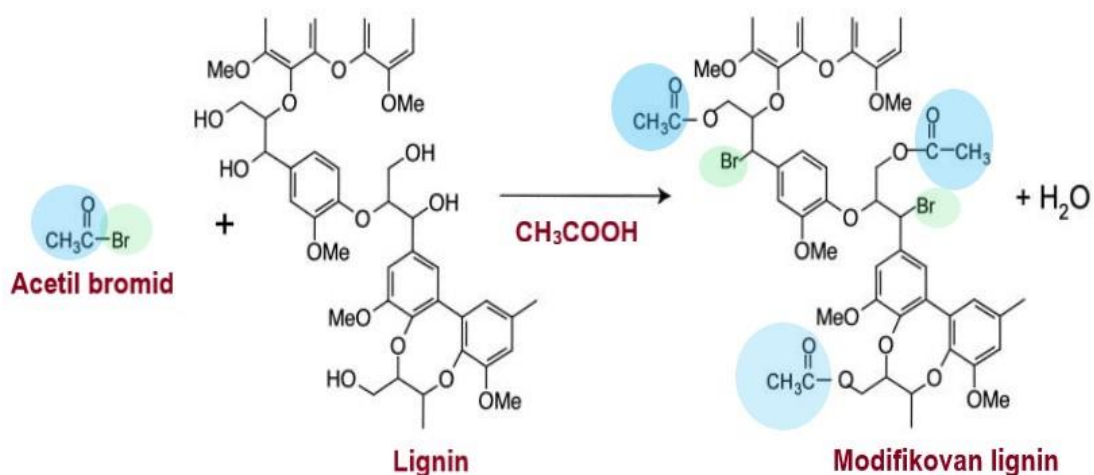
**Slika 3.3.** Princip reakcije između fenolnih jedinjenja i derivata fosfomolibdenove i fosfovolframove kiseline u alkalnoj sredini. Promena boje rastvora iz žute u plavu (Modifikovano iz: Munteanu i Apetrei, 2021).

Protokol: Ekstrakti uzoraka (50  $\mu\text{l}$ ) pomešani su sa 475  $\mu\text{l}$  FC reagensa, a nakon 3 minuta dodavan je (475  $\mu\text{l}$ ) rastvor natrijum-karbonata (0,2 M). Nakon inkubacije od 60 minuta (u mraku na sobnoj temperaturi), prebačeno je 200  $\mu\text{l}$  reakcione smeše u bunarčice mikrotitar pločice. Apsorbanca je izmerena na 724 nm, pomoću Multiskan Spectrum (*Thermo Electron Corporation*, Finska) spektrofotometra. Koncentracija ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima određena je sa standardne krive galne kiseline (GA) (0,1 mM do 2 mM).

Izražavanje rezultata: Rezultati izraženi kao  $\mu\text{g}$  ekvivalenata GA po gramu suve mase (DW) uzorka ( $\mu\text{g}$  GA eq/g DW).

#### 3.4.2.2. Određivanje sadržaja lignina pomoću Acetil-Bromidnog (AcBr) testa

Princip metode: Osnovni princip ovog testa je shematski ilustrovan na **slici 3.4**. Bazira se na bromovanju  $\alpha$ -hidroksilnih grupa i acilaciji  $\gamma$ -hidroksil grupa i slobodnih fenolnih grupa, pri čemu u prisustvu NaOH nastaje lignin rastvoran u sirćetnoj kiselini. Koncentracija rastvornog lignina je određena merenjem apsorbanacije na 280 nm, pomoću UV spektrofotometra (2051 PC *Shimadzu*, Japan).



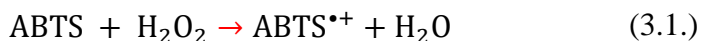
**Slika 3.4.** Shematska ilustracija osnovnog principa AcBr testa.  
(oznaka Me se odnosi na metil gupu).

Protokol: Izmereno je oko 2,5 mg osušenog taloga (pripremljenom po proceduri u eksperimentalnom delu 3.3.4) i pomešano sa 25% AcBr (250  $\mu$ l) rastvorenog u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Nakon inkubacije od 30 min. na temperaturi od 70°C i hlađenja u ledenom kupatilu, dodatje rastvor 2M NaOH (250  $\mu$ l). Homogenat je centrifugiran u trajanju od 5 min (1,500 x g). U daljoj analizi je iskorišćen supernatant. Reakciona smeša sadržala je 250  $\mu$ l supernatanta ispitivanih uzoraka (ili standarda), 5  $\mu$ l 15M hidrosilamina i 2495  $\mu$ l glacijalne sirćetne kiseline. Standardna kriva je napravljena u opsegu od 10 do 150  $\mu$ l, sa koniferil alkoholom (CA) kao standardom.

Izražavanje rezultata: Dobijeni rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta CA po gramu suve mase (DW) uzorka (mg CA eq/ g DW).

### 3.4.2.3. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti (TAA) primenom ABTS testa

Princip metode: TAA analiziranih uzoraka semena kukuruza određena je ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) testom po metodi Arnao et al. (1999). Ovaj kolorimetrijski test bazira se na formiranju ABTS katjon radikala uz pomoć enzima peroksidaze (HRP) u prisustvu vodonik-peroksida (3.1). Usled redukcije od strane antioksidanata prisutnih u uzorku, dolazi do obezbojavanja zelenog rastvora.



Protokol: Reakciona smeša sadržala je 2 mM ABTS, 15  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,25  $\mu$ M HRP (peroksidaza iz rena) u 50 mM kalijum-fosfatnom puferu pH 7,5. Pomoću UV-VIS spektrofotometra (Multiskan Spectrum; Thermo Electron Corporation, Finska) izmerena je apsorbanca na 730 nm, nakon 15 minuta. Do smanjenja apsorbanca u vremenu dolazi zbog uklanjanja ABTS radikala formiranih peroksidazom.

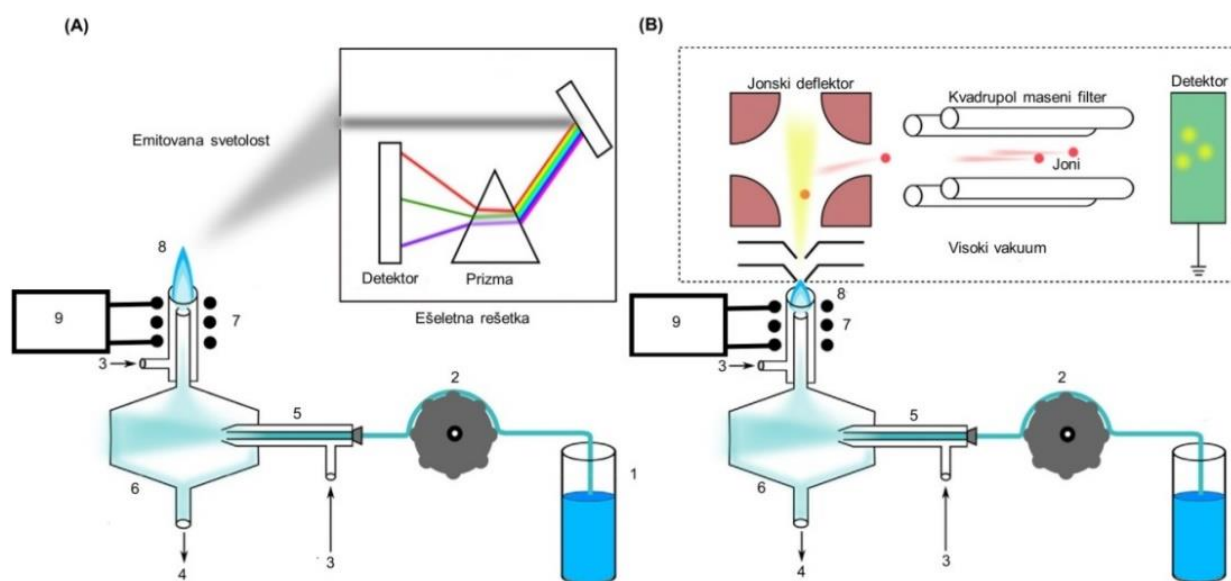
Izražavanje rezultata: Dobijeni rezultati su izraženi kao miligram ekvivalenta L-askorbinske kiseline (AA) po gramu suve mase (DW) uzorka (mg AA eq/ gDW).

### 3.4.3. Analiza elemenata pomoću ICP-OES i ICP-QMS

ICP-OES (ICP-AES) i ICP-QMS su standardne analitičke tehnike za multielementalnu analizu uzoraka. Induktivno kuplovana plazma (engl. *Inductive Coupled Plasma*, ICP) koristi se kao izvor pobuđivanja, atomizacije i jonizacije uzoraka.

Ove tehnike imaju sličan sistem za uvođenje uzorka i koriste plazmenik čija je spoljašnja cev obmotana induktivnim kalemom povezanim sa radiofrekventnim generatorom (RF) (Wilschefski i Baxter, 2019). Osnovne komponente ICP-OES i ICP-QMS uređaja prikazane su, redom, na slici 3.5A i 3.5B. Kod ICP-OES tehnike, visoka energija plazme dovodi do ekscitacije atoma i jona u viša nestabilna energetska stanja. Njihova relaksacija podrazumeva gubitak energije u vidu (ne)radijativnih procesa. Radijativni procesi razmene energije podrazumevaju emisiju fotona na talasnoj dužini karakterističnoj za svaki element. Međutim, kako se emisijski spektar sastoji od brojnih linija, potrebni su sistemi (kao što su difrakciona rešetka i prizma) koji će omogućiti njihovo razdvajanje na pojedinačne talasne dužine.

Kvantifikacija pojedinih elemenata u ispitivanim uzorcima se bazira na tehnici brojanja fotona. Za detekciju se najčešće koriste fotomultiplikatori (Wilschefski i Baxter, 2019; Thomas 2013). U ICP-QMS sistemu koristi se „tvrd“ jonizacioni izvor, koji omogućava potpunu atomizaciju i jonizaciju većine molekula u uzorku. Uglavnom se koristi kvadrupolni maseni analizator (poglavlje 3.4.1.1). Prednost ove tehnike je mogućnost izvođenja izotopske analize (Wilschefski i Baxter, 2019).



**Slika 3.5.** Shematski prikaz osnovnih komponenti (A) ICP-OES i (B) ICP-MS uređaja: (1) sistem za uvođenje uzorka, (2) peristaltička pumpa, (3) argon, (4) odvodnik, (5) raspršivač, (6) komora za raspršivanje, (7) plazmenik, (8) plazma, (9) radiofrekventni generator, (10) sistem za detekciju (Modifikovano iz Cherevko i Mayrhofer, 2018).

Određivanje sadržaja makroelemenata Ca, K, Na, Mg, kao i mikroelemenata Fe, u ispitivanim uzorcima semena izvršeno je induktivno-spregnutom plazmom sa optički emisijskim spektrometrom (ICP-OES) (model 6500 Duo, Thermo Scientific, United Kingdom). Ovaj uređaj je kontrolisan *Iteva* softverom. Za elementalnu analizu digestovanih uzoraka na ICP-OES instrumentu primenjeni su uslovi i talasne dužine redom date u **Tabeli 3.2.** i **Tabeli 3.3.**

**Tabela 3.2.** Instrumentalni uslovi na *ICP-OES*.

Raspršivač	Koncentrični
Komora za prskanje	Ciklonska
Snaga generator (W)	1150
Brzina glavnog protoka argona (L/min)	12
Brzina pomoćnog protoga argona (L/min)	0,5
Brzina protoka argona u raspršivaču (L/min)	0,5
Brzina protoka uzorka (ml/min)	1,0
Detektor	CID 86

**Tabela 3.3.** Odabrane talasne dužine za određivanje elemenata (Ca, K, Na, Mg i Fe).

Element	Talasna dužina (nm)
Ca	317,9
K	766,4
Na	589,5
Mg	280,2
Fe	238,2

Za određivanje sadržaja mikroelemenata (Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb i Hg) u uzorcima semena korišćena je tehnika induktivno-kuplovane plazme sa masenom spektrometrijom (*ICP-QMS*) (iCAP Q, Thermo Scientific X series 2). Ovaj uređaj je kontrolisan *Qtegra* softverom. Radni uslovi instrumenta i izotopi merenih elemenata su prikazani, redom, u **Tabeli 3.4** i **Tabeli 3.5**.

**Tabela 3.4.** Radni uslovi za analizu uzoraka na *ICP-QMS* instrumentu.

Snaga generatora (W)	1548
Protok gasa (L/min)	13,9; 1,09; 0,8
Vreme snimanja	3 x 50s
Broj očitavanja intenziteta pika	3
Vreme zadržavanja (ns)	10
Režim detektora	pulsni

**Tabela 3.5.** Mereni izotopi na *ICP-QMS* uređaju.

Izmereni izotopi	$^{27}\text{Al}$ ; $^{51}\text{V}$ ; $^{53}\text{Cr}$ ; $^{55}\text{Mn}$ ; $^{59}\text{Co}$ ; $^{62}\text{Ni}$ ; $^{63}\text{Cu}$ ; $^{66}\text{Zn}$ ; $^{75}\text{As}$ ; $^{113}\text{Cd}$ ; $^{204}\text{Hg}$ ; $^{208}\text{Pb}$
------------------	--

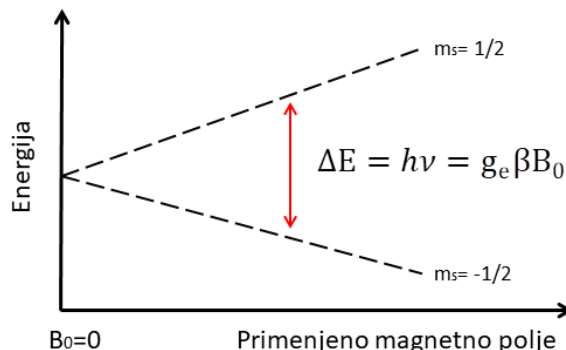
### 3.4.4. Elektronska paramagnetna rezonancija

Elektronska paramagnetna rezonancija (engl. *electron paramagnetic resonance*, EPR) je spektroskopska tehnika koja se zasniva na detekciji vrsta sa nesparenim elektronima (tzv. paramagnetici), nakon apsorpcije elektromagnetnog zračenja u spoljašnjem magnetnom polju (Gallez i sar., 2004; Rana i sar., 2010). U literaturi se koriste i drugi nazivi za ovu tehniku, kao elektronska spinska rezonancija (ESR), ili elektronska magnetna rezonancija (EMR) (Davies, 2006). Ova metoda predstavlja „zlatni standard“ za detekciju i karakterizaciju radikala u različitim sistemima, poput bioloških, hemijskih, medicinskih, itd. (Davies, 2006).

EPR rezonantni uslov se može izraziti:

$$\Delta E = h\nu = g_e\beta B_0 \quad (3.2.)$$

gde su:  $B_0$  - spoljašnje magnetno polje,  $\beta$  - Borov magneton,  $g_e$  - bezdimenziona konstanta proporcionalnosti (g-faktor). Ova konstanta zavisi od prirode radikala, a za slobodan elektron njena vrednost je 2,00232 (Davies, 2016). Na **slici 3.6.** je uprošćeno shematski prikazana razlika u energiji između nivoa (tzv. Zemanovo cepanje), koje većinom potiče od interakcije magnetnog momenta  $\mu_e$  nesparenog elektrona sa spoljašnjim magnetnim poljem  $B_0$ . Pri postavljanju uzorka u  $B_0$ , elektron zauzima, u odnosu na vektor magnetnog polja, dve orijentacije, paralelnu ili antiparelnu. U odsustvu  $B_0$  (tj.  $B_0 = 0$ ) ova dva stanja su degenerisana. Prelazi između ovih energijskih stanja se događaju kada se apsorbuje dovoljna količina energije koja je unutar mikrotalasne frekvencije zračenja (3.2). EPR spektar dobija se variranjem jačine magnetnog polja na fiksnoj mikrotalasnoj frekvenciji. Jačina magnetnog polja na kojoj se događa apsorpcija mikrotalasne frekvencije je snimljena u obliku EPR spektra, koji predstavlja prvi izvod apsorpcionog spektra. Pomoću ove tehnike dobijaju se kvalitativne i kvantitativne informacije u vezi FR (He, 2014, Khulbei sar., 2017).



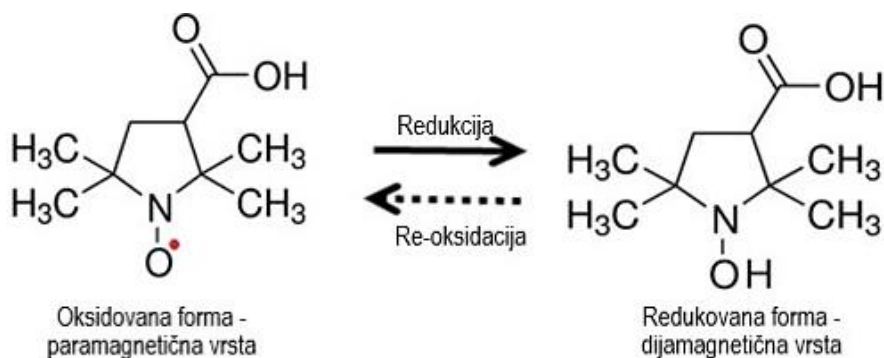
**Slika 3.6.** Raspodela energijskih nivoa elektronskog spina ( $m_s = \pm 1/2$ ), u primenjenom magnetnom polju ( $B_0$ ).

Za razliku od EPR spektroskopije, koja meri koncentraciju slobodnih radikala u celom objektu, EPR imidžingom dobijaju se informacije o prostornoj raspodeli spinova u objektu. Osnovni princip EPR imidžinga je detekcija rezonantne apsorpcije elektrona u objektu, dok je pomoću gradijenta magnetnog polja omogućena njihova prostorna vizuelizacija (Krishna i sar., 2001). Primenom spoljašnjeg magnetnog polja, rezonantni uslov će biti različit za svaku tačku duž linije gradijenta. Projekcije se sakupljaju pod različitim uglom i slika se rekonstruiše primenom projekcije unazad (Levêque i sar., 2008).

Kod standardnih komercijalnih EPR spektrometra radna frekvencija je oko 9,5 GHz (X traka), što može dovesti do nerezonantne apsorpcije vode prisutne u uzorku. Naime, prodornost mikrotalasa pri ovoj frekvenciji je do 1 mm u uzorak. Iz tog razloga, za snimanje većih bioloških uzoraka koriste se niže frekvencije na oko 1 GHz (L traka), a prodiranje mikrotalasa u uzorak je do 1 cm (Gulaboski i sar., 2019; Babić i Peyrot, 2019). U biološkim sistemima paramagnetne vrste su

prisutne u niskim koncentracijama, a pored toga su visoko reaktivne. Stoga je otežana njihova direktna analiza primenom tehnike EPR imidžinga (Bačić i sar., 2016; Olea-Azar i sar., 2006). Sa razvojem egzogenih i bioloških kompatibilnih spinskih probi i hvatača, čiji je princip rada suprotan, omogućeno je korišćenje *in vivo* EPR imidžinga u cilju prostornog kodiranja fizioloških važnih informacija, npr. redoks statusa tkiva (Khramtsov, 2012; Bačić i sar., 2016).

U našoj studiji za dvodimenzionalni imidžing semena korišćene su spinske probe: 3CP i 3CxP, u cilju ispitivanja uticaja aflatoksina na redoks status semena kukuruza. One sadrže jedan nesporen elektron na kiseonikovom atomu koji je zaklonjen okolnim grupama, što ih čini stabilnim paramagneticima, i stoga su EPR aktivne (Mojović, 2005, Bačić i sar., 2016). Princip njihovog delovanja pre svega se zasniva na gubitku (gašenju) EPR signala pri prelasku paramagnetične vrste u dijamagnetičnu (**Slika 3.7.**), što ukazuje na prisustvo ROS (Bačić i sar., 2016; Mojović i sar., 2015; Warwar i sar., 2011).



**Slika 3.7.** Shematski prikaz jednoelektronske redukcije 3-karboksi-proksila 3CxP (paramagnetičan, tj. EPR-aktivan oblik) spinske probe u odgovarajući hidroksilamin (dijamagnetičan, tj. EPR-neaktivan oblik).

EPR merenja uzoraka su urađena na Bruker Elexsys II E540 EPR spektrometru (*BrukerBioSpin GmbH, Rheinstetten, Nemačka*) (**Slika 3.8.**). Softverski paket Bruker Xepr je iskorišćen za analizu EPR spektara. Sva merenja su izvedena na sobnoj temperaturi.



**Slika 3.8.** Bruker Elexsys II E540 EPR spektrometar (Bruker BioSpin GmbH).

U **tabeli 3.6.** prikazani su radni uslovi merenja na EPR spektrometru. Relativan broj spinova (proporcionalan površini ispod EPR signala) u analiziranim uzorcima bio je procenjen dvostrukom integracijom simuliranih EPR spektra i normiran na masu od 1 mg. Simulacije svih snimljenih EPR spektara su urađene upotrebom SpinFit (Bruker) softvera.

**Tabela 3.6.** Eksperimentalni uslovi merenja na EPR spektrometru (X-oblast).

Mikrotalasna frekvencija	9,85 GHz
Mikrotalasna snaga	10,20 mW
Modulacija frekvencije	100 kHz
Modulacija amplitude	2G
Broj akumulacija	30

Urađen je 2D EPR imidžing na ispitivanim uzorcima celih semena kukuruza koja su prethodno bila imbibovana u rastvoru spinske probe. U eksperimentu su korišćene dve aminoksil spinske probe (3-karbamoil-proksila (3CP) i 3-karboksi-proksila (3CxP)), a imidžing semena je urađen nakon 3 h od njihovog usvajanja. Pre početka snimanja, površina svakog semena je obrisana papirom za upijanje. 2D snimanja su urađena u L-oblasti frekvencija. U eksperimentu je upotrebljena zavojnica BLRG23 visoke rezolucije. Za obradu podataka korišćen je softverski program BRUKER Xepr. U **Tabeli 3.7.** dati su radni parametri snimanja 2D EPR imidžingom.

**Tabela 3.7.** Eksperimentalni parametri snimanja 2D EPR imidžinga (L-oblast).

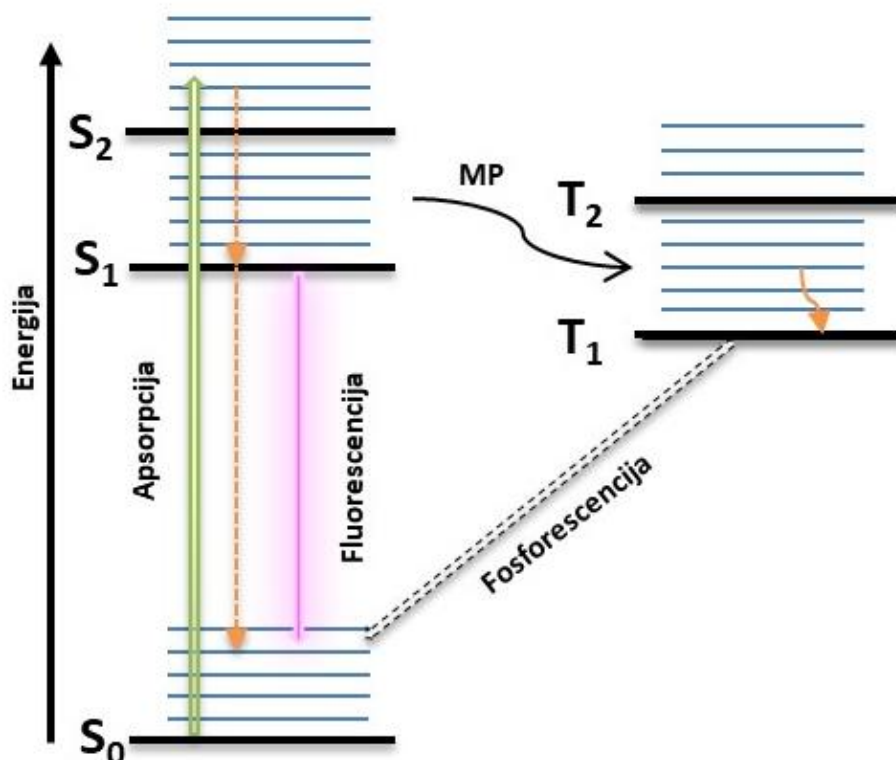
Gradijent magnetnog polja	20 G cm <sup>-1</sup>
Mikrotalasna snaga	3,6 mW
Modulacija frekvencije	30 kHz
Modulacija amplitude	2 G
Broj skeniranja za svaki pravac gradijenta	3

### 3.5. Spektrofluorimetrija

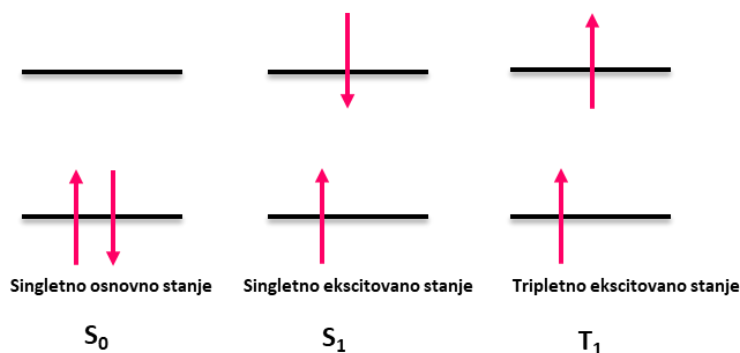
Fotoluminiscencija (PL) je najproučavanija luminiscentna pojava, pri kojoj dolazi do emisije elektromagnetnog (EM) zračenja od strane fluorofore, kao posledica apsorpcije UV-VIS zračenja. Ovaj fotofizički proces koji se događa kod fluorofora uobičajeno se prikazuje preko Jablonskog dijagrama (**Slika 3.9.**). On obuhvata radijacione i neradijacione prelaze između elektronskih ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ ,...) i vibracionih stanja molekula. Na sobnoj temperaturi, većina molekula nalazi se u osnovnom vibracionom nivou ( $v''=0$ ) osnovnog elektronskog stanja ( $S_0$ ). Apsorpcijom fotona dovoljne energije iz UV-VIS oblasti, molekul prelazi sa ovog na bilo koji vibracioni nivo pobuđenog elektronskog stanja ( $v' = 0, 1, 2...$ ). Pri prelazu, orijentacija spina elektrona ostaje nepromenjena ili se menja, što je prikazano na **slici 3.10.** Ako pri prelazu ukupan spin ostane jednak nuli, pobuđeno stanje je singletno i obeležava se  $S_1$ . Ako su spinovi pobuđenog elektrona i elektrona koji je ostao u osnovnom stanju istog znaka, ukupan spin će imati vrednost jedan. Tako nastaje tripletno pobuđeno stanje, koje se označava sa  $T_1$  (Antić-Jovanović, 2002).

Vibracionom relaksacijom ekscitovan molekul se vraća na najniži vibracioni nivo pobuđenog stanja ( $S_1$ ) i, zavisno od posmatranog sistema, dalja relaksacija se odigrava neradijacionim i/ili radijacionim procesima. Kod fluorescencije i fosforescencije dolazi do emitovanja fotona prilikom relaksacije molekula. Spektri fluorescencije nastaju spinski dozvoljenim

prelazima, između singletnih stanja ( $S_1 \rightarrow S_0$ ), a spektri fosforescencije nastaju spinski zabranjenim prelazima, između tripletnih i singletnih stanja ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) (Antić-Jovanović, 2002).



**Slika 3.9.** Shematski prikaz Jablonskog dijagrama. Oznake: debele crne linije - energetska stanja ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$  i  $T_2$ ); tanke plave linije - vibraciona stanja; pune strelice različitih boja - energetske prelazi koji uključuju fotone; narandžaste strelice - unutrašnja konverzija i vibraciona relaksacija; međusistemski prelaz (MP).



**Slika 3.10.** Shematski prikaz elektronskih stanja sa anti-paralelnim ( $S_0$  - osnovno,  $S_1$  - pobuđeno) i paralelnim spinovima ( $T_1$ -pobuđeno), a označavaju se singletnim i tripletnim stanjem, redom.

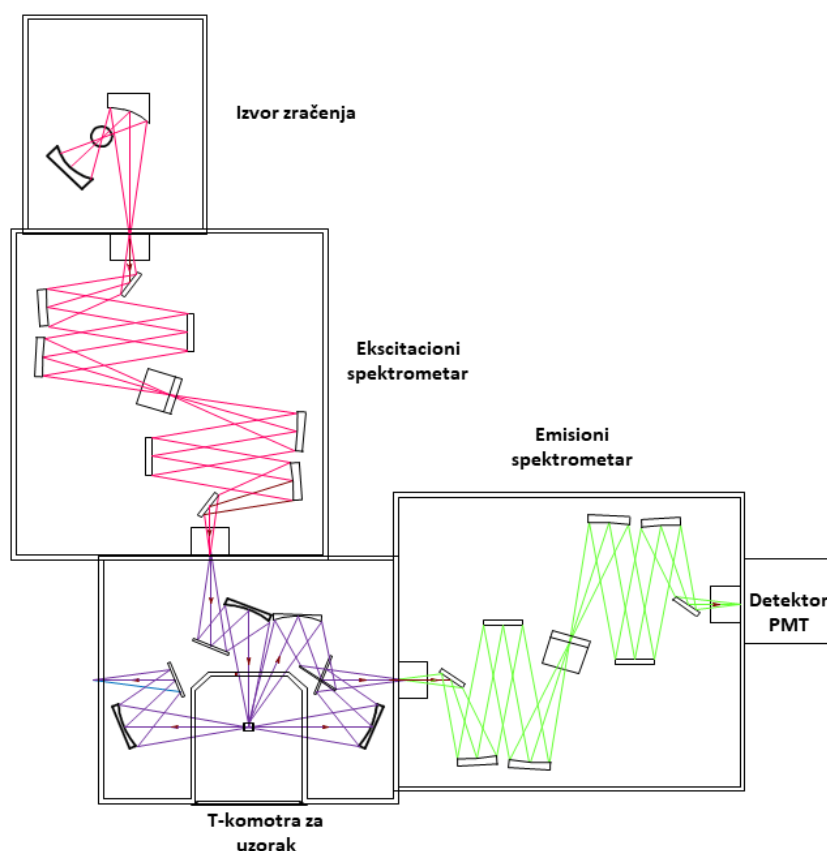
**Definicija fluorescencije** (IUPAC preporuka 2006): „spontanta emisija elektromagnetnog zračenja sa ekscitovanog molekuskog entiteta uz zadržavanje spinskog multipliciteta“ (Braslavsky, 2007).

Da bi se fluorofora pobudila potreban je određen nivo energije, što je praćeno emisijom energije koja odgovara razlici između ekscitovanog i osnovnog elektronskog singletnog stanja. Zbog gubitka energije tokom vibracione relaksacije, emitovani fluorescentni foton je uvek pomeren ka dugotalasnoj strani spektra (crveni pomeraj, niža energija), u odnosu na maksimum ekscitacionog spektra. Ovaj fenomen je poznat kao Stoksov pomeraj.



Svako elektronsko stanje sadrži nekoliko vibracionih nivoa, što ukazuje da se ekscitacija ne događa samo na jednoj talasnoj dužini, već preko distribucije talasnih dužina, koje odgovaraju karakterističnim vibracionim prelazima, tako da fluorofore imaju nezavisne i specifične spektralne ekscitacione i emisione profile svojstvene njihovim fluorescentnim karakteristikama (Antić-Jovanović, 2002; Anderson, 2008). Maksimum emisije postiže se kada fluorofora apsorbiraju svetlost talasne dužine koja odgovara maksimumu njene apsorpcije (Lakowic, 1999). Spektri fluorescencije i apsorpcije pružaju informacije o vibracionim karakteristikama, redom, osnovnog i pobuđenog stanja. Emisioni spektar prikazuje zavisnost intenziteta PL emisije u funkciji talasne dužine, pri fiksnoj ekscitacionoj talasnoj dužini ( $\lambda_{exc}$ ). Savremeni PL uređaji imaju mogućnost snimanja trodimenzionalnih (3D) spektara, odnosno ekscitaciono-emisionih matrica (engl. *excitation-emission matrices*, EEM), kao i sinhronih spektara (Christensen i sar., 2006).

Na slici 3.11. dat je shematski prikaz uređaja spektrofluorimetra Fluorolog<sup>®</sup>-3 model FL3-22. Njegove osnovne komponente su: izvor zračenja, ekscitacioni i emisioni monohromator, komora za uzorak i detektor. Kao izvor ekscitacije najčešće se koriste lampe npr. ksenonska i laseri različitih talasnih dužina. Monohromator kao optički deo uređaja ima ulogu da filtrira ulaznu svetlost, tako da izdvoji samo određenu talasnu dužinu, ekscitovanog i emitovanog zračenja. Poboljšanje performansi monohromatora u smislu njihove osetljivosti, rezolucije itd., postignuto je korišćenjem dvostrukih difrakcionih rešetaka. Postavljanje uzoraka u komoru se podešava tako da se merenja rade pod različitim uglovima. Obično se tečni, providni uzorci (čija je apsorpcija manja od 0,1) osvetljavaju pod pravim uglom (engl. *right-angle*, RA), tj. signal fluorescencije se prikuplja pod uglom od 90°C u odnosu na pravac ekscitacije. Na taj način se eliminiše reflektovano ekscitovano svetlo na putu detekcije. Za analizu debelih, čvrstih, kao i netransparentnih uzoraka, pobudna svetlost se fokusira na prednju površinu uzorka, i sa tog regiona se registruje fluorescentna emisija pod određenim uglom. Ovaj režim je poznat kao *front-face* (FF) (Anderson, 2008). Kao detektor uglavnom se koristi fotomultiplikator.



**Slika 3.11.** Shema osnovnih komponenti spektrofluorimetra Fluorolog<sup>®</sup>-3 model FL3-22. PMT-fotomultiplikatorska cev (preuzeto i modifikovano iz HORIBA JobinYvon).

Spektrofluorimetrijska merenja u okviru ove studije obuhvataju tri dela, koja se razlikuju po načinu merenja fluorescentnih spektara i njihove obrade.

Prvi deo: Za snimanje fluorescentnih emisionih i ekscitacionih spektara uzoraka, korišćen je spektrofluorimetar Fluorolog 3 (*Jobin Yvon Horiba, Pariz, Francuska*), koji je opremljen ksenonskom (Xe) lampom snage 450 W i fotomultiplikatorom. Merenja su urađena na čvrstim i usitnjenim uzorcima, bez dodavanja rastvarača. U tu svrhu korišćen je držač za čvrste uzorke Model 1933. Eksperimentalni parametri snimanja dati su u **tabeli 3.8**.

**Tabela 3.8.** Eksperimentalni parametri snimanja fluorescentnih spektara.

Ekscitacioni opseg	300 nm - 360 nm
Korak	10 nm
Emisioni opseg	350 nm – 550 nm
Korak	1 nm
Integraciono vreme	0,1 s
Konfiguracija merenja	FF ( <i>front-face</i> )
Ekscitacioni slit	5 nm
Emisioni slit	5 nm
Korekcija spektra	tamna struja

U cilju analize fluorescentnih spektara, korišćena je metoda multivarijaciona rezolucija krivih-naizmenični najmanji kvadrati (engl. *Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares*, MCR-ALS). MCR metod primenjen je na ekscitaciono-emisione matrice koje su konstruisane za svaki ispitani uzorak. Ovaj metod zahteva rad sa pravougaonim matricama, stoga je prethodno sprovedeno pre-procesiranje dobijenih podataka, ekstrapolacijom vrednosti koje nedostaju pomoću polinoma određenog tipa, a stepen polinoma je biran na bazi empirijskog poznavanja fluorescentnih podataka.

Drugi i treći deo: Za snimanje fluorescentnih spektara ispitivanih uzoraka korišćen je spektrofluorimetar FL3-221 (*Jobin Yvon Horiba, Pariz, Francuska*), opremljen sa ksenonskom (Xe) lampom 450 W, fotomultiplikatorom i softverskim paketom *FluorEssence 3,5* (*Horiba Scientific, Kyoto, Japan*). Ovaj uređaj je prikazan na **slici 3.12**. Eksperimentalni paramteri snimanja: **Tabela 3.9** i **Tabela 3.10**.



**Slika 3.12.** FL3-221 spektrofluorimetar (*Jobin Yvon Horiba, Pariz, Francuska*).

**Tabela 3.9.** Eksperimentalni parametri snimanja fluorescentnih spektara.

Ekscitacioni opseg	310 nm - 380 nm
Korak	10 nm
Emisioni opseg	360 nm – 550 nm
Korak	5 nm
Integraciono vreme	0,1 s
Konfiguracija merenja	FF ( <i>front-face</i> )
Ekscitacioni slit	2 nm
Emisioni slit	2 nm
Korekcija spektra	tamna struja

Intaktna snimanja fluorescentnih emisionih spektara sa dorzalne površine celog semena korišćenjem optičkog vlakna (efektivnog prečnika 4 mm) (**Tabela 3.10.**). Merenja su rađena u mraku.

**Tabela 3.10.** Eksperimentalni parametri snimanja fluorescentnih spektara.

Ekscitacija	340 nm
Korak	10 nm
Emisioni opseg	350 nm – 800 nm
Korak	5 nm
Integraciono vreme	0,1 s
Konfiguracija merenja	RA ( <i>right-angle</i> )
Ekscitacioni slit	2 nm
Emisioni slit	2 nm
Korekcija spektra	tamna struja

### 3.6. Statističke metode spektralne analize

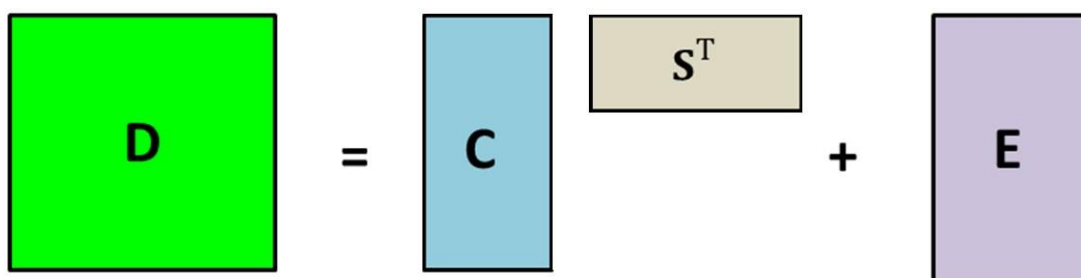
Dobijanje potpuno selektivnih signala za svaki analit od interesa u multikomponentnim sistemima je veoma složen zadatak. Kod analiza ovakvih sistema, osnovni cilj je prevođenje sirovog eksperimentalnog merenja u neku korisnu informaciju. Takvi signali dobijeni od strane nekog analitičkog uređaja, često imaju unutrašnju strukturu koja je komplikovana za analizu. Zato je potrebno da se takvi signali razlože na signale čistih komponenata (Azzouz i Tauler, 2008; Juan i Tauler, 2003; Dubrovkin, 2016).

#### 3.6.1. Multivarijaciona rezolucija krivih–naizmenični najmanji kvadrati (MCR-ALS)

MCR-ALS je metoda analize mekog modelovanja koja daje korisne hemijske informacije pomoću minimalne količine prethodno poznatih informacija u vezi sistema koji se proučava. Metode mekog modelovanja uvek podrazumevaju multivarijantnu grupu podataka (Golshan i sar., 2016). Ona daje bilinearni opis zabeležene varijacije podataka koji se drže unutar granica hemijskih domena, kroz primenu odgovarajućih ograničenja (Ruckebusch i Blanchet, 2013).

Zbog toga što je veliki broj današnjih analitičkih uređaja sposoban da kreira bilinearne setove podataka, omogućeno je njihovo uspešno povezivanje sa MCR-ALS analizama za različite analitičke i bioanalitičke primene (Kumar i Mishra, 2015).

Kao što je pomenuto, MCR-ALS algoritam se zasniva na bilinearnom modelu, koji podrazumeva da su snimljeni spektri linearna kombinacija spektara čistih komponenti u sistemu (Zhang i Tauler, 2013). Bilinearna veza između eksperimentalnih podataka, koncentracija i čistih spektralnih komponenti je pretpostavljena po analogiji strukura koje su generalizovane po Lambert-Berovom zakonu, gde su pojedinačni odgovori svakog analita ili komponente aditivni (Azzouz i Tauler, 2008). Ukupan odgovor je organizovan unutar matrice  $D$ , koja sadrži neobrađenu informaciju u vezi svih komponenti koje se nalaze u grupi podataka. Metod rezolucije prati razlaganje početne smeše podataka u matrici  $D$  na proizvod od dve matrice  $C$  i  $S^T$ , od kojih svaka uključuje čist profilni odgovor za smešu  $n$  komponenti ili obrađene komponente povezane sa pravcem reda i kolone, redom (Juan i Tauler, 2003). Grafički prikaz ovog modela dat je na slici 3.13.



Slika 3.13. Shematski prikaz razlaganja matrice  $D$  na optimalan broj njenih spektralnih  $S$  i koncentracionih  $C$  komponenti.

gde je  $D$  ( $r \times c$ ) originalna matrica podataka, tj. ekscitaciono-emisiona matrica (EEM). Oznake za fluorescentne spektre su:  $r$ , broj emisionih talasnih dužina;  $c$ , broj izmerenih spektara;  $C$  ( $r \times n$ ), matrica emisionih spektara komponenti (fluorofora čiji je broj  $n$ );  $S^T$  ( $n \times c$ ), matrica koncentracionih profila, koji predstavljaju spektre ekscitacije komponenti;  $E$  ( $r \times c$ ) matrica reziduala, odnosno preostalih varijacija u grupi podataka koje nemaju hemijski doprinos (Juan i Tauler, 2003).

Za MCR-ALS analize korišćen je program Unscambler X 10,4 softvera *Free 30-Day Trial* (Camo Analytics, Oslo, Norveška) Nenegativnost koncentracija i spektara, kao i unimodalnost (koncentracija) su primenjeni kao ograničenja u procesu MCR-ALS optimizacije.

### 3.6.2. Dekonvolucija fluorescentnih spektara pomoću log-normal modela

Fluorescentna snimanja ispitivanih uzoraka urađena su prema opisu u *eksperimentalnom delu II*, poglavlja 3,5. Za svaku talasnu dužinu ekscitacije, odgovarajući emisioni spektar je bio dekonvoluiran na različit broj log-normal komponenti, u cilju pronalaženja optimalnog broja komponenti u integralnom spektru, a koji odgovara broju različitih fluorofora u uzorku. Pokazano je da je taj broj četiri; stoga je primenjen četvoro-komponentni model za dalju analizu emisionih spektara (Kalauzi i sar., 2007). Zatim je urađeno nelinearno fitovanje svih PL spektara za određeni uzorak pomoću Nelder-Meadovog simpleks algoritma (Matlab 6,5). Pozicije svih komponenti su plotovane kao funkcija talasne dužine ekscitacije. Pokazana je visoka stabilnost sa variranjem talasnih dužina ekscitacije, što ukazuje da su u pitanju fluorofore, a ne artefakti.

### 3.6.3. Analiza glavnih komponenti (PCA) i linearna diskriminaciona analiza (LDA)

Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), pripada grupi multivarijacionih tehnika, koja redukuje dimenzionalnost seta podataka, uz odbacivanje suvišnih informacija. Na ovaj način omogućena je grafička vizuelizacija i grupisanje uzoraka na osnovu sličnosti. Ona je sprovedena na korelacionoj matrici. Zasniva se na linearnoj dekompoziciji originalnih podataka u novi set glavnih komponenti. Latentne varijable, tzv. glavne komponente, nisu u korelaciji jedna sa drugom, a njihovi vektori su odabrani tako da predstavljaju strukturu

originalnih podataka na optimalan način. Redukcija dimenzionalnosti se dobija dekompozicijom ulazne matrice sa centriranim podacima ( $X_c$ ) na dve matrice: matricu skorova T i matricu latentnih varijabli (*loading*) P. Matematički model može se specificirati na sledeći način (3.3):

$$X_c = TP^T + E \quad (3.3)$$

Latentne varijable P sadrže vektore koji determinišu pravac svake glavne komponente i predstavljaju ose vektorskog podprostora na koje se projektuju objekti. Pravac prvog vektora se bira tako da njegovi skorovi imaju maksimalnu varijansu. Svaki sledeći vektor usmeren je tako da je ortogonalan svim prethodnim vektorima, tako da apsorbuje maksimalnu količinu preostale varijacije. E je matrica reziduala.

Linearna diskriminaciona analiza (engl. *Linear Discrimination Analysis*, LDA) je primenjena na fluorescentne spektre, kako bismo ispitali diskriminaciju uzoraka u dve grupe: kontrola (semena bez aflatoksina) i semena kontaminiranih aflatoksinom. Prva grupa sadržala je 46 uzoraka, od kojih je 35 nekontaminiranih i 11 kontaminiranih; ona je iskorišćena za obuku (trening) klasifikatora. Druga grupa je bila upotrebljena za testiranje klasifikatora, a sadržala je ukupno 15 uzoraka, od kojih je 10 bilo nekontaminirano i 5 kontaminirano. Za klasifikaciju semena u jednu od postojećih grupa, nekontaminirana i aflatoksinom kontaminirana, primenjena je LDA na skorovima koji su dobijeni metodom glavnih komponenti. Naime, LDA predstavlja metod nadgledane klasifikacije koja se koristi za definisanje pravila klasifikacije u unapred definisane klase. Pravila definisana na ovaj način mogu da se iskoriste za klasifikaciju novih uzoraka čija pripadnost određenoj klasi nije poznata. Pored toga, ovaj metod daje informacije o tome koje varijable imaju najveći doprinos razdvajanju uzoraka u unapred definisane grupe. Metoda je zasnovana na formiranju linearnih kombinacija originalnih varijabli, koje omogućavaju klasifikaciju u unapred definisane grupe, uz minimiziranje verovatnoće pogrešne klasifikacije. Minimiziranje ove verovatnoće podrazumeva maksimiziranje relativnog odnosa varijanse između i unutar grupa. Kako je uslov za primenu LDA da broj uzoraka bude veći od broja varijabli, što u našem slučaju nije ispunjeno, bilo je potrebno smanjiti dimenzionalnost vektorskog prostora. Ova redukcija je izvedena metodom glavnih komponenti, a projekcije uzoraka na redukovani vektorski prostor (skorovi) korišćene su kao ulaz za LDA. U matičnom zapisu, PCA model je predstavljen izrazom 3.3. Linearna diskriminaciona funkcija zapisuje se na sledeći način:

$$y_i = a^T t_i \quad (3.4)$$

gde je  $y_i$  diskriminacioni skor  $i$ -tog uzorka, a je vektor koeficijenata linearne kombinacije koji je izabran da maksimizira relativni odnos varijacija između i unutar grupa, dok je  $t_i$  vektor skorova zadržanih glavnih komponenti  $i$ -tog uzorka. Metoda unakrsne validacije je korišćena za procenu pouzdanosti LDA klasifikatora i uključuje podelu seta podataka na trening- i test-set.

### 3.7. Statistička analiza podataka

Statistička analiza eksperimentalnih podataka je obavljena pomoću softverskog programa IBM SPSS Statistics 25,0 *Trial for students* (Armonk, NY, IBM Corp. 2017 SAD). Za PCA je korišćen softverski program XLSTAT *14-Day free trial* (Addinsoft Inc, NY, SAD), radi vizuelizacije i proučavanja korelacije analiziranih parametara (npr. sadržaja elemenata, pojedinačnih fenola), kao i sličnosti pojedinih uzoraka različitih nivoa kontaminacije aflatoksinom. Program Matlab R2018b *Free 30-day Trial* (Mathworks, Natick, Massachusetts, SAD) je primenjen za dobijanje klastergrama (toplotnih mapa sa pripadajućim dendrogramima). Za pravljenje grafika korišćeni su Microsoft Excell 2013 i Origin Pro 8,0 (Massachusetts, USA) softveri. Za crtanje hemijskih formula, kao i računanje tačne mase jedinjenja od interesa, primenjen je ChemBioDraw (12,0) softverski program.

Rezultati dobijeni iz merenja TPC i TAA su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška od tri ponavljanja. Za procenu statističke značajnosti korišćen je neparametrijski Man-Vitni (engl. *Mann-Whitney*) test ( $p < 0,05$ ).

Za procenu uticaja koncentracije aflatoksina na sadržaj različitih parametara (sadržaj lignina, slobodnih radikala, pojedinih fenolnih jedinjenja i elemenata) je primenjena dvofaktorska analiza varijanse, sa balansiranim dizajnom prema modelu:  $X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , gde je  $X_{ijk}$  nivo lignin/FR-a u  $i$ -toj frakciji,  $j$ -toj koncentraciji AFB<sub>1</sub> i  $k$ -tom ponavljanju.  $\mu$  je ukupna srednja vrednost,  $\alpha_i$  je efekat  $i$ -te frakcije,  $\beta_j$  je efekat  $j$ -te koncentracije,  $(\alpha\beta)_{ij}$  je interakcijski efekat između  $i$ -te frakcije i  $j$ -te koncentracije, dok  $\varepsilon_{ijk}$  su slučajne greške, normalno distribuirane sa nultim prosekom i jednakim varijansama. Za naknadna poređenja korišćen je Dankanov test. Sva testiranja su sprovedena na 5% nivou značajnosti.

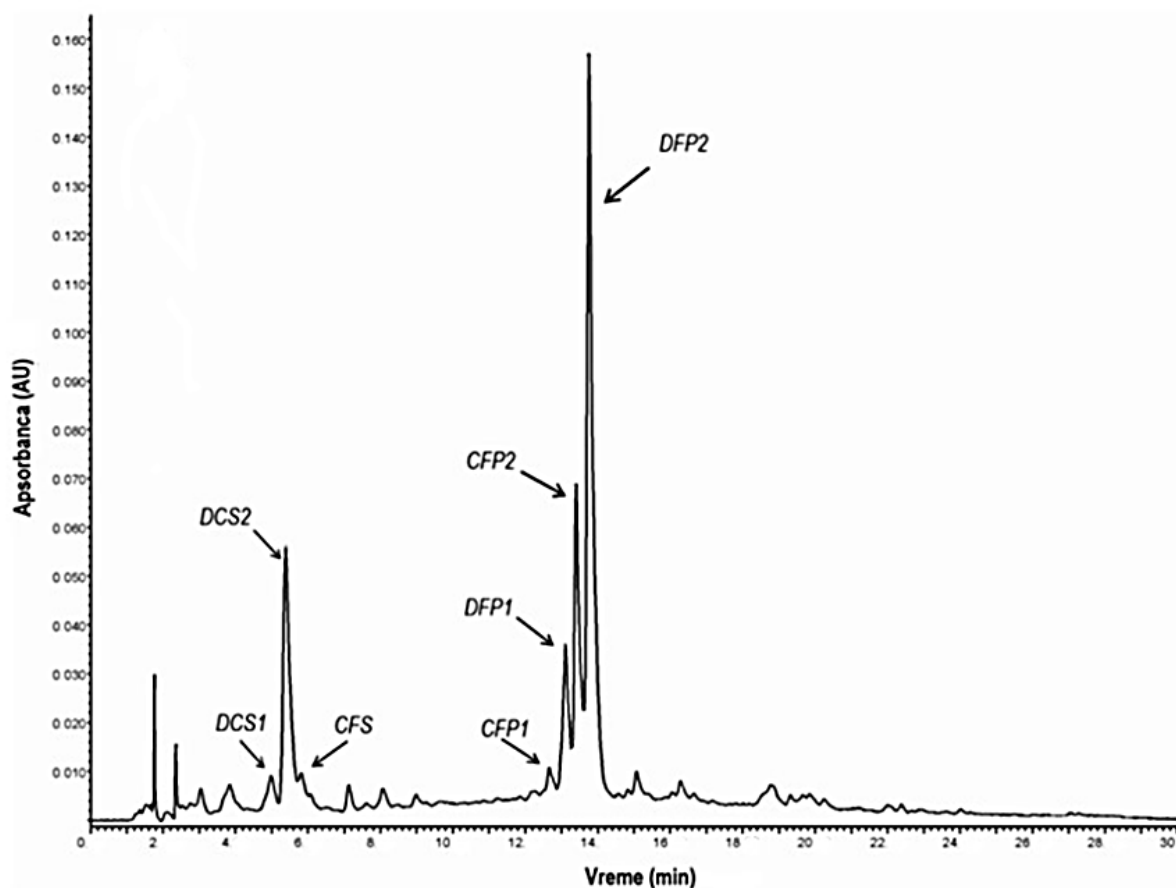
## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Ispitivanje fenolnog profila i sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u uzorcima semena kukuruza (*Zea mays* L.) koja sadrže različitu koncentraciju aflatokisna

U okviru ove doktorske disertacije praćene su moguće razlike u fenolnim profilima, kao i koncentraciji odabranih jedinjenja fenolnog tipa, između kontrolnih semena (bez aflatokisna) i onih sa različitim sadržajem AFB<sub>1</sub>. Kvalitativna analiza fenolnog profila metanolnih ekstrakata i hidrolizata ispitivanih semena urađena je pomoću *RP-HPLC-DAD-ESI-MS* i *UHPLC-LTQ-OrbiTrapXL-MS*, a kvantitativna analiza za odabrana fenolna jedinjenja primenom *RP-HPLC-DAD-ESI-MS*.

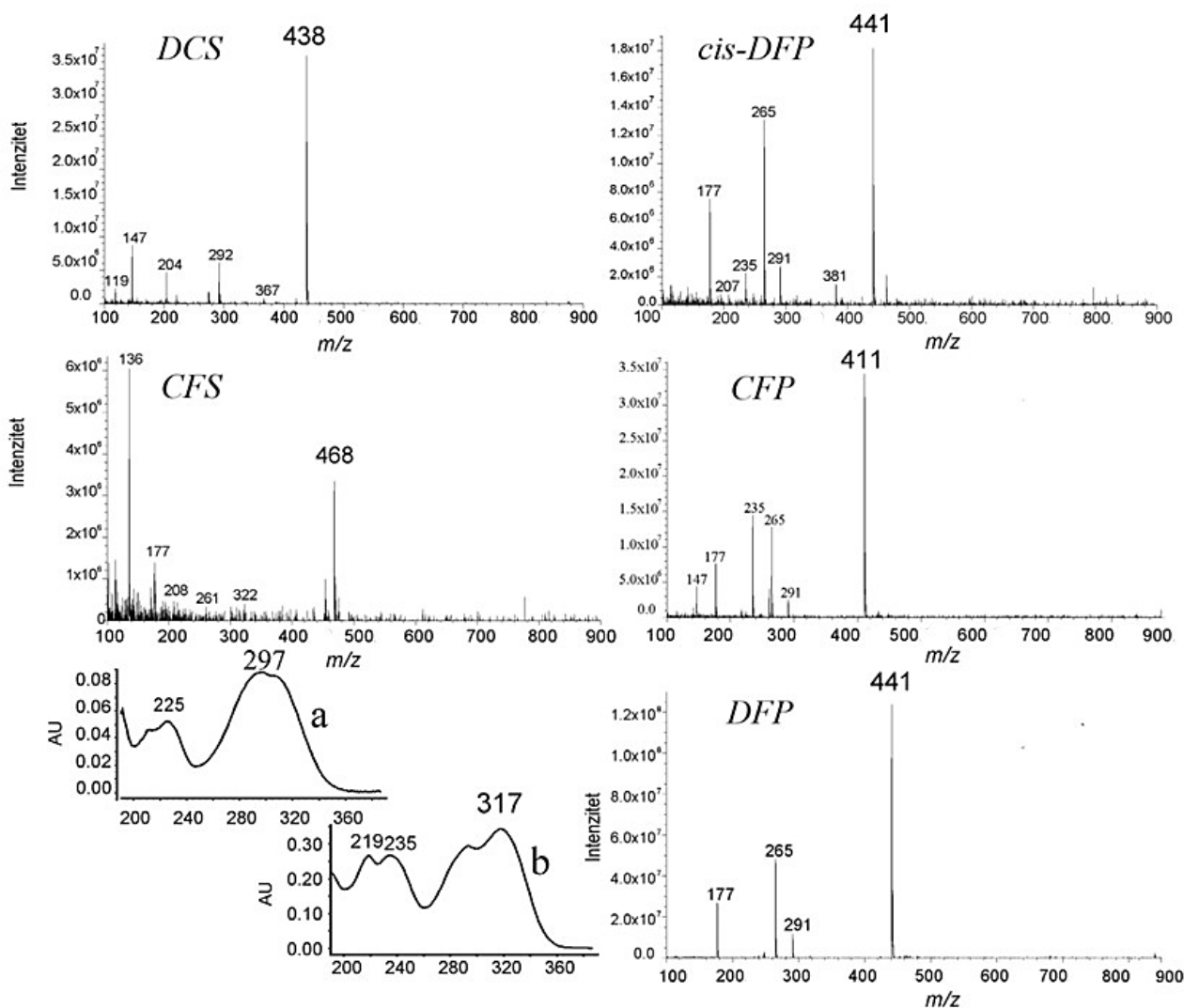
#### 4.1.1. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima

Na slici 4.1. dat je reprezentativni hromatogram dobijen *HPLC-DAD* analizom metanolnog ekstrakta ispitivanog uzorka semena.



**Slika 4.1.** Reprezentativni hromatogram *HPLC-DAD* analize metanolnih ekstrakata uzorka semena ( $\lambda_{\max} = 310$  nm). Pikovi su označeni sa skraćenicama identifikovanih fenolnih jedinjenja. Oznake: *DCS1* i *DCS2*, di-*p*-kumaroilspemidin i njegov izomer; *CFS*, *N*-kumaroil-*N*-feruloilspemidin; *CFP1* i *CFP2*, kumaroil-feruloilputrescin i njegov izomer; *DFP1* i *DFP2*, *cis*-diferuloilputrescin i njegov izomer.

Maseni spektri detektovanih konjugata poliamina dobijeni *ESI-MS* tehnikom u pozitivnom jonizacionom modu,  $[M+H]^+$ , prikazani su na **slici 4.2**. Jedinjenje koje ima molekulski jon na  $m/z$  438  $[M+H]^+$  i fragmentacione jone  $MS^2$  na  $m/z$  119, 147, 204, 292, 367 identifikovano je kao di-*p*-kumaroilspermidin (*DCS*) (Werner i sar., 1995). Jedinjenje sa molekulskim jonom na  $m/z$  468  $[M+H]^+$  i fragmentacionim jonima  $MS^2$  na  $m/z$  377, 224, 177, 149, 136 tentativno odgovara *N*-kumaroil-*N*-feruloilspermidinu (*CFS*) (Dong i sar., 2015; Li i sar., 2018). Od konjugata putrescina su detektovani *N-p*-kumaroil-*N'*-feruloilputrescin i njegov izomer (*CFP2*, *CFP1*) na  $m/z$  411  $[M+H]^+$ , kao i *cis*-diferuloilputrescin i njegov izomer (*cis-DFP*, *DFP*) na  $m/z$  441  $[M+H]^+$  (Moreau i sar., 2001; Kim i sar., 2012). Fragmenti u masenom spektru na  $m/z$  147 i  $m/z$  177  $[M+H]^+$  utvrđeno je da potiču redno od kumaroil i feruloil ostataka.



**Slika 4.2.** Reprezentativni maseni spektri glavnih konjugata poliamina u metanolnim ekstraktima ispitivanih semena. Na isečku slike su prikazani karakteristični UV spektri (a) kumaroil i (b) feruloil derivata. Oznake: *DCS*, di-*p*-kumaroilspermidin; *CFS*, *N*-kumaroil-*N*-feruloilspermidin; *CFP*, kumaroil-feruloilputrescin; *DFP*, diferuloilputrescin.

Elucioni pikovi različitog intenziteta, sa apsorpcionim maksimumom na 297 nm (**slika 4.2, isečak a**) i 317 nm (**slika 4.2, isečak b**), a koji redno odgovaraju kumaroil i feruloil derivatima. Dobijeni UV spektri su karakteristični za hidroksicinamične kisele amide, kao i apsorpcioni maksimumi *DFP* i *CFP* koji se nalaze na oko 320 nm (Elejade-Palmett i sar., 2014; Moreau i sar., 2001).



U **tabeli 4.1.** dati su fenolni profili metanolnih ekstrakata ispitivanih uzoraka semena dobijenih *UHPLC* sistemom povezanog sa *LTQ-OrbiTrap-MS*. U tabeli, prikazani su nazivi identifikovanih jedinjenja (ili njihove skraćenice), retencionna vremena ( $t_R$ , min), izračunate i tačne mase deprotonovanih molekula ( $[M-H]^-$ ,  $m/z$ ), srednje odstupanje masa (tj. greška masa) (ppm), kao i njihovi osnovni joni  $MS^2$  i fragmentacioni joni  $MS^3$  i  $MS^4$ .

Identifikovano je ukupno petnaest različitih fenolnih jedinjenja. Među njima su slobodne fenolne kiseline i različiti tipovi konjugata poliamina, glicerola i flavonoidnih glikozida. Osnovni pik na  $m/z$  193  $[M-H]^-$  odgovara ferulinskoj (*FA*), a na  $m/z$  163  $[M-H]^-$  *p*-kumarinskoj (*p-CA*) kiselini (Bento-Silva i sar., 2020). Prisustvo slobodnih fenolnih kiselina u manjim količinama u metanolnim ekstraktima semena kukuruza ranije je pokazana u literaturi (Bento-Silva i sar., 2020). Može se uočiti da većina detektovanih konjugata poliamina pripada hidrokscinimačnim kiselim amidima (**Tabela 4.1.**). *OrbiTrap MS* analize u negativnom jonizacionom modu, potvrdile su prisustvo ranije identifikovanih jedinjenja dobijenih *MS* analizom u pozitivnom jonizacionom modu (**Slika 4.2.**), a kojima je utvrđeno prisustvo različitih konjugata spermidina i putrescina. Pored toga, pronađena su jedinjenja sa molekulskim jonom na  $m/z$  305  $[M-H]^-$  i  $m/z$  335  $[M-H]^-$  koja odgovaraju arilmonoaminima *N-p*-kumaroiltriptaminu i feruloiltriptaminu, redom. Detektovan deprotonovan jon na  $m/z$  253  $[M-H]^-$  potiče od kafeoilglicerola, dok deprotonovan jon na  $m/z$  237  $[M-H]^-$  potiče od *p*-kumaroilglicerola (Kang i sar., 2016).

Od flavonoidnih glikozida pronađeni su derivati apigenina i tricina. Pik na  $m/z$  593 odgovara apigenin-6,8-di-*C*-heksozidu (vicenin-II), a na  $m/z$  563 apigenin-6-*C*-heksozid-8-*C*-pentozidu (Wang i sar., 2019). Deprotonovani jon tricin-7-*O*-glukozida utvrđen je na  $m/z$  491 (Kang i sar., 2016). Naime, njegovo prisustvo je pokazano samo u spoljašnjoj frakciji kod semena sa visokim sadržajem aflatoksina, što može biti u vezi sa procesom lignifikacije (Lan i sar., 2015; Li i sar., 2016) koji predstavlja jedan od mehanizama zaštite od stresa.

**Tabela 4.1.** Identifikovana fenolna jedinjenja u metanolnim ekstraktima unutrašnje i spoljašnje frakcije ispitivanih *Zea mays* L. semena pomoću *UHPLC-LTQ OrbiTrapXL-MS*.

Naziv jedinjenja	$t_R$ (min)	Izračunata masa [M-H] <sup>-</sup>	Nađena masa [M-H] <sup>-</sup>	Srednje odstupanje masa (ppm)	MS <sup>2</sup> Fragmenti, (% Osnovni pik)	MS <sup>3</sup> Fragmenti, (% Osnovni pik)	MS <sup>4</sup> Fragmenti, (% Osnovni pik)
<b>Limunska kiselina</b>	2,54	191,01973	191,01746	2,26	111(58), 112(4), 145(18), 146(4), <b>147</b> (100), 148(6), 173(17)	<b>103</b> (100)	<b>59</b> (100), 195(3)
<b>Apigenin-6,8-di-C-heksozid</b>	7,26	593,15119	593,15119	6,11	353(41), 354(8), 383(23), <b>473</b> (100), 474(26), 503(29), 575(9)	<b>353</b> (100), 354 (17), 383 (20)	189(3), 297(44), <b>325</b> (100),326(6), 335(5)
<b>N-kafeoil-N'-p-kumaroilspemidin</b>	7,59	452,21909	452,21377	5,32	135(5), 306(17), 307(3), 316(11), <b>332</b> (100), 333(20), 405(3)	217 (3), <b>289</b> (100), 290 (15)	159(14),162(11),175(3) <b>218</b> (100), 247(15)
<b>Kafeoilglicerol</b>	7,59	253,07176	253,06915	2,61	<b>135</b> (100), 136(9), 161(59), 162(4), 179(40), 180(5), 207(3)	<b>107</b> (100), 108 (74), 117 (76)	–
<b>Apigenin-6-C-heksozid-8-C-pentozid</b>	7,65	563,14063	563,13499	5,64	353(35), 383(27), <b>443</b> (100), 444(24), 473(63), 474(15), 545(14)	<b>353</b> (100), 354 (17), 383 (25), 384 (5), 425(4)	297(56), <b>325</b> (100), 326(7)
<b>N, N'-di-p-kumaroilspemidin</b>	7,96	436,22418	436,21885	5,33	145(4), 290(3), <b>316</b> (100), 317(17)	145(8), 273(5), <b>273</b> (100)	145(8), 159(21), 201(12), <b>202</b> (100), 231(19)

<b><i>N-p</i>-kumaroill-<i>N'</i>-feruloilspermidin</b>	8,09	466,23474	466,22940	5,34	316(33), 320(14), 322(32), 331(14), <b>346</b> (100), 347(33), 348(23)	161(4), 288(6), 303(14), <b>331</b> (100)	161(70), 219(21), 231(21), 275(31), <b>288</b> (100)
<b><i>p</i>-kumaroilglicerol</b>	8,34	237,07685	237,07431	2,54	<b>119</b> (100), 120(11), 145(37), 146(32), 163(44), 164(5), 191(5)	–	–
<b>Tricin 7-<i>O</i>-glukozid</b>	8,70	491,11950	491,11332	6,18	314(3), <b>329</b> (100), 330(18)	299(7), <b>314</b> (100), 315(14)	285(10), <b>299</b> (100), 300(6)
<b><i>p</i>-kumarinska kiselina</b>	8,74	163,04007	163,03836	1,71	<b>119</b> (100)	91(8), 92(20), <b>119</b> (100)	–
<b><i>N,N'</i>-di-<i>p</i>-kumaroilputrescin</b>	9,95	379,16633	379,16177	4,56	119(3), <b>259</b> (100), 260(11)	<b>119</b> (100), 145(3), 215(11), 216(32)	91(55), <b>93</b> (100)
<b><i>N-p</i>-kumaroil-<i>N'</i>-feruloilputrescin</b>	10,07	409,17690	409,17183	5,07	135(30), 259(59), 260(7), <b>289</b> (100), 290(13)	134(11), 149(39), 245(3), 246(8), <b>274</b> (100)	176(5), 186(6), 204(5), 229(51), <b>230</b> (100)
<b><i>N,N'</i>-diferuloilputrescin</b>	10,23	439,18746	439,18184	5,62	135(13), 149(5), 274(3), <b>289</b> (100), 290(16)	134(12), 149(38), 246(8), <b>274</b> (100)	186(5), 204(7), 229(49), <b>230</b> (100), 231(11)
<b><i>N-p</i>-kumaroiltriptamin</b>	11,96	305,12955	305,12642	3,13	117(5), <b>119</b> (100), 120(9), 145(68), 146(6), 157(9), 159(16)	<b>119</b> (100)	–

---

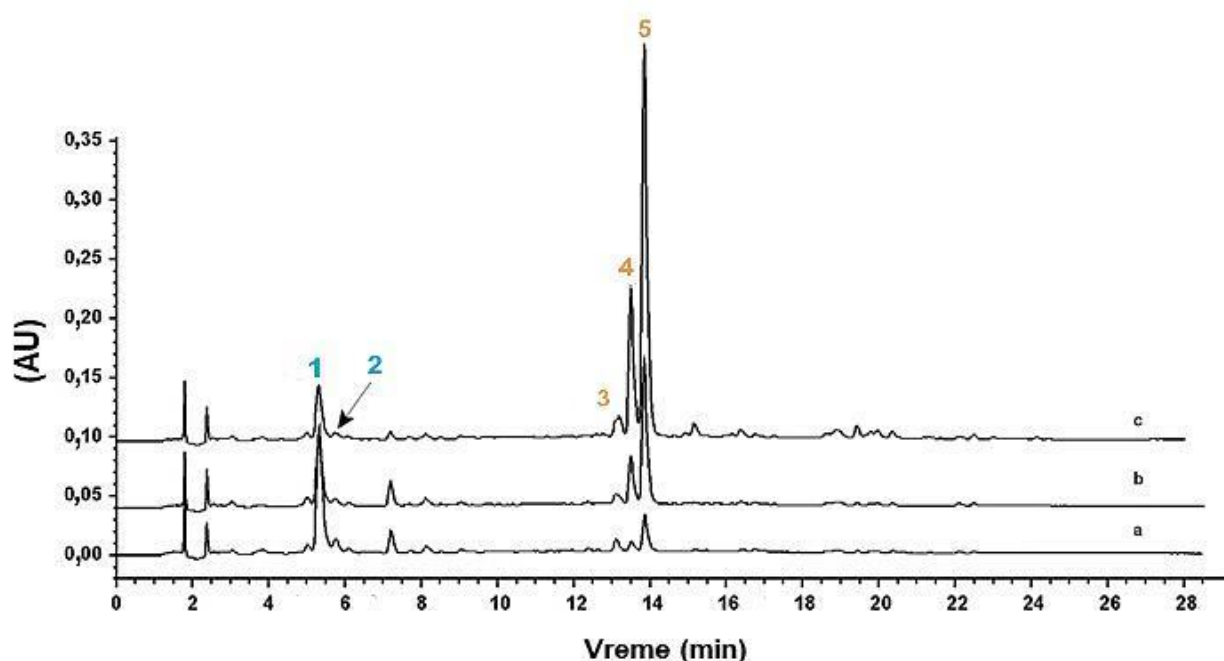
<b><i>N</i>-feruloiltriptamin</b>	12,11	335,14012	335,13601	4,11	134(18), 135(30), 149(39), 175(24), 178(17), <b>320</b> (100), 321(17)	148(60), 156(27), <b>178</b> (100), 191(23), 262(21), 276(28)	<b>135</b> (100), 136(12), 160(7)
-----------------------------------	-------	-----------	-----------	------	---	---	--------------------------------------

---

**Skraćenice:**  $t_R$ , retenciono vreme; srednje odstupanje masa u ppm.

#### 4.1.1.1. Analiza sadržaja odabranih konjugata poliamina u metanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka semena

Ispitan je sadržaj i odnos odabranih konjugata poliamina u odnosu na nivo kontaminacije semena kukuruza AFB<sub>1</sub>. Preklopljeni reprezentativni *HPLC-DAD* hromatogrami metanolnih ekstrakata ispitivanih uzoraka semena različitog nivoa kontaminacije su dati na **slici 4.3**.



**Slika 4.3.** Preklopljeni reprezentativni hromatogrami *HPLC-DAD* analize metanolnih ekstrakata uzoraka semena koncentracije AFB<sub>1</sub> (a) 6,75 µg kg<sup>-1</sup>, (b) 51,51 µg kg<sup>-1</sup> i (c) 308,13 µg kg<sup>-1</sup>. Pikovi označeni sa brojevima 1 do 5 odgovaraju redom skraćenicama identifikovanih jedinjenja *DCS*, *CFS*, *cis-DFP*, *CFP*, *DFP*.

Na **slici 4.4.** prikazana je promena sadržaja (eq µg g<sup>-1</sup> DW) odabranih konjugata poliamina, *DCS*, *CFS*, *cis-DFP*, *CFP*, *DFP*, u odnosu na koncentraciju AFB<sub>1</sub> u semenu. Promena u sadržaju pojedinih konjugata poliamina, izražena u odgovarajućim ekvivalentima mikrograma *p-CA* i *FA* po gramu (g) suve mase (DW) uzorka (eq µg g<sup>-1</sup> DW), u metanolnim ekstraktima ispitivanih semena sa različitim koncentracijama AFB<sub>1</sub>. Sa povećanjem koncentracije AFB<sub>1</sub> dolazi do smanjenja sadržaja konjugata spermidina, što je najviše uočeno za jedinjenje dikumaroilspermidin (*DCS*). U literaturi je pokazano da konjugati spermidina imaju antioksidativnu i antifungalnu aktivnost (Walters i sar., 2001).

S druge strane, može se uočiti povećanje sadržaja identifikovanih konjugata putrescina (*CFP* i *DFP*) sa povećanjem nivoa kontaminacije. Pokazano je da ova jedinjenja pružaju zaštitu semenom omotaču (Moreau i sar., 2001), kao i da imaju inhibitorni efekat na biosintezu aflatoksina kod gljive *A. flavus* (Mellon i Moreau, 2004). Poznato je da pojedini konjugati putrescina imaju antiradikalnu ulogu, kao i da su dobri hvatači („skevindžeri“) slobodnih radikala poput superoksid anjon i hidrosilnog radikala (Choi i sar., 2007).

Nadalje, definisan je odnos suma identifikovanih oblika konjugata putrescina i konjugata spermidina (P/S), na osnovu sledećeg izraza (4.1.):

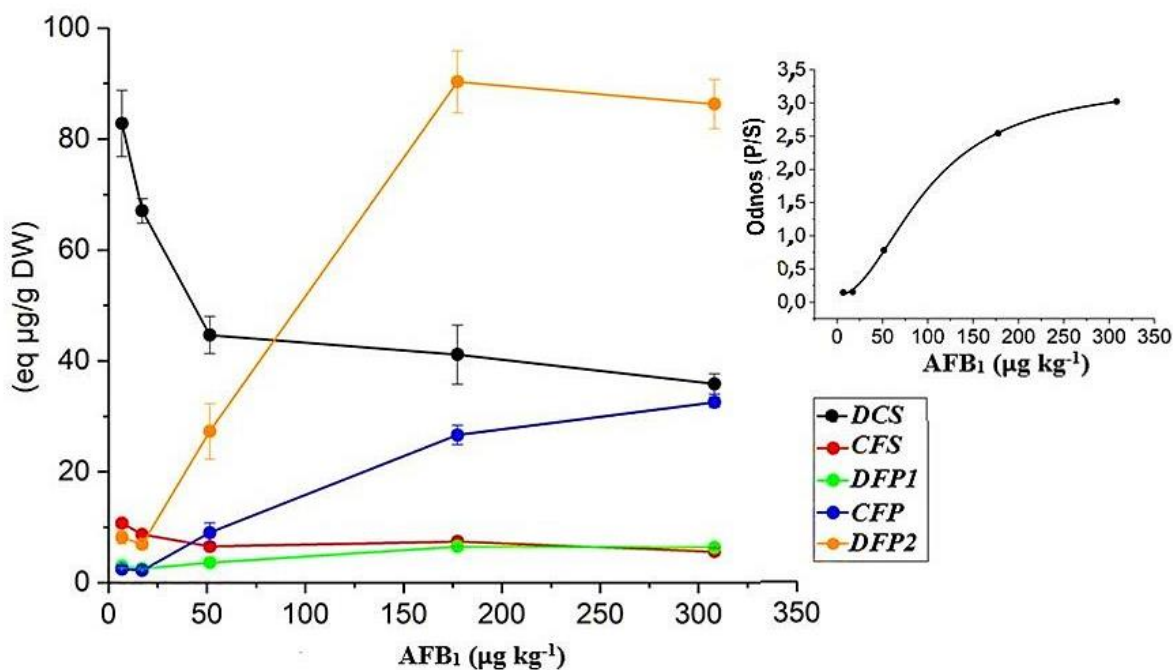
$$P/S = \frac{DFP + CFP + \text{izomer DFP}}{DCS + CFS} \quad (4.1.)$$

Proučena je zavisnost P/S od koncentracije AFB<sub>1</sub> (isečak **slike 4.4.**). Dobijeni rezultati fitovanja ( $R^2 = 0,9987$ ) podataka pokazuju sigmoidalni oblik krive. Na osnovu modela Logističke jednačine (4.2.):

$$y = a_2 + (a_1 - a_2)/(1 + (x + x_0)^p) \quad (4.2.)$$

dobijeni su sledeći parametri:  $a_1 = 0,1$ ;  $a_2 = 3,3$ ;  $x_0 = 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $p = 2$ . Naime, oznake  $a_1$  i  $a_2$  definišu izmerenu promenu za najvišu i najnižu koncentraciju AFB<sub>1</sub>. Parametar  $x_0$  označava koncentraciju kontaminanta pri kojoj se indukuje 50 % maksimalnog odgovora, dok  $p$  predstavlja nagib u prevojnoj tački sigmoidalne krive.

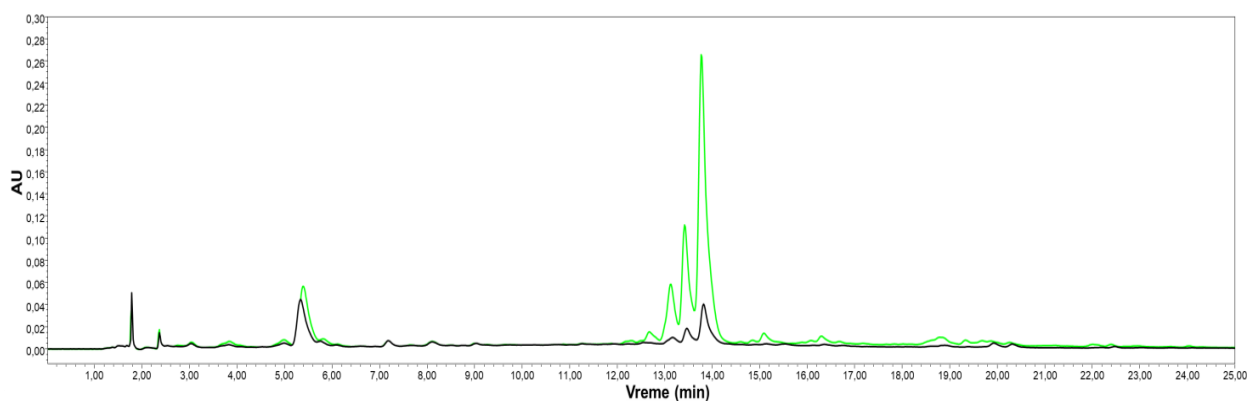
Dobijeni rezultati pokazuju da postoji dozno-zavisna veza između analiziranog odnosa P/S i povećanja koncentracije AFB<sub>1</sub>, u opsegu od  $6,75 \mu\text{g kg}^{-1}$  do  $51,51 \mu\text{g kg}^{-1}$  i u opsegu od  $177,42 \mu\text{g kg}^{-1}$  do  $308,13 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Može se uočiti dvofazni odgovor semena kukuruza u odnosu na povećanje nivoa kontaminacije, koji obuhvata indukciju akumulacije konjugata poliamina i varijacije u njihovom odnosu. Prema literaturnim podacima, odnos između putrescina i spermidina predstavlja biomarker regenerativnog kapaciteta biljke (Shoeb i sar., 2001). Ovaj odnos se smatra fundamentalnim u smislu definisanja otpornosti biljke na dejstvo različitih faktora iz okruženja (Bassard i sar., 2010). Takođe, ranije je utvrđeno da dolazi do povećanja u sadržaju slobodnih i konjugovanih poliamina (posebno konjugata putrescina) kod biljnih tumora izazvanih gljivom *Ustilago maydis* (Rodríguez-Kessler i sar., 2008).



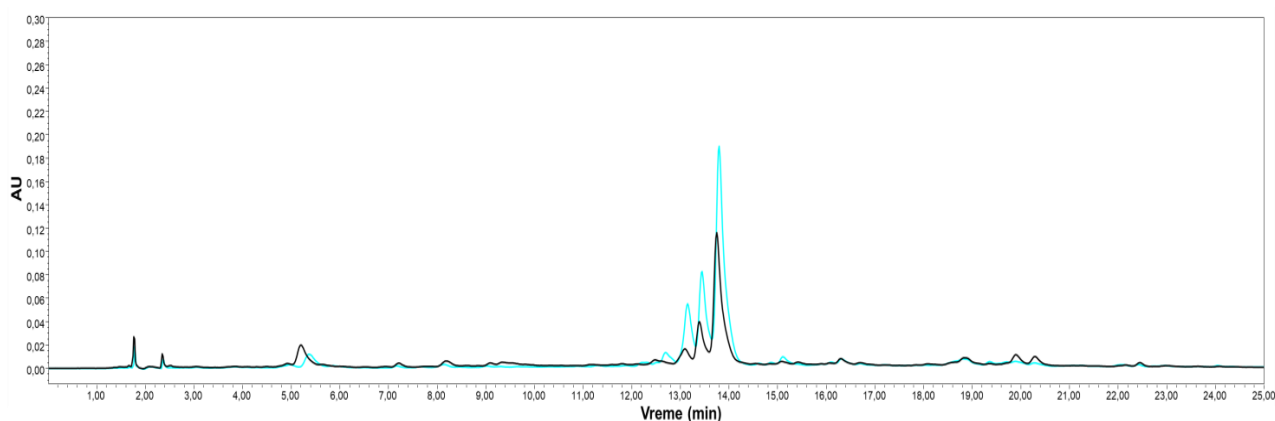
**Slika 4.4.** Promena u sadržaju pojedinih konjugata poliamina, izražena u odgovarajućim ekvivalentima mikrograma *p*-CA i FA po gramu (g) suve mase (DW) uzorka ( $\text{eq } \mu\text{g g}^{-1} \text{ DW}$ ), u metanolnim ekstraktima ispitivanih semena sa različitim koncentracijama AFB<sub>1</sub>. Isečak prikazuje odnos suma identifikovanih tipova konjugata putrescina u odnosu na zbir konjugata spermidina P/S u zavisnosti od koncentracije AFB<sub>1</sub> ( $R^2 = 0,9987$ ).

#### 4.1.1.2. Analiza sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima frakcija ispitivanih semena

Ispitana je promena u sadržaju pojedinih fenolnih jedinjenja u unutrašnjoj i spoljašnjoj frakciji semena različitog nivoa kontaminacije AFB<sub>1</sub> (Tabela 4.2.). Na slici 4.5. i slici 4.6. dati su preklopljeni reprezentativni hromatogrami dobijeni HPLC-DAD analizom metanolnih ekstrakata unutrašnje i spoljašnje frakcije ispitivanih uzoraka semena. Na dobijenim hromatogramima se jasno uočavaju razlike u intenzitetu pikova koji potiču od konjugata spermidina i putrescina.



**Slika 4.5.** Reprezentativni hromatogrami HPLC-DAD analize metanolnih ekstrakata unutrašnje frakcije kontrolnih (crna linija) i visoko-kontaminiranih (308,13 µg kg<sup>-1</sup>) (zelena linija) semena.



**Slika 4.6.** Reprezentativni hromatogrami HPLC-DAD analize metanolnih ekstrakata spoljašnje frakcije kontrolnih (crna linija) i visoko-kontaminiranih (308,13 µg kg<sup>-1</sup>) (plava linija) semena.

**Tabela 4.2.** Sadržaj identifikovanih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima *Zea mays* L. semena kod unutrašnje (UF) i spoljašnje frakcije (SF) ( $\mu\text{g g}^{-1}$  DW uzorka).

	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b><i>p</i>-CA</b>	<b>FA</b>	<b>DFPI</b>	<b>DFP2</b>	<b>FT</b>	<b>DCS1</b>	<b>DCS2</b>	<b>CFS</b>	<b>CFPI</b>	<b>CFP2</b>	<b>CT</b>
UF	Kontrola	5,80±0,38	4,09±0,07	12,13±1,99	53,03±4,45	6,31±0,57	6,00±0,26	47,77±3,56	6,38±0,3	3,25±1,04	14,08±1,64	5,06±0,32
	6,75	6,02±0,55	4,44±0,31	14,14±0,09	39,51±4,14	3,84±0,26	11,35±0,17	105,03±3,25	11,99±2,38	2,50±0,12	6,24±0	3,10±0,01
	17,07	5,85±0,69	4,27±0,09	13,69±2,77	31,13±1,95	3,63±0,03	11,40±1,28	92,99±1,43	12,38±0,33	2,10±0,45	6,71±0,53	2,40±0,39
	51,51	5,02±0,03	4,38±0,14	16,17±0,98	47,73±0,07	2,80±0,06	9,07±0,37	34,93±1,63	5,63±0,21	3,32±0,31	11,25±0,13	1,82±0,01
	61,00	4,63±0,36	3,63±0,03	13,05±2,06	32,75±0,78	4,22±0,15	6,87±0,57	30,9±0,44	4,00±0,76	3,01±0,61	10,60±2,43	2,78±0,07
	105,00	4,73±0,16	3,28±0,13	43,81±2,57	138,28±11,65	4,71±0,17	5,43±0,15	29,64±0,05	3,44±0,27	8,56±0,03	32,11±1,68	3,79±0,02
	151,94	7,00±0,04	3,3±0,42	23,11±1,74	87,70±11,92	2,90±0,04	9,75±0,01	72,36±0,13	9,21±0,66	5,66±0,22	24,86±2,8	3,63±1,4
	177,42	3,53±0,16	3,25±0,13	67,15±4,23	154,92±5,39	2,78±0,12	7,77±0,47	30,01±1,24	6,68±0,26	10,43±0,41	36,52±7,46	3,47±0,23
	248,00	5,11±0,24	4,08±0,06	27,59±3,77	90,97±10,58	3,01±0,05	12,33±1,48	57,41±0,27	11,31±1,01	4,25±0,87	16,88±3,55	2,16±0,03
308,13	5,52±0,22	4,58±0,17	96,28±8,58	180,66±18,93	5,89±0,72	9,33±0,04	55,68±0,87	8,62±0,23	22,11±2,7	50,80±2,33	4,95±0,21	
SF	Kontrola	6,44±0,31	5,32±0,32	20,67±1,83	179,66±0,5	12,74±0,31	4,55±0,37	23,91±0,01	3,57±0,66	4,00±0,94	30,98±1,05	12,24±1,2
	6,75	4,26±0,09	3,49±0,18	18,73±4,78	31,83±3,42	3,78±0,29	5,55±0,83	23,6±5,23	3,14±0,69	2,54±0,31	7,14±0,31	2,74±0,24
	17,07	3,87±0,01	3,35±0,19	11,75±0,68	26,06±4,83	3,69±0,18	4,51±0,2	28,73±0,03	3,53±0,05	2,32±0,06	5,62±0,17	3,50±0,46
	51,51	4,30±0,13	3,47±0,07	18,98±0,32	43,73±1,8	2,82±0,11	6,11±0,07	13,49±1,01	2,36±0,18	3,74±0,05	10,49±0,73	1,92±0,1
	61,00	4,61±0,13	3,54±0,14	20,05±1,06	53,64±1,49	6,88±0,62	3,46±0,25	8,68±0,88	2,28±0,21	4,68±0,04	13,28±0,71	3,89±0,6
	105,00	6,16±0,18	3,64±0,19	52,08±2,52	331,76±12,68	9,50±0,26	5,67±0,26	15,99±2,17	2,63±0,08	10,39±0,82	77,68±3,77	7,07±0,84
	151,94	6,88±0,63	4,21±0,17	32,98±1,8	137,28±17,33	4,22±0,45	7,36±0,62	40,99±8,3	7,05±0,92	6,81±0,27	37,33±3,97	3,58±0,39
	177,42	3,79±0,13	3,14±0,05	74,86±8,56	224,52±9,25	2,99±0,04	4,14±0,55	12,08±1,1	2,46±0	10,44±1,34	51,13±2,62	4,07±0,01
	248,00	4,41±0,22	3,57±0,24	39,79±3,81	94,81±3,27	3,39±0,19	4,91±0,27	19,10±0,84	4,24±0,23	6,09±0,33	18,84±0,3	3,80±0,2
308,13	5,49±0,47	4,90±0,69	121,15±8,3	311,79±23,8	9,71±0,25	6,98±0,98	14,91±0,72	3,66±0,49	14,16±2,0	144,43±13,2	8,29±0,22	

**Skraćenice:** *p*-CA, *p*-kumarinska kiselina; FA, ferulinska kiselina, FT, feruloiltriptamin; CT, kumaroiltriptamin; DCS1 i DCS2, di-*p*-kumaroilspermidin i izomer; CFS, *N*-kumaroil-*N*-feruloilspermidin; CFP, kumaroil-feruloilputrescin; DFPI i DFP2, diferuloilputrescin i izomer.



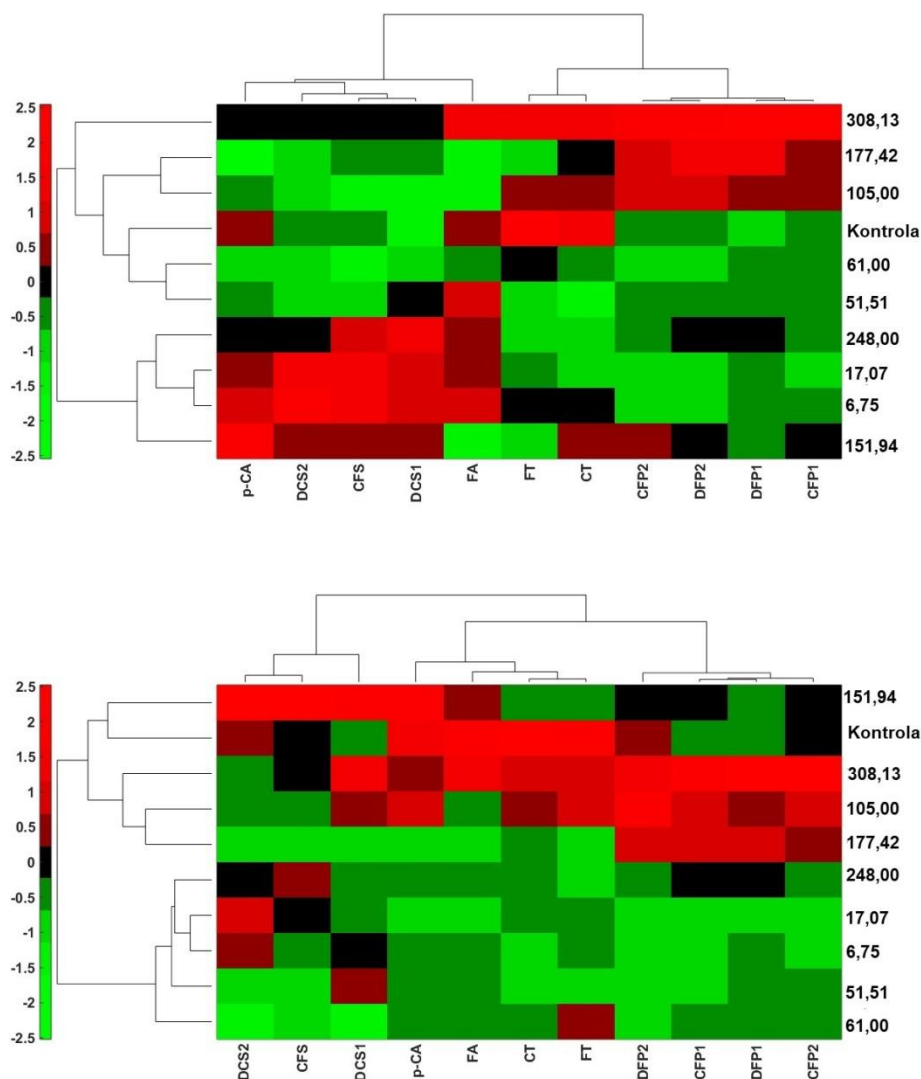
#### 4.1.1.3. Ispitivanje korelacija između identifikovanih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima frakcija semena kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom B<sub>1</sub>

Na **slici 4.7.** dati su klastergrami (toplotne mape sa pripadajućim dendrogramima) za matricu podataka o koncentracijama AFB<sub>1</sub> i sadržaju određenih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima unutrašnje i spoljašnje frakcije ispitivanih uzoraka.

Pojedinačna fenolna jedinjenja kvantifikovana *HPLC-DAD-MS* tehnikom su prikazana u kolonama, dok su različite koncentracije AFB<sub>1</sub> kod metanolnih ekstrakata frakcija ispitivanih semena raspoređene u redovima. Na osnovu dendrograma, kod obe frakcije uočava se grupisanje uzoraka u dva glavna klastera.

Na levoj strani toplotne mape nalazi se dendrogram koji grupiše uzorke različitih koncentracija AFB<sub>1</sub> po sličnosti u sadržaju fenolnih jedinjenja. Dendrogram prikazan na gornjoj strani toplotne mape grupiše fenolna jedinjenja po korelacionoj sličnosti. Vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja po koncentracijama su prethodno standardizovane, što znači da su svedene na nulti prosek i jediničnu devijaciju po formuli  $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$ , gde je  $z_i$  standardizovani skor,  $x_i$  sadržaj fenola u  $i$ -toj koncentraciji,  $\bar{x}$  srednja vrednost sadržaja fenola, dok je  $s$  standardna devijacija sadržaja fenola. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja po koncentracijama je vizuelizovan bojom, pri kojoj zelena, crna i crvena redom označavaju potprosečne, prosečne i natprosečne vrednosti za kvantifikovana fenolna jedinjenja. Uočene su varijacije u sadržaju pojedinačnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima kod obe frakcije semena različitog nivoa kontaminacije.

Natprosečne vrednosti sadržaja konjugata spermidina (*DCS2* i *CFS*) utvrđene su samo kod unutrašnjih frakcija nisko-kontaminiranih uzoraka semena (6,75 i 17,07 µg kg<sup>-1</sup>). Međutim, kod spoljašnje frakcije semena različitog nivoa kontaminacije, njihove vrednosti su bile prosečne i potprosečne, osim u slučaju semena sa kontaminacijom AFB<sub>1</sub> koncentracije 151,94 µg kg<sup>-1</sup>. Uglavnom, utvrđene su prosečne i natprosečne vrednosti u sadržaju identifikovanih konjugata putrescina, i to kod uzoraka sa visokim nivoom kontaminacije aflatoksinom, kako u unutrašnjoj tako i u spoljašnjoj frakciji semena.



**Slika 4.7.** Klastergram (toplotne mape sa pripadajućim dendrogramima) za matricu podataka o koncentracijama AFB<sub>1</sub> i sadržaja detektovanih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima unutrašnje (gore) i spoljašnje (dole) frakcije semena kukuruza. **Skraćenice:** *p-CA*, *p*-kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina, *FT*, feruloiltriptamin; *CT*, kumaroiltriptamin; *DCS1* i *DCS2*, di-*p*-kumaroilspermidin i izomer; *CFS*, *N*-kumaroil-*N*-feruloilspermidin; *CFP*, kumaroil-feruloilputrescin; *DFP1* i *DFP2*, diferuloilputrescin i izomer.

Drugi način proučavanja povezanosti sadržaja pojedinih fenolnih jedinjenja, kao i sličnosti pojedinih uzoraka različitih nivoa kontaminacije, je primena PCA. Ulazni podaci za ovu analizu su korelacione matrice (**Tabela 4.3.** i **Tabela 4.4.**), u kojima se nalaze vrednosti Pearsonovog koeficijenta korelacije (*r*) koji izražava stepen linearne povezanosti između dve promenljive. U tu svrhu konstruisani su biplotovi (*PC1* vs. *PC2*) na kojima su fenolna jedinjenja prikazana vektorima, a uzorci kružicama (**Slike 4.8.** i **4.9.**). Korelisanost između pojedinih fenolnih jedinjenja se može sagledati na osnovu ugla koji zaklapaju odgovarajući vektori. Oštar ugao označava pozitivnu korelaciju, tup ugao negativnu, dok prav ugao pokazuje odsustvo linearne korelacije.

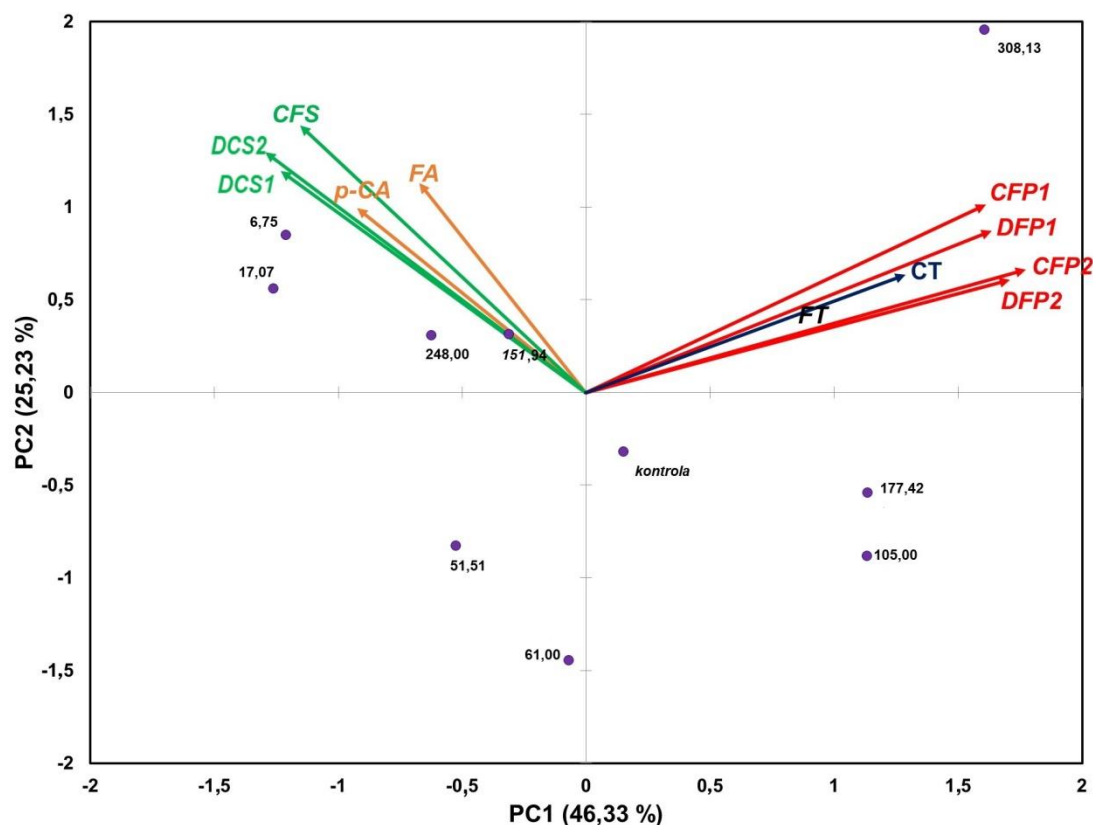
Dobijeni rezultati (**Tabela 4.3.** i **Slika 4.8.**) pokazuju da postoji visoka korelacija između pojedinih konjugata spermidina, kao i između pojedinih tipova konjugata diferuloilputrescina u metanolnim ekstraktima kod unutrašnje frakcije semena. Takođe, uočava se dobra korelacija između *p-CA* i dominantnih tipova konjugata spermidina, *DCS2* i *CFS*, dok *FA* ne pokazuje

korelaciju sa ostalim detektovanim jedinjenjima. Osim toga, visoka pozitivna korelacija je utvrđena između jedinjenja *FT* i *CT*. Takođe, jedinjenje *CT* je u pozitivnoj korelaciji sa *DFP2* i negativnoj sa *DCS1*, dok je jedinjenje *DFP1* u pozitivnoj korelaciji sa *DFP2*, *CFP1* i *CFP2*.

**Tabela 4.3.** Korelacioni matiks fenolnih jedinjenja određenih u metanolnim ekstraktima unutrašnje frakcije semena kukuruza.

	<i>p-CA</i>	<i>FA</i>	<i>DFP1</i>	<i>DFP2</i>	<i>FT</i>	<i>DCS1</i>	<i>DCS2</i>	<i>CFS</i>	<i>CFP1</i>	<i>CFP2</i>	<i>CT</i>
<i>p-CA</i>	1										
<i>FA</i>	0,301	1									
<i>DFP1</i>	-0,352	-0,036	1								
<i>DFP2</i>	-0,349	-0,268	<b>0,9420</b>	1							
<i>FT</i>	0,139	0,284	0,2434	0,176	1						
<i>DCS1</i>	0,389	0,505	-0,118	-0,217	-0,485	1					
<i>DCS2</i>	<b>0,710</b>	0,467	-0,286	-0,380	-0,089	<b>0,734</b>	1				
<i>CFS</i>	<b>0,519</b>	0,488	-0,110	-0,201	-0,244	<b>0,910</b>	<b>0,889</b>	1			
<i>CFP1</i>	-0,180	0,066	<b>0,9689</b>	<b>0,889</b>	0,385	-0,139	-0,239	-0,122	1		
<i>CFP2</i>	-0,256	-0,236	<b>0,9525</b>	<b>0,9738</b>	0,272	-0,274	-0,385	-0,249	<b>0,944</b>	1	
<i>CT</i>	0,167	-0,074	0,4933	<b>0,5060</b>	<b>0,801</b>	<b>-0,506</b>	-0,103	-0,213	<b>0,584</b>	<b>0,596</b>	1

\*statistički značajne vrednosti, na nivou značajnosti 5%, su poblejane.



**Slika 4.8.** Biplot (*PC1* vs. *PC2*) za identifikovana fenolna jedinjenja u metanolnim ekstraktima unutrašnje frakcije semena različitog nivoa kontaminacije. **Skraćenice:**

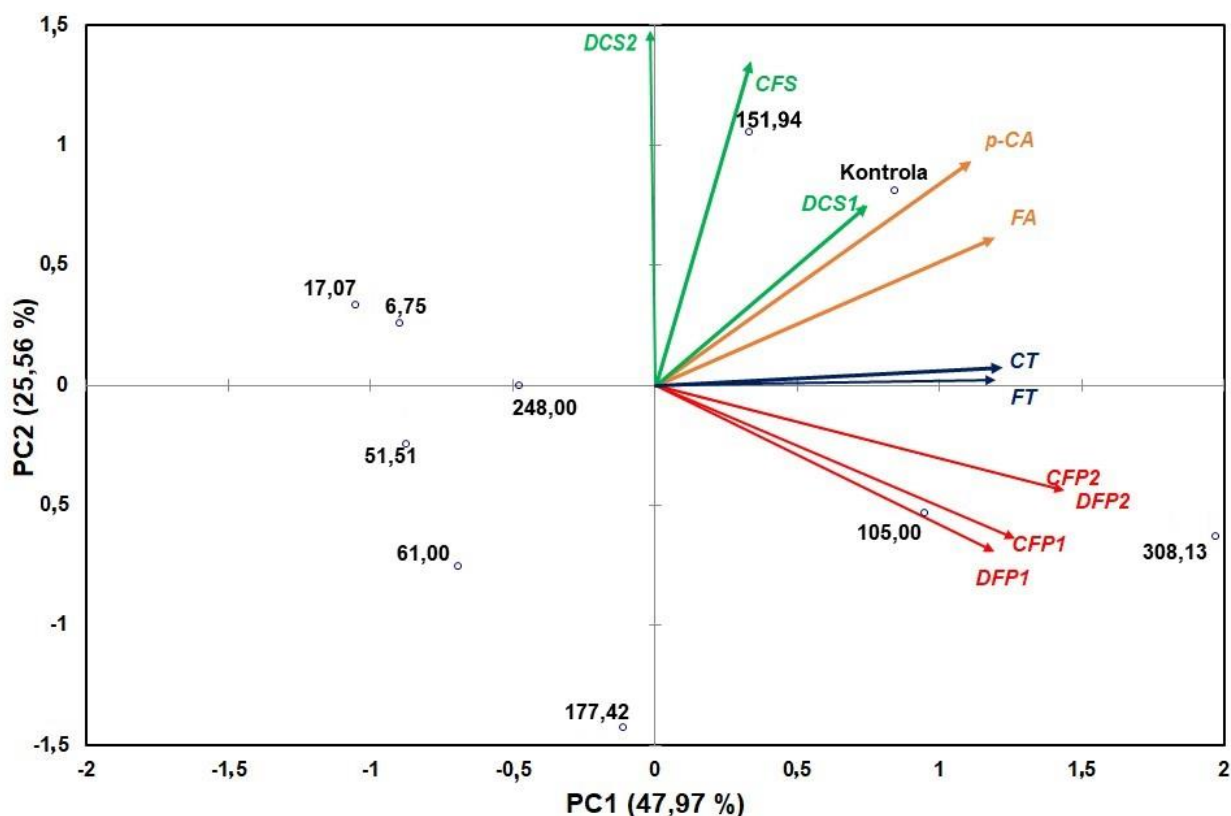
*DCS1* i *DCS2*, di-*p*-kumaroilsperrmidin i njegov izomer; *CFS*, *N*-kumaroil-*N*-feruloilsperrmidin; *CFP1* i *CFP2*, kumaroil-feruloilputrescin i njegov izomer; *DFP1* i *DFP2*, *cis*-diferuloilputrescin i njegov izomer; *p-CA*, kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina; *CT*, kumaroil triptamin i *FT*, feruloil triptamin.

Na osnovu podatka koji su dati u **tabeli 4.4.** i **slici 4.9.** pokazana je dobra pozitivna korelacija između *p-CA* sa *FA*, *FT*, *CFS*, *CT*. U metanolnom ekstraktu spoljašnje frakcije ispitivanih uzoraka semena različitih nivoa kontaminacije utvrđena je i korelacija *FA* sa *FT* i *CT*, dok su *CT* i *FT* u visokoj pozitivnoj korelaciji kod obe frakcije semena. Pored toga, *DCS2* i *CFS* su pozitivno korelisani. Između različitih tipova identifikovanih konjugata putrescina pokazana je visoka pozitivna korelacija.

**Tabela 4.4.** Korelacioni matiks fenolnih jedinjenja određenih u metanolnim ekstraktima spoljašnje frakcije semena kukuruza.

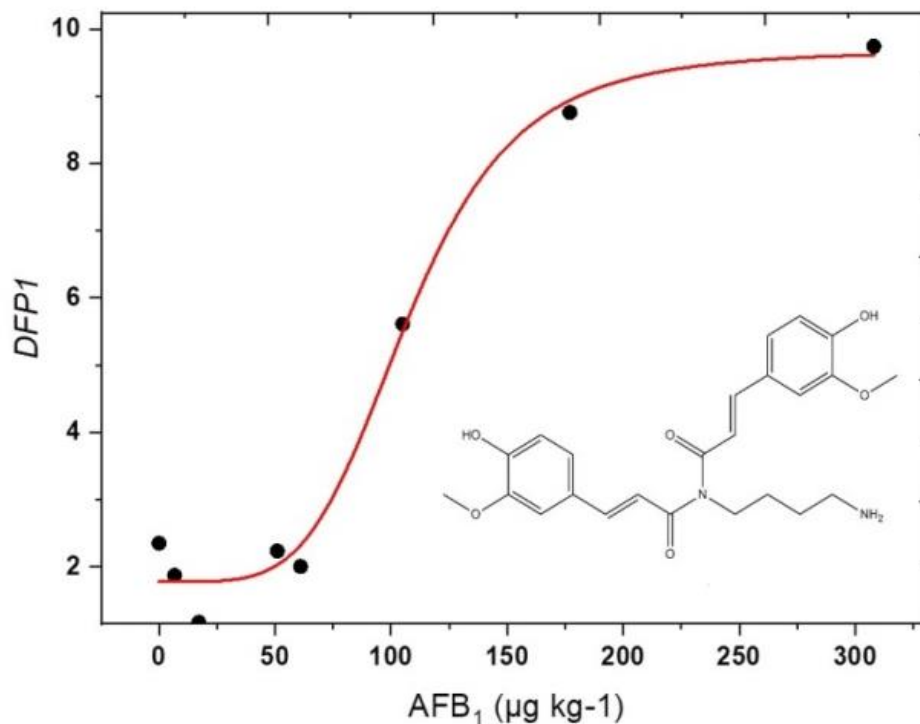
	<i>p-CA</i>	<i>FA</i>	<i>DFP1</i>	<i>DFP2</i>	<i>FT</i>	<i>DCS1</i>	<i>DCS2</i>	<i>CFS</i>	<i>CFP1</i>	<i>CFP2</i>	<i>CT</i>
<i>p-CA</i>	1										
<i>FA</i>	<b>0,727</b>	1									
<i>DFP1</i>	0,117	0,286	1								
<i>DFP2</i>	0,508	0,417	<b>0,788</b>	1							
<i>FT</i>	<b>0,659</b>	<b>0,799</b>	0,262	0,599	1						
<i>DCS1</i>	0,516	0,350	0,358	0,301	0,010	1					
<i>DCS2</i>	0,458	0,243	-0,315	-0,199	-0,116	0,460	1				
<i>CFS</i>	<b>0,570</b>	0,350	-0,012	-0,011	-0,085	0,589	<b>0,867</b>	1			
<i>CFP1</i>	0,275	0,240	<b>0,950</b>	<b>0,895</b>	0,316	0,358	-0,298	0,021	1		
<i>CFP2</i>	0,387	0,480	<b>0,931</b>	<b>0,882</b>	0,516	0,475	-0,206	0,043	<b>0,928</b>	1	
<i>CT</i>	<b>0,609</b>	<b>0,843</b>	0,316	<b>0,624</b>	<b>0,939</b>	-0,011	-0,025	-0,002	0,332	0,506	1

\*statistički značajne vrednosti, na nivou značajnosti 5%, su podebljane.



**Slika 4.9.** Biplot (*PC1* vs. *PC2*) za identifikovana fenolna jedinjenja u metanolnim ekstraktima spoljašnje frakcije semena različitog nivoa kontaminacije. **Skraćenice:** *DCS1* i *DCS2*, di-*p*-kumaroilsperrmidin i njegov izomer; *CFS*, *N*-kumaroil-*N*-feruloilsperrmidin; *CFP1* i *CFP2*, kumaroil-feruloilputrescin i njegov izomer; *DFP1* i *DFP2*, *cis*-diferuloilputrescin i njegov izomer; *p-CA*, kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina; *CT*, kumaroil triptamin i *FT*, feruloil triptamin.

Pored toga, ispitan je odnos između sadržaja *DFP* i koncentracije  $AFB_1$  (Slika 4.10.) u metanolnim ekstraktima spoljašnje frakcije semena. Dobijeni rezultati ukazuju na dozno-zavisnu vezu ( $R=0,9886$ ), koja je opisana jednačinom (4.1.). Definisana su četiri glavna parametra:  $a_1 = 1,78$ ;  $a_2 = 9,68$ ;  $x_0 = 107,75$ ;  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $p = 4,5$ . Sagledavanjem ovih rezultata, može da se zaključi da je *DFP* dobar indikator kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom, kao i nivoa oštećenja semena indukovanim ovim toksinom. Ovi rezultati ukazuju na odbrambenu ulogu *DFP* u spoljašnjim frakcijama semena u uslovima stresa.



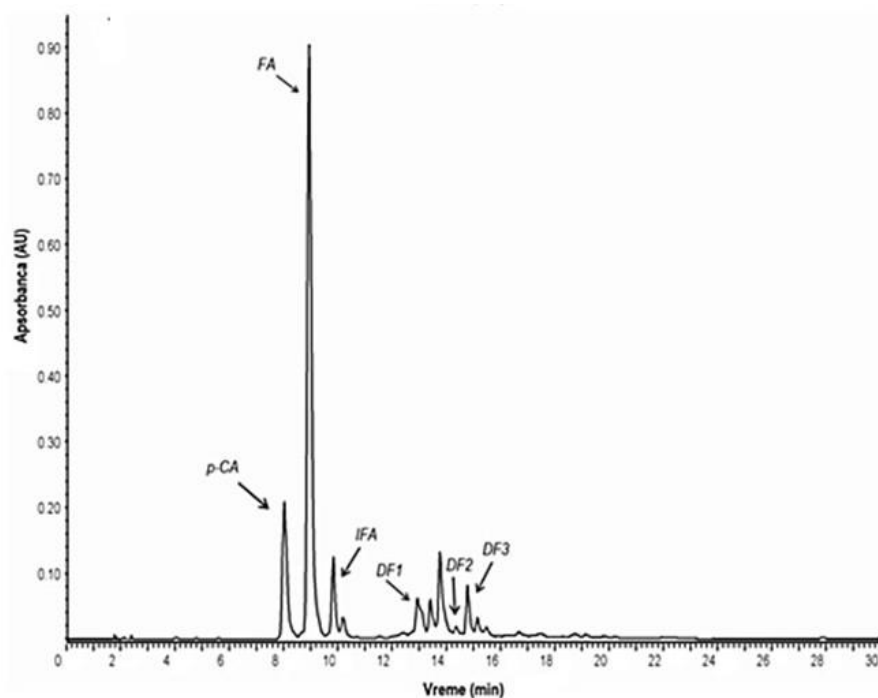
Slika 4.10. Dozno-zavisna veza između *DFP* i koncentracije  $AFB_1$  ( $R=0,9886$ ).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da specifični tip konjugata poliamina dominira u svakoj od analiziranih frakcija. Kod kontrolnih uzoraka semena, unutrašnja frakcija je imala viši sadržaj konjugata spermidina u poređenju sa spoljašnjom frakcijom, dok je u spoljašnjoj frakciji kontrolnog semena, utvrđeno veće prisustvo konjugata putrescina. Takođe, pokazano je da nivo  $AFB_1$  utiče na sadržaj i odnos pojedinih konjugata poliamina u ispitivanim frakcijama.

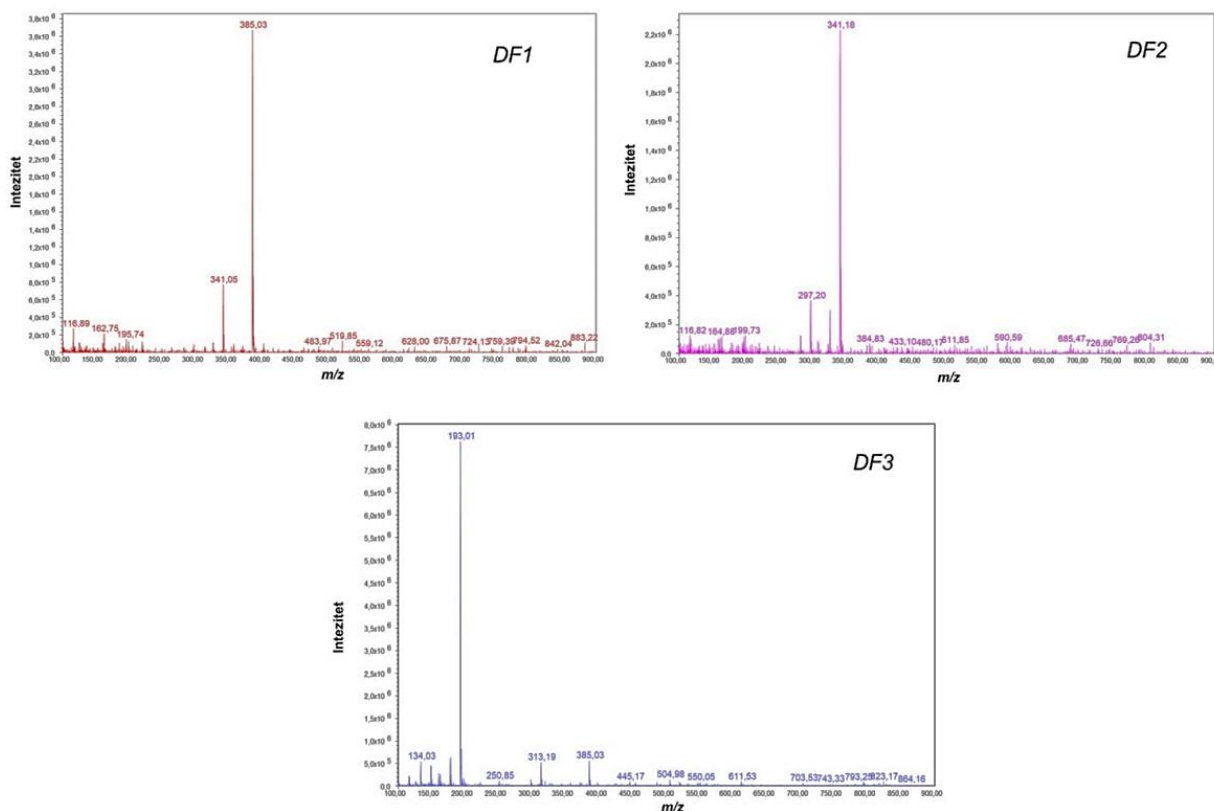
#### 4.1.2. Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja u hidrolizatima ispitivanih semena

Reprezentativni hromatogram *HPLC-DAD* analize hidrolizata ispitivanog uzorka semena kukruza je prikazan na slici 4.11. Elucioni pikovi sa hromatograma odgovaraju monomerima fenolnih jedinjenja tj. fenolnim kiselinama koje su identifikovane na osnovu odgovarajućih standarda. Utvrđeno je prisustvo *p*-kumarinske kiseline (*p-CA*), ferulinske (*FA*) i izoferulinske kiseline (*IFA*). Takođe, na hromatogramu se mogu uočiti pikovi jedinjenja koji odgovaraju različitim izomerima dehidrodimera ferulinske kiseline (*DF1*, *DF2*, *DF3*).

Detaljnija strukturna karakterizacija identifikovanih jedinjenja dobijena je analizom MS spektara u negativnom  $[M-H]^-$  jonizacionom modu. MS spektri različitih izoformi dehidrodimera ferulinske kiseline dati su na slici 4.12.



**Slika 4.11.** Reprezentivni hromatogrami *HPLC-DAD* analize hidrolizata proučanih uzoraka semena ( $\lambda_{\max} = 310$  nm). **Skraćenice:** *p-CA*, *p*-kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina; *IFA*, izoferulinska kiselina; *DF1*, *DF2*, *DF3*, dehidrodimeri ferulinske kiseline.



**Slika 4.12.** Reprezentivni maseni spektri identifikovanih izoformi dehidrodimera ferulinske kiseline *DF1* (na  $m/z$  385), *DF2* (na  $m/z$  341), i *DF3* (na  $m/z$  193) u hidrolizatu semena,  $[M-H]^-$ .

Rezultati dobijeni *OrbiTrap* masenom analizom (**Tabela 4.5.**), pokazali su prisustvo ukupno šesnaest jedinjenja u hidrolizatu ispitivanog uzorka semena. U tabeli prikazani su nazivi identifikovanih jedinjenja (ili skraćenice), retencionna vremena ( $t_R$ , min), izračunate i tačne mase ( $[M-H]^-$ ,  $m/z$ ), srednje odstupanje masa (ppm), osnovni joni fregmentacija  $MS^2$  i fragmentacioni joni  $MS^3$  i  $MS^4$ .

Jedinjenje sa molekulskim jonom na  $m/z$  193  $[M-H]^-$  i fragmentacionim jonima na  $m/z$  178 (usled gubitka metil grupe) i na  $m/z$  134 (usled gubitka metil grupe i  $CO_2$ ) odgovara ferulinskoj kiselini (*FA*) (Chiremba i sar., 2012; Bauer i sar., 2012). Naime, gubitak  $CO_2$  grupe je tipičan za fenolne kiseline što daje anjon  $[M-H-COO]^-$  (Chiremba i sar., 2012; Kang i sar., 2016; Bauer i sar., 2012).

Jedinjenja sa molekulskim jonom na  $m/z$  193  $[M-H]^-$  i na  $m/z$  163  $[M-H]^-$  identifikovana su redom kao izoferulinska (*IFA*) i *p*-kumarinska kiselina kiselina (*p-CA*). Takođe, detektovano jedinjenje sa molekulskim jonom na  $m/z$  179  $[M-H]^-$  odgovara kafeinskoj kiselini (*KA*). Identifikacija ovih kiselina utvrđena je na osnovu odgovarajućeg standarda. U hidrolizatima ispitivanih uzoraka, pronađena su jedinjenja sa molekulskim jonom na  $m/z$  385  $[M-H]^-$  i fragmentacionim jonima na  $m/z$  341 i na  $m/z$  193. Na osnovu literaturnih podataka, poznato je da su u pitanju različite izoforme dehidrodimera ferulinske kiseline. Usled gubitka  $CO_2$  (44 Da) iz karboksilne kiseline nastaje fragmentacioni jon na  $m/z$  341 (Chiremba i sar., 2012). Takođe, identifikovana jedinjenja sa molekulskim jonom na  $m/z$  577  $[M-H]^-$  odgovaraju izomerima triferulinske kiseline (*TF*) (Saulnier i Thibault, 1999; Bunzel i sar., 2003).

Utvrđeno je prisustvo pojedinih konjugata putrescina (**Tabela 4.2.**), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Bauer i sar., 2012), u kojima se navodi da su ova jedinjenja zastupljena u manjim količinama u baznom hidrolizatu semena kukuruza. Ona imaju karakteristični molekulski jon na  $m/z$  439  $[M-H]^-$ .

**Tabela 4.5.** Identifikovana fenolna jedinjenja u hidrolizatu semena *Zea mays* L. pomoću *UHPLC-LTQ OrbiTrapXL (MS)*.

Naziv jedinjenja	$t_R$ (min)	Izračunata masa [M-H] <sup>-</sup>	Nađena masa [M-H] <sup>-</sup>	Srednje odstupanje masa (ppm)	MS <sup>2</sup> Fragmenti, (% Osnovni pik)	MS <sup>3</sup> Fragmenti, (% Osnovni pik)	MS <sup>4</sup> Fragmenti, (% Osnovni pik)
<i>p</i> -kumarinska kiselina	8,74	163,04007	163,0383	1,71	<b>119</b> (100)	114(7),118(8),124(16), <b>132</b> (100),133(17), 160(29)	–
Dehidrodimer ferulinske kiseline <b>1(DF1)</b>	8,90	385,09289	385,08825	4,64	<b>341</b> (100), 342(5)	91(8), 92(20), <b>119</b> (100)	–
Ferulinska kiselina	9,10	193,05063	193,04841	2,22	134(33),147(40), 148(8), <b>149</b> (100), 150(12),178(71), 179(27)	173(7),217(19), 282(40), 297(55), <b>326</b> (100)	203(92),264(13), <b>267</b> (100),282(78), 311(29)
Kafeinska kiselina	9,11	179,03498	179,03316	1,83	133 (43),134 (54), <b>135</b> (100),136(14), 137(7), 164(83),165(12)	<b>134</b> (100)	<b>134</b> (100)
Dehidrodimer ferulinske kiseline <b>2(DF2)</b>	9,19	385,09289	385,08824	4,65	297(35),298(6), <b>341</b> (100),342(11)	65(5), <b>91</b> (100),106(3), 107(15),108(7), 120(19)	–
Izoferulinska kiselina	9,31	193,05063	193,04832	2,31	134(33),147(40),148(8), <b>149</b> (100),150(12),178(71), 179(27)	282(16), <b>297</b> (100), 323(4), 326(53)	267(3), <b>282</b> (100)
Dehidrodimer ferulinske kiseline <b>3(DF3)</b>	9,91	385,09289	385,08805	4,85	282(8),297(3),326(16), 327(3), <b>341</b> (100),342(1), 370(10)	<b>134</b> (100)	<b>134</b> (100)

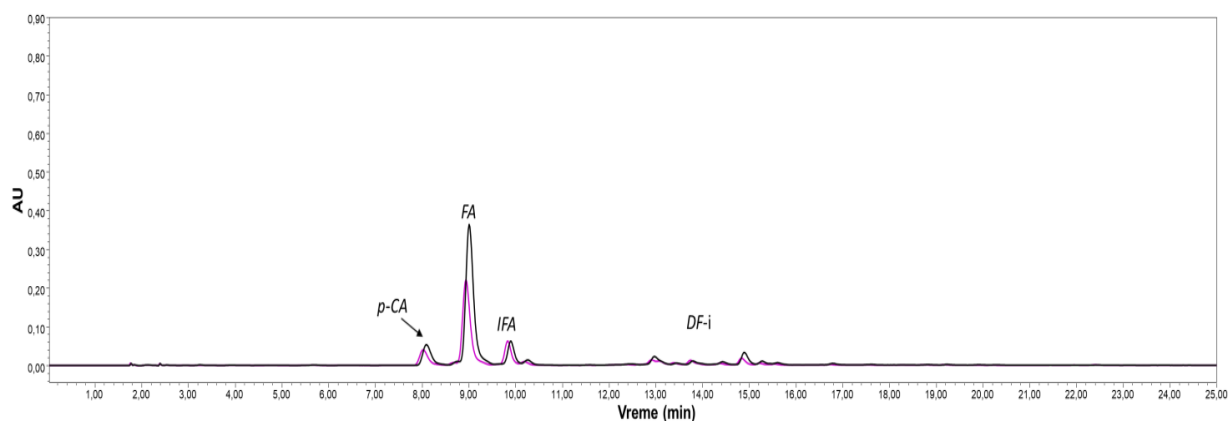


<i>N,N'</i> - <i>di-p</i> - koumaroilputrescin	9,95	379,16633	379,16177	4,56	119(3), <b>259</b> (100), 260(11)	282(49),297(19), <b>326</b> (100)	267(3),281(20), <b>282</b> (100)
<b>Triferulinska kisleina 1</b> ( <i>TF1</i> )	9,98	577,13515	577,13172	3,43	341(87),342(9),461(41), 489(63),490(12), <b>533</b> (100),53 4(9)	<b>119</b> (100),145(3),215(1 1), 216(32)	91(55), <b>93</b> (100)
<i>N-p</i> -koumaroil- <i>N'</i> - feruloil putrescin	10,07	409,17690	409,17183	5,07	135(30),259(59),260(7), <b>289</b> (100),290(13)	297(4), <b>341</b> (100),445(5 ) ,461(44),489(41)	173(5),217(11),282 (34),297 (63), <b>326</b> (100)
<i>N,N'</i> -diferuloilputrescin	10,23	439,18746	439,18184	5,62	135(13), 149(5), 274(3), <b>289</b> (100), 290(16)	134(11),149(39),245(3 ) ,246(8), <b>274</b> (100)	176(5),186(6),204(5) , 229(51), <b>230</b> (100)
<b>Dehidrodimer</b> <b>ferulinske kiseline</b> <b>4(DF4)</b>	10,28	385,09289	385,08822	4,67	<b>341</b> (100), 342(11)	134(12), 149(38), 246(8), <b>274</b> (100)	186(5), 204(7), 229(49), <b>230</b> (100), 231(11)
<b>Triferulinska kisleina 2</b> ( <i>TF2</i> )	10,43	577,13515	577,13065	4,50	311(15), 355(33), 356(6), 385(34), 489(5), <b>533</b> (100), 534(25)	282(50), 297(18), 313(4), <b>326</b> (100)	264(3), <b>282</b> (100)
<b>Triferulinska kisleina</b> <b>3(TF3)</b>	10,70	577,13515	577,13017	4,98	311(15), 355(54), 356(10), 385(21), 489(19), <b>533</b> (100), 534(27)	193(5), 296(9), <b>311</b> (100), 461(5), 489(36)	268(3), <b>296</b> (100)
<i>N-p</i> -kumaroiltriptamin	11,96	305,12955	305,12642	3,13	117(5), <b>119</b> (100), 120(9), 145(68), 146(6), 157(9), 159(16)	193(5), 296(9), <b>311</b> (100), 312(5), 461(7), 489(45)	<b>296</b> (100)
<i>N</i> -feruloiltriptamin	12,11	335,14012	335,13601	4,11	134(18), 135(30), 149(39), 175(24), 178(17), <b>320</b> (100), 321(17)	<b>119</b> (100)	–

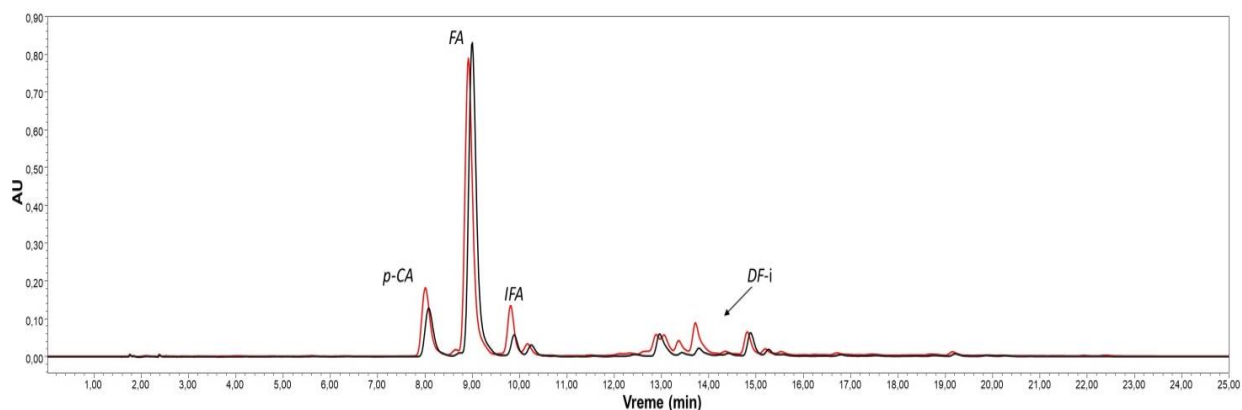
**Skraćenice:**  $t_R$ , retenciono vreme; srednje odstupanje masa u ppm.

#### 4.1.2.1. Analiza sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima frakcija ispitivanih semena

Na **slici 4.13.** i **4.14.** dati su preklopljeni reprezentativni hromatogrami dobijeni *HPLC-DAD* analizom hidrolizata unutrašnje i spoljašnje frakcije za semena bez aflatoksina (kontrola) i onih visoko-kontaminiranim aflatoksinom ( $308,13 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Sa kolone prvo se eluiraju monomeri fenolnih kiselina, čija retenciona vremena odgovaraju standardima *p-CA*, *FA* i *IFA*. Kasnije se sa kolone eliraju jedinjenja čiji UV spektri tentativno odgovaraju različitim formama dehidrodimera ferulinske kiseline (*DF*). Njihova strukturna karakterizacija je potvrđena MS analizom (**Tabela 4.5.**). Kao što je i očekivano, sva navedena jedinjenja su prisutna u većim količinama u spoljašnjoj frakciji semena, u odnosu na unutrašnju (**Tabela 4.6.**). Među njima, izomeri *DF* na  $m/z$  385 i na  $m/z$  193 pokazali su veću zastupljenost u poređenju sa izomerom na  $m/z$  341.



**Slika 4.13.** Reprezentativni hromatogrami *HPLC-DAD* analize hidrolizata unutrašnje frakcije semena, kontrola (crna linija) i visoko-kontaminirana ( $308,13 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (ljubičasta linija) ( $\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$ ).



**Slika 4.14.** Reprezentativni hromatogrami *HPLC-DAD* analize hidrolizata spoljašnje frakcije semena, kontrola (crna linija) i visoko-kontaminirana ( $308,13 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (crvena linija) ( $\lambda_{\text{max}} = 300 \text{ nm}$ ).

**Tabela 4.6.** Sadržaj identifikovanih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima *Zea mays* L. unutrašnje (UF) i spoljašnje (SF) frakcije semena ( $\mu\text{g g}^{-1}$  DW uzorka).

	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b><i>p</i>-CA</b>	<b><i>FA</i></b>	<b><i>IFA</i></b>	<b><i>m/z</i> 385</b>	<b><i>m/z</i> 341</b>	<b><i>m/z</i> 193</b>
UF	Kontrola	183,83±4,8	1608,3±221,87	156,72±35,61	225,63±38,53	68,13±4,6	223,6±30,62
	6,75	125,48±0,14	1013,07±19,44	201,2±41,58	167,53±11,16	46,56±7,47	152,8±14,39
	17,07	112,06±3,41	948,53±23,56	134,42±9,69	143,96±27,46	45,4±6,07	137,05±23,69
	51,51	123,32±0,37	1164,66±3,43	127,24±5,73	162,74±17,91	44,63±6,28	146,39±16,34
	61,00	137,5±6,73	1277,84±84,83	146,06±19,5	170,34±25,96	57,49±1,6	163,73±16,93
	105,00	134,68±10,11	1173,92±29,68	108,51±14,17	158,21±24,3	48,37±12,11	145,42±22,31
	151,94	112,75±0,94	733,65±59,21	117,99±21,46	99,66±16,88	33,73±3,9	89,51±3,63
	177,42	119,96±4,76	942,39±84,11	169,41±17,73	136,01±12,17	38,09±5,65	122,51±15,76
	248,00	140,27±3,54	1158,13±12,11	161,89±15,89	153,27±1,07	50,66±5,85	139,65±0,81
308,13	162,12±3,77	1158,37±17,11	191,66±13,59	91,87±1,24	42,54±1,82	143,18±2,32	
SF	Kontrola	369,37±18,83	3221,95±133,14	280,8±8,56	485,19±65,43	84,02±27,92	446,63±72,8
	6,75	267,79±13,59	2417,7±25,86	463,05±3,77	450,82±4,44	78,63±9,37	377,06±4,17
	17,07	256,2±1,12	2292,85±344,14	241,87±26,9	382,42±71,95	85,33±4,55	328±41,65
	51,51	178,39±23,64	1765,38±119,05	176,5±0,5	215,18±12,93	66,66±6,49	213,3±16,51
	61,00	269,92±10,99	2212,21±56,19	242,3±4,15	342,49±1,22	75,3±5,66	305,77±19,27
	105,00	345,34±11,96	2508,49±71,11	220,29±9,11	502,58±17,41	100,59±4,32	407,92±33,42
	151,94	430,32±29,79	3070,93±55,39	378,18±37,07	572,71±36,75	93,64±1,42	480,44±6,56
	177,42	347,78±14,58	2355,25±52,82	201,15±29,18	404,37±6,43	52,57±4,53	306,84±6,72
	248,00	404,86±9,4	2682,33±50,76	315,38±25,85	384,54±55,85	50,63±2,83	329,54±35,56
308,13	548,04±17,66	3265,39±116,26	396,28±16,85	310,29±58,28	74,43±9,31	316,91±52,55	

**Skracenicice:** *p*-CA, kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina; *IFA*, izoferulinska kiselina; *m/z* 385, *m/z* 341 i *m/z* 193 označavaju tri izomera dehidrodimera ferulinske kiseline (*DF1*, *DF2*, *DF3*).

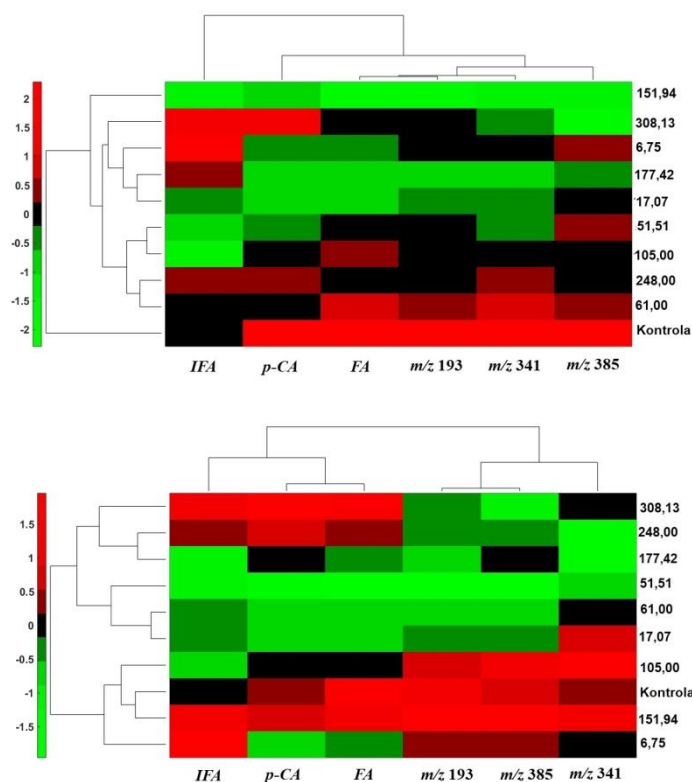
#### 4.1.2.2. Ispitivanje korelacija između određenih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima frakcija semena kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom B<sub>1</sub>

Na slici 4.15. prikazani su klastergrami (toplotne mape sa pripadajućim dendrogramima) za matricu podataka o koncentracijama AFB<sub>1</sub> i sadržaja određenih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima unutrašnje i spoljašnje frakcije semena.

Kvantifikovana fenolna jedinjenja pomoću *HPLC-DAD-MS* metode data su u kolonama, dok su različite koncentracije AFB<sub>1</sub> raspoređene u redovima. Uz pomoć dendrograma može se uočiti grupisanje uzoraka u dva osnovna klastera. Sa leve strane toplotne mape dendrogram grupiše uzorke različitih koncentracija AFB<sub>1</sub> na osnovu sličnosti u sadržaju identifikovanih fenolnih jedinjenja, dok dendrogram na gornjoj strani toplotne mape grupiše fenolna jedinjenja po korelacionoj sličnosti. Kao što je ranije navedeno sadržaj odabranih fenolnih jedinjenja po uzorcima semena različitog sadržaja aflatoksina je vizuelizovan bojom na mapi (zelena, crna i crvena). Vrednosti sadržaja fenolnih jedinjenja po koncentracijama su prethodno standardizovane, što znači da su svedene na nulti prosek i jediničnu devijaciju po formuli  $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$ , gde je  $z_i$  standardizovani skor,  $x_i$  sadržaj fenola u  $i$ -toj koncentraciji,  $\bar{x}$  srednja vrednost sadržaja fenola, dok je  $s$  standardna devijacija sadržaja fenola.

Naime, može se primetiti da se kontrolni uzorci razdvajaju u posebnu podgrupu od kontaminiranih, kod hidrolizata unutrašnje frakcije semena. Kod kontrolnih uzoraka utvrđene su natprosečne vrednosti za sadržaj *p-CA* i *FA*, kao i zastupljenost određenih formi DF-a ( $m/z$  385,  $m/z$  341 i  $m/z$  193). Međutim, nije uočeno dalje jasno grupisanje semena po nivou kontaminacije, što znači da se na ovaj način jedino mogu razlikovati kontrolni uzorci od kontaminiranih.

Analizom podataka dobijenih u hidrolizatu spoljašnje frakcije semena, utvrđeno je razdvajanje u dve grupe. U drugoj grupi razdvojili su se uzorci po sličnosti u dve nove podgrupe i to podgrupa sa nisko-kontaminiranim (17,07  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 51,51  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 61,00  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) i visoko-kontaminiranim (177,42  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 248,00  $\mu\text{g kg}^{-1}$  i 308,13  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) semenima. Uglavnom, primećene su potprosečne (zelena boja na mapi) vrednosti sadržaja *p-CA* kod svih nisko-kontaminiranih semena (6,75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 17,07  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 51,51  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 61,00  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). S druge strane, kod visoko-kontaminiranih uzoraka ove vrednosti su bile prosečne i natprosečne što je redom predstavljeno crnom i crvenom bojom na mapi. Na osnovu prikazanih rezultata, može se izdvojiti *p-CA* kao mogući indikator nivoa kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom i uzeti u dalja razmatranja.



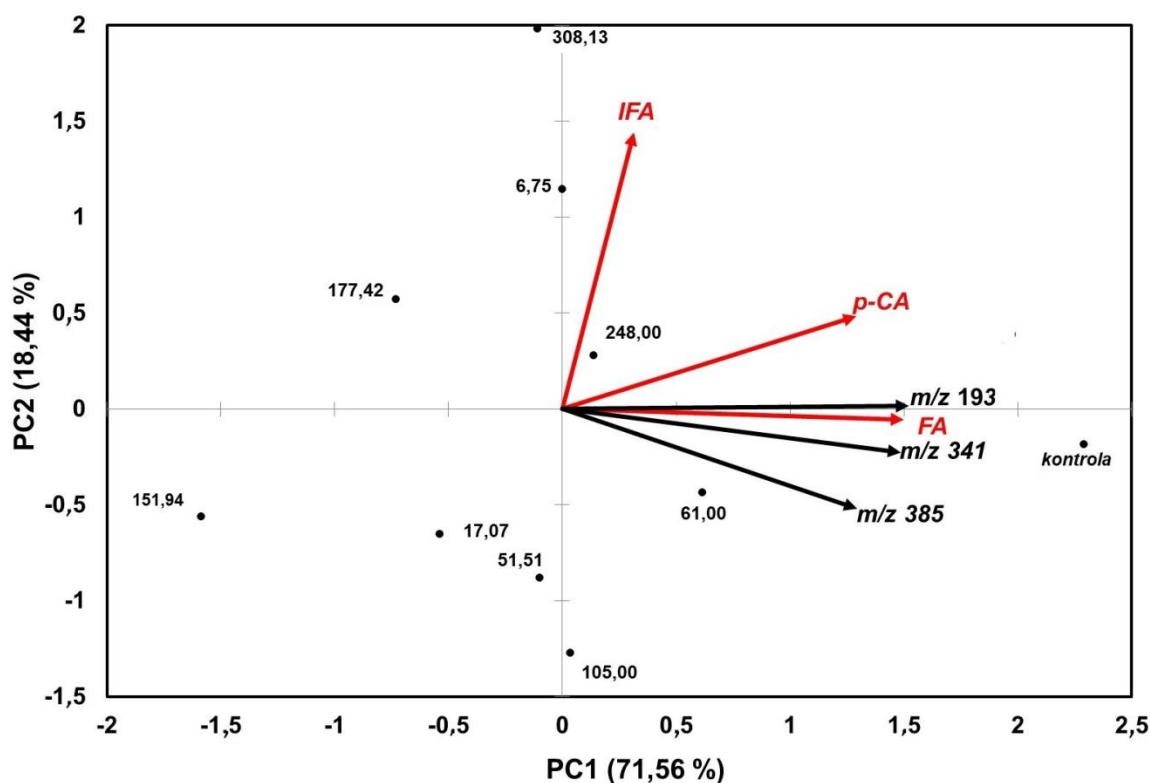
**Slika 4.15.** Klastergram (toplotne mape sa pripadajućim dendrogramima) za matricu podataka o koncentracijama AFB<sub>1</sub> i sadržaja detektovanih fenolnih jedinjenja u hidrolizatima unutrašnje (gore) i spoljašnje (dole) frakcije semena. **Skraćenice:** *p-CA*, kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina; *IFA*, izoferulinska kiselina; *m/z* 385, *m/z* 341 i *m/z* 193 označavaju tri izomera dehidrodimera ferulinske kiseline (*DF1*, *DF2*, *DF3*).

Dobijeni rezultati (**Tabela 4.7** i **Slika 4.16.**) pokazuju da ne postoji korelacija između *IFA* i drugih fenolnih jedinjenja u hidrolizatu ispitivanih frakcija semena, što je pokazano i za *DF*. Utvrđena je visoka pozitivna korelacija između *p-CA* i *FA* (0,8586). Takođe uočena je pozitivna korelacija između *p-CA* sa *DF* na *m/z* 341 i na *m/z* 193, dok je *FA* pozitivnoj korelaciji sa sva tri identifikovana dehidrodimera ferulinske kiseline.

**Tabela 4.7.** Korelacioni matiks za odabrana fenolna jedinjenja u hidrolizatu unutrašnje frakcije ispitivanih semena.

	<i>p-CA</i>	<i>FA</i>	<i>IFA</i>	<i>m/z</i> 385	<i>m/z</i> 341	<i>m/z</i> 193
<i>p-CA</i>	1					
<i>FA</i>	<b>0,858</b>	1				
<i>IFA</i>	0,516	0,256	1			
<i>m/z</i> 385	0,467	<b>0,801</b>	-0,141	1		
<i>m/z</i> 341	<b>0,735</b>	<b>0,931</b>	0,117	<b>0,880</b>	1	
<i>m/z</i> 193	<b>0,815</b>	<b>0,969</b>	0,230	<b>0,849</b>	<b>0,946</b>	1

\*statistički značajne vrednosti, na nivou značajnosti 5%, su podebljane.



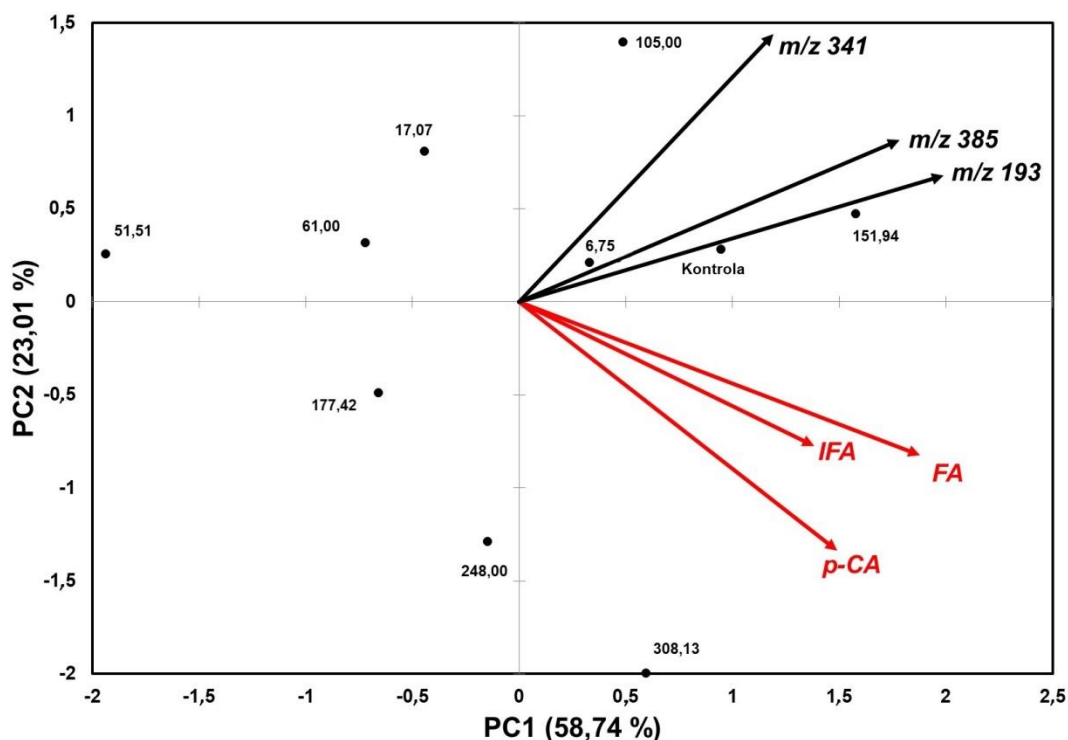
**Slika 4.16.** Biplot (*PC1* vs. *PC2*) za odabrana fenolna jedinjenja u hidrolizatima unutrašnje frakcije semena različitog nivoa kontaminacije. **Skraćenice:** *p-CA*, kumarinska kiselina; *FA*, ferulinska kiselina; *IFA*, izoferulinska kiselina; *m/z* 385, *m/z* 341 i *m/z* 193 označavaju tri izomera dehidrodimera ferulinske kiseline (*DF1*, *DF2*, *DF3*).

Na osnovu podataka koji su dati u **tabeli 4.8.** i **slici 4.17.** pokazana je visoka pozitivna korelacija između *p-CA* i *FA* (0,882). Pored toga, utvrđena je visoka pozitivna korelacija (0,9543) između DF na *m/z* 385 i *m/z* 193, kao i njihova dobra korelacija sa *FA*.

**Tabela 4.8.** Korelacioni matiks za pojedinačna fenolna jedinjenja u hidrolizatu spoljašnje frakcije ispitivanih semena.

	<i>p-CA</i>	<i>FA</i>	<i>IFA</i>	<i>m/z</i> 385	<i>m/z</i> 341	<i>m/z</i> 193
<i>p-CA</i>	1					
<i>FA</i>	<b>0,882</b>	1				
<i>IFA</i>	0,488	<b>0,570</b>	1			
<i>m/z</i> 385	0,313	<b>0,527</b>	0,345	1		
<i>m/z</i> 341	0,025	0,262	0,155	<b>0,559</b>	1	
<i>m/z</i> 193	0,425	<b>0,697</b>	0,448	<b>0,954</b>	<b>0,637</b>	1

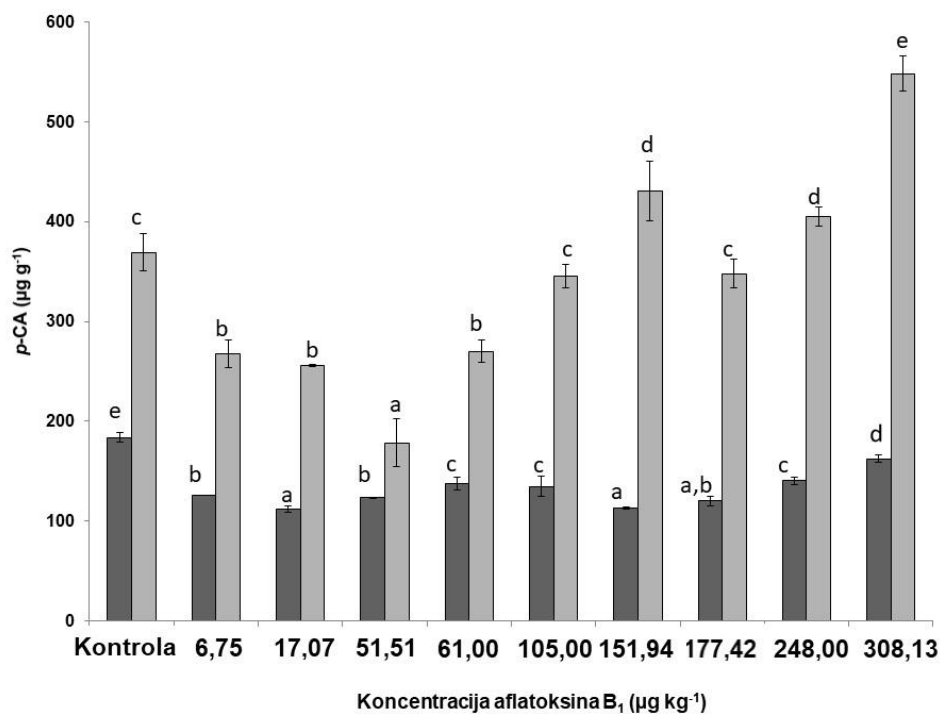
\*statistički značajne vrednosti, na nivou značajnosti 5%, su podebljane.



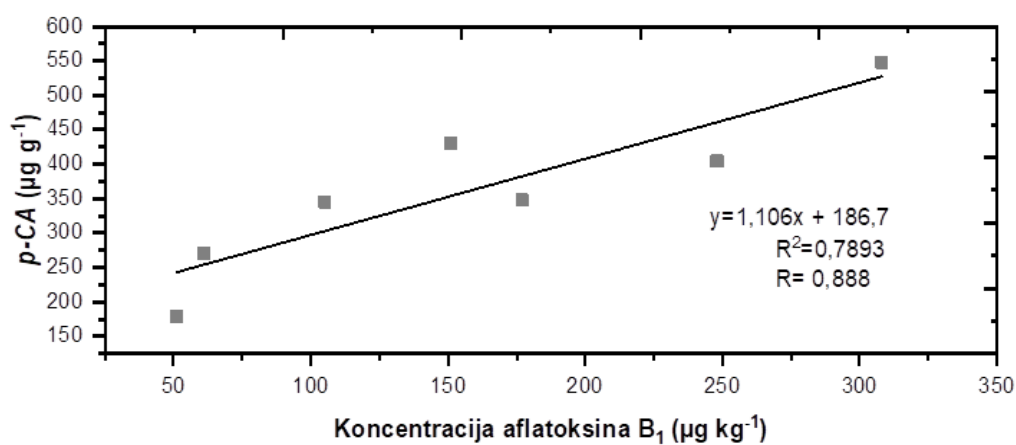
**Slika 4.17.** Biplot ( $PC1$  vs.  $PC2$ ) za odabrana fenolna jedinjenja u hidrolizatima spoljašnje frakcije semena različitog nivoa kontaminacije. Fenolna jedinjenja su predstavljena vektorima, dok su uzorci sa kružićima.

Dobijeni rezultati za prosečnu vrednost sadržaja  $p$ -CA po koncentracijama AFB<sub>1</sub> i frakcijama (unutrašnja i spoljašnja) semena grafički su prikazani na **slici 4.18**. Pronađena je statistički značajna razlika između dva sloja pri svakom nivou kontaminacije. Kao što je i očekivano, spoljašnje frakcije imaju statistički značajno veći sadržaj fenolnih kiselina, nego unutrašnje. U daljoj analizi, ispitana je promena u sadržaju ove kiseline kod spoljašnje frakcije semena u odnosu na nivo kontaminanta. Utvrđene su statistički značajne razlike između pojedinih nivoa kontaminacije. Ustanovljena je dvofazna promena sa porastom koncentracije AFB<sub>1</sub>. U literaturi se navodi da fenolne kiseline, kao što je  $p$ -CA, imaju inhibitorne efekte na biosintezu aflatoksina B<sub>1</sub> (Santiago i sar. 2010).

Pored toga,  $p$ -CA je prekursor za produkciju mnogih drugih fenolnih jedinjenja sa antioksidativnom i antifungalnom aktivnošću. Takođe se navodi kao pogodan indikator lignifikacije kod ćelijskog zida biljke (Zhang i sar., 2019). Kako  $p$ -CA ima brojne uloge u metabolizmu semena i njegovoj zaštiti, to može objasniti uočen dvofazni odgovor semena na porast nivoa kontaminanta. Kod spoljašnje frakcije semena utvrđena je visoka pozitivna korelacija između sadržaja  $p$ -CA i koncentracije AFB<sub>1</sub> ( $r=0,888$ ).



**Slika 4.18.** Rezultati dvofaktorske analize varijanse za sadržaj *p*-CA po koncentracijama AFB<sub>1</sub> i frakcijama semena (unutrašnja (*tamno siva boja*) i spoljašnja (*svetlo siva boja*) frakcija). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih nivoa kontaminacije. Između dva sloja pri svakom nivou kontaminacije pronađena je statistički značajna razlika.



**Slika 4.19.** Zavisnost sadržaja *p*-kumarinske kiseline (*p*-CA) od koncentracije AFB<sub>1</sub> (od 51,51 µg kg<sup>-1</sup> do 308,13 µg kg<sup>-1</sup>) u spoljašnjoj frakciji semena.



## 4.2. Ispitivanje sadržaja lignina

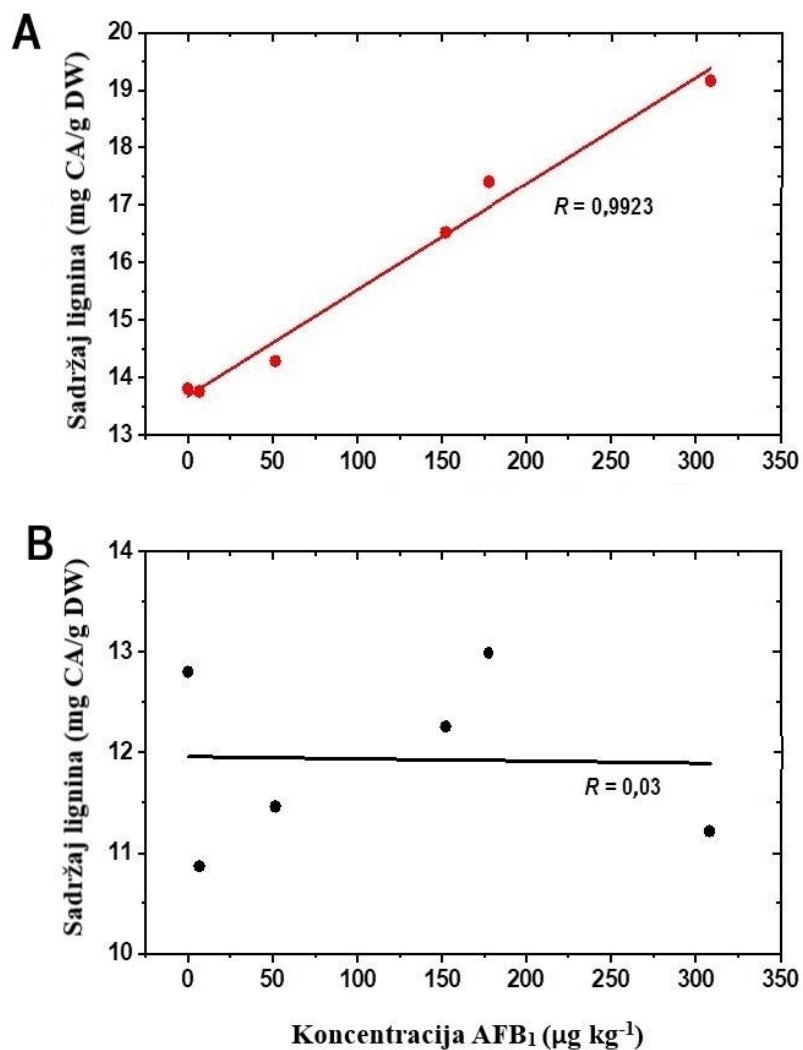
U tabeli 4.9. dati su rezultati za sadržaj lignina određen pomoću Acetil Bromidnog (AcBr) testa. Dobile vrednosti sadržaja lignina su u opsegu od 10,8 do 12,9 mg kod unutrašnje i 13,76 - 19,16 mg (izraženo kao ekvivalent CA/g DW) kod spoljašnje frakcije semena.

Kod kontrolnih uzoraka, među frakcijama nije pronađena statistički značajana razlika u sadržaju lignina. S druge strane, kod uzoraka semena kontaminiranih aflatoksinom utvrđen je statistički značajno veći sadržaj lignina u spoljašnjoj frakciji u poređenju sa unutrašnjom (Duncanov test,  $p < 0,05$ ). Takođe, između sadržaja lignina i koncentracije AFB<sub>1</sub> utvrđena je značajno visoka pozitivna linearna korelacija kod spoljašnje ( $R=0,99223$ ,  $P=0,00005$ ) i odsustvo korelacije kod unutrašnje frakcije semena ( $R=0,030$ ,  $P=0,943$ ) (Slika 4.20.).

**Tabela 4.9.** Ukupan sadržaj lignina u ispitivanim frakcijama semena kukuruza u odnosu na koncentraciju AFB<sub>1</sub>.

Koncentracija AFB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Količina lignina (mg eq CA /g DW)	
	Unutrašnja frakcija	Spoljašnja frakcija
Kontrola	12,80 ± 0,27	13,81 ± 0,39
6,75	10,87 ± 0,29	13,76 ± 0,62
51,51	11,46 ± 0,18	14,28 ± 0,11
151,94	12,26 ± 0,53	16,52 ± 0,26
177,42	12,99 ± 0,33	17,40 ± 0,77
308,13	11,22 ± 0,33	19,16 ± 0,62

**Skraćenice:** CA, koniferil alkohol; DW (engl. *dry weight*), suva masa.



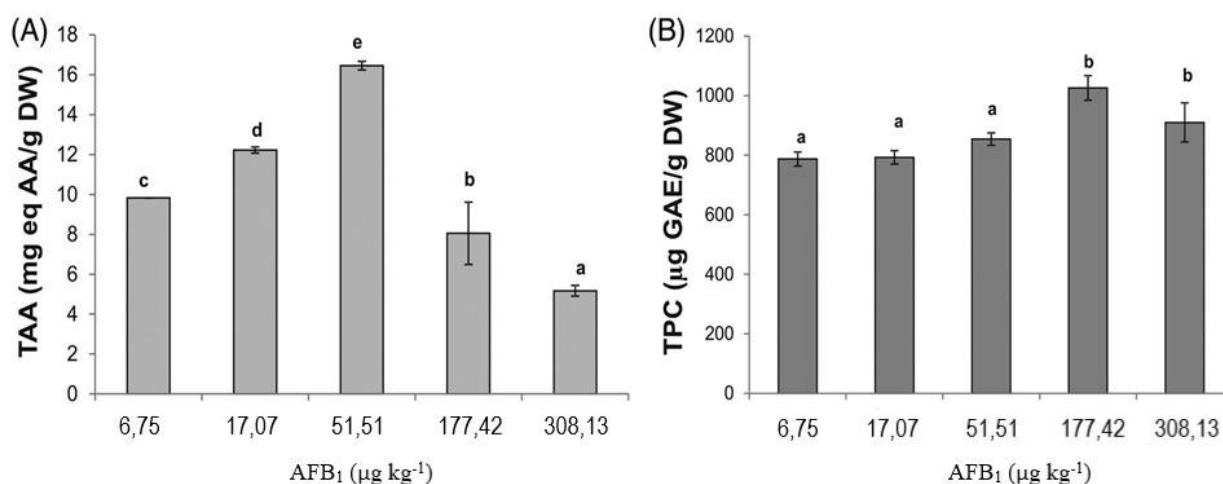
**Slika 4.20.** Korelacija između sadržaja lignina i koncentracije AFB<sub>1</sub> u spoljašnjoj (A) i unutrašnjoj (B) frakciji uzoraka semena.

Ovi rezultati su u skladu sa ranije saopštenim literaturnim podacima, koji pokazuju da lignifikacija ćelijskog zida biljaka ima zaštitnu ulogu u odnosu na različite faktore stresa (Moura i sar., 2010; Vance i sar., 1980). Naši rezultati sugerišu da povećanje ukupnog sadržaja lignina u spoljašnjoj frakciji semena može biti marker varijacija u odgovoru semena na porast koncentracije aflatoksina B<sub>1</sub>. Sa ovim rezultatima može da se poveže uočeni porast sadržaja *p*-CA i FA u spoljašnjoj frakciji semena kontamiranih visokom koncentracijom AFB<sub>1</sub>.

### 4.3. Ispitivanje veze između ukupne antioksidativne aktivnosti (TAA), sadržaja ukupnih fenola (TPC) i koncentracije aflatoksina B<sub>1</sub> u semenu kukuruza

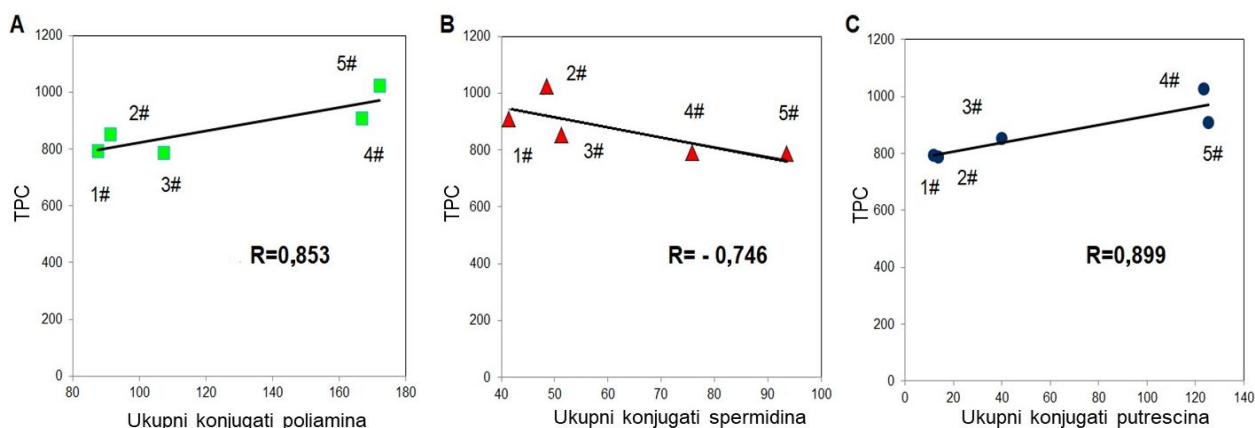
Na slici 4.21. prikazani su rezultati dobijeni za TAA i TPC metanolnih ekstrakata ispitivanih uzoraka semena različitog nivoa kontaminacije AFB<sub>1</sub>. Primenom ABTS testa pokazane su značajne razlike u TAA među svim ispitivanim uzorcima semena (slika 4.21A). Dobijene vrednosti su izražene kao miligram (mg) ekvivalenta (eq) L-askorbinske kiseline (AA) po gramu (g) suve mase (DW) uzorka, a varirale su u opsegu od  $5,169 \pm 0,270$  mg do  $16,456 \pm 0,219$  mg AA eq/ g DW. Može se uočiti značajno povećanje TAA do određene koncentracije AFB<sub>1</sub> ( $51,51 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), koje je praćeno smanjenjem pri višim nivoima kontaminacije. To ukazuje na činjenicu da koncentracija aflatoksina može da utiče na antioksidativni odbrambeni kapacitet semena kukuruza. Stoga, smanjenje TAA može biti indikator nivoa oksidativnog oštećenja semena. S obzirom na to da fenolna jedinjenja daju značajan doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti, u daljim analizama ispitan je sadržaj ukupnih fenola (TPC).

Dobijene vrednosti za TPC bile su u rasponu od  $787 \pm 23 \mu\text{g GAE/g DW}$  do  $1026 \pm 41 \mu\text{g GAE/g DW}$  uzorka. Kao što se može videti sa slike 4.21B, TPC pokazuje blagi porast sa povećanjem koncentracije AFB<sub>1</sub> u semenu. Međutim, do značajnog povećanja u TPC dolazi na višim nivoima kontaminacije ( $177,42 \mu\text{g kg}^{-1}$  i  $308,13 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), što može biti povezano sa adaptivnim odgovorom semena na ovaj stres (Bassard i sar., 2010).



**Slika 4.21.** Bar dijagram za (A) ukupnu antioksidativnu atktivnost (TAA) i (B) sadržaj ukupnih fenola (TPC) metanolnih ekstrakata semena kukuruza različitih koncentracija AFB<sub>1</sub>. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija od tri ponavljanja ( $n=3$ ). Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih nivoa kontaminacije ( $p < 0,05$ ).

U daljoj analizi, ispitana je veza između između TPC i sadržaja ukupnih konjugata poliamina (*DCS*, *CFS*, *cis-DFP*, *CFP*, *DFP*) (Slika 4.22A), konjugata spermidina (*DCS*, *CFS*) (Slika 4.22B) i konjugata putrescina (*cis-DFP*, *CFP*, *DFP*) (Slika 4.22C). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da promenama TPC najveći doprinos daju konjugati putrescina identifikovanih u metanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka semena.



**Slika 4.22.** Korelacija između sadržaja ukupnih fenola (TPC) i (A) ukupnih konjugata poliamina, (B) konjugata spermidina i (C) konjugata putrescina u metanolnim ekstraktima semena kukuruza sa različitim sadržajem aflatoxina B<sub>1</sub>. Oznake 1#, 2#, 3#, 4# i 5# odnose se na koncentraciju AFB<sub>1</sub> od 6,75 µg kg<sup>-1</sup>, 17,07 µg kg<sup>-1</sup>, 51,51 µg kg<sup>-1</sup>, 177,42 µg kg<sup>-1</sup> i 308,13 µg kg<sup>-1</sup>, redom.

#### 4.4. Ispitivanje veze između sadržaja pojedinih metala i nivoa kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom B<sub>1</sub>

Određivan je sadržaj makro- i mikroelemenata u semenima kukuruza koja sadrže različitu koncentraciju aflatoxina primenom *ICP-OES* i *ICP-QMS* tehnika. Ispitivana je veza između sadržaja pojedinih metala i koncentracije AFB<sub>1</sub>, sa ciljem pronalaženja potencijalnih markera kontaminacije semena aflatoksinom. U tabelama 4.10. i 4.11., kao i u tabelama 4.12. i 4.13., prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije sadržaja makro- i mikroelemenata, u unutrašnjoj i spoljašnjoj frakciji semena, redom. Od makroelemenata analizirani su kalijum (K), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg) i natrijum (Na), a dobijene vrednosti su izražene u mg po g uzorka (mg g<sup>-1</sup>). Pored toga, analizirano je ukupno dvanaest mikroelemenata i to su gvožđe (Fe), cink (Zn), bakar (Cu), mangan (Mn), kobalt (Co), nikal (Ni), hrom (Cr), vanadijum (V), aluminijum (Al), arsen (As), kadmijum (Cd) i olovo (Pb). Dobijene vrednosti za mikroelemente izražene su kao µg po g uzorka (µg g<sup>-1</sup>) i predstavljene kao srednja vrednost od tri merenja. Nakon toga je primenjena analiza glavnih komponenti (PCA) na rezultate sadržaja makro- i mikroelemenata u semenima kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom, kako bi se ispitalo njihovo moguće razdvajanje na osnovu sadržaja elemenata (*poglavlje 4.4.1.*).

**Tabela 4.10.** Sadržaj makroelemenata (mg g<sup>-1</sup>) u unutrašnjoj frakciji semena različitog nivoa kontaminacije.

AFB <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )	Ca	K	Mg	Na
Kontrola	1,46±0,11	3,43±0,19	1,50±0,02	0,33±0,03
6,75	1,67±0,14	3,08±0,05	1,40±0,00	0,35±0,04
13,25	1,90±0,08	2,97±0,18	1,33±0,01	0,44±0,01
17,07	1,73±0,06	2,95±0,16	1,45±0,01	0,46±0,05
51,51	1,91±0,10	3,15±0,31	1,44±0,00	0,41±0,05
61,00	1,79±0,07	2,76±0,26	1,41±0,01	0,40±0,03
105,00	0,92±0,08	3,21±0,16	1,26±0,02	0,26±0,03
151,94	0,98±0,08	2,97±0,20	1,17±0,03	0,25±0,01
177,42	1,05±0,06	2,36±0,07	1,37±0,02	0,28±0,02
248,00	1,02±0,17	2,63±0,09	1,32±0,02	0,23±0,02
299,00	1,22±0,07	2,89±0,14	1,26±0,02	0,28±0,05
308,13	1,20±0,07	2,77±0,30	1,24±0,02	0,32±0,05

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).

**Tabela 4.11.** Sadržaj makroelemenata ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u spoljašnjoj frakciji semena različitog nivoa kontaminacije.

<b>AFB<sub>1</sub></b> <b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Ca</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>
Kontrola	1,85±0,07	1,42±0,08	0,68±0,01	0,42±0,01
6,75	1,18±0,20	1,14±0,22	0,54±0,00	0,28±0,06
13,25	1,19±0,08	1,72±0,11	0,61±0,01	0,30±0,04
17,07	2,03±0,05	1,37±0,22	0,82±0,01	0,46±0,02
51,51	1,57±0,13	1,50±0,22	0,66±0,01	0,36±0,03
61,00	0,78±0,09	1,18±0,24	0,46±0,01	0,23±0,03
105,00	0,88±0,09	1,22±0,31	0,42±0,01	0,29±0,02
151,94	0,92±0,03	2,24±0,12	0,73±0,01	0,3±0,021
177,42	1,31±0,02	1,26±0,19	0,69±0,01	0,34±0,03
248,00	0,99±0,10	1,16±0,01	0,66±0,00	0,29±0,04
299,00	1,25±0,04	1,70±0,11	0,65±0,00	0,35±0,02
308,13	1,10±0,06	1,84±0,09	0,70±0,01	0,26±0,05

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=3).

**Tabela 4.12.** Sadržaj mikroelemenata ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) u unutrašnjoj frakciji semena različitog nivoa kontaminacije.

AFB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Al	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Fe
Kontrola	32,50±0,78	0,57±0,03	0,75±0,02	6,88±0,03	0,15±0,00	2,34±0,03	7,70±0,05	9,61±0,11	0,21±0,01	0,90±0,05	1,10±0,01	27,64±0,38
6,75	26,56±0,25	0,36±0,01	0,79±0,00	6,33±0,05	0,14±0,00	1,51±0,02	5,18±0,07	8,38±0,05	0,20±0,00	0,62±0,01	0,85±0,00	18,61±0,35
13,25	26,12±0,53	0,32±0,01	0,74±0,01	7,14±0,04	0,12±0,00	1,17±0,01	5,88±0,02	9,12±0,10	0,20±0,00	0,50±0,01	0,76±0,01	14,57±0,29
17,07	34,26±0,18	0,34±0,00	0,88±0,01	6,54±0,09	0,13±0,00	1,06±0,01	5,96±0,10	9,97±0,04	0,22±0,00	0,55±0,00	0,68±0,01	14,27±0,08
51,51	32,03±0,39	0,29±0,00	0,98±0,01	8,06±0,08	0,13±0,00	1,45±0,01	8,78±0,15	11,00±0,16	0,22±0,00	0,46±0,01	0,99±0,02	22,68±0,27
61,00	36,83±0,60	0,29±0,00	1,01±0,03	9,76±0,12	0,13±0,00	1,57±0,03	7,08±0,03	13,69±0,04	0,19±0,00	0,46±0,01	0,41±0,00	22,03±0,20
105,00	32,72±0,37	0,30±0,00	0,86±0,02	10,47±0,08	0,12±0,00	1,60±0,01	4,86±0,06	15,31±0,26	0,19±0,00	0,47±0,00	0,49±0,01	16,31±0,08
151,94	33,18±0,21	0,30±0,00	0,87±0,02	8,12±0,04	0,13±0,00	1,93±0,04	5,45±0,04	16,42±0,08	0,21±0,00	0,49±0,00	0,43±0,01	12,13±0,03
177,42	33,90±0,71	0,28±0,00	0,87±0,02	9,50±0,03	0,13±0,00	1,57±0,01	5,38±0,06	16,01±0,20	0,19±0,00	0,46±0,01	0,49±0,01	12,36±0,08
248,00	32,71±0,14	0,28±0,00	0,87±0,00	7,93±0,21	0,13±0,00	1,42±0,01	5,50±0,03	15,16±0,05	0,20±0,00	0,45±0,00	0,39±0,00	12,06±0,22
299,00	37,92±0,11	0,29±0,00	0,97±0,02	10,89±0,08	0,16±0,00	2,46±0,02	6,07±0,10	18,19±0,15	0,20±0,00	0,45±0,00	0,44±0,00	14,24±0,05
308,13	35,98±0,38	0,34±0,00	1,3±0,016	11,15±0,21	0,16±0,01	1,29±0,02	5,04±0,08	15,50±0,38	0,24±0,00	0,54±0,00	1,08±0,01	17,44±0,35

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=3).

**Tabela 4.13.** Sadržaj mikroelemenata ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) u spoljašnjoj frakciji semena različitog nivoa kontaminacije.

AFB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Al	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Fe
Kontrola	23,87±0,04	0,35±0,01	0,68±0,01	4,19±0,05	0,14±0,00	1,61±0,01	5,87±0,03	2,88±0,03	0,19±0,00	0,57±0,02	0,53±0,00	11,13±0,10
6,75	20,16±0,29	0,33±0,01	0,66±0,00	3,25±0,03	0,12±0,00	0,71±0,03	3,91±0,01	2,27±0,09	0,20±0,00	0,55±0,01	0,42±0,00	7,28±0,16
13,25	20,88±0,04	0,32±0,01	0,74±0,02	4,78±0,06	0,12±0,00	1,95±0,02	4,66±0,07	3,21±0,02	0,20±0,00	0,51±0,01	0,40±0,00	7,39±0,16
17,07	34,96±0,89	0,30±0,00	0,83±0,01	4,90±0,08	0,15±0,00	1,70±0,03	6,45±0,09	5,56±0,10	0,20±0,00	0,49±0,01	0,56±0,01	10,73±0,13
51,51	34,00±0,31	0,29±0,00	0,88±0,03	4,67±0,06	0,12±0,00	0,96±0,01	5,39±0,07	4,90±0,05	0,19±0,00	0,48±0,01	0,56±0,00	8,28±0,06
61,00	27,95±0,25	0,30±0,00	0,88±0,01	4,75±0,10	0,15±0,00	1,48±0,02	4,17±0,02	8,64±0,11	0,20±0,00	0,50±0,01	0,41±0,00	7,67±0,19
105,00	31,17±0,43	0,32±0,00	0,99±0,02	5,25±0,05	0,14±0,00	1,63±0,04	4,33±0,01	7,76±0,05	0,22±0,00	0,53±0,00	0,49±0,00	7,00±0,24
151,94	33,85±0,13	0,30±0,00	1,01±0,02	7,54±0,04	0,15±0,00	1,87±0,02	6,08±0,06	13,83±0,28	0,21±0,00	0,50±0,00	0,70±0,02	9,65±0,32
177,42	39,20±0,41	0,31±0,00	1,00±0,03	6,47±0,07	0,16±0,00	2,60±0,04	6,08±0,01	10,47±0,06	0,22±0,00	0,52±0,00	0,46±0,01	8,21±0,14
248,00	32,88±0,32	0,28±0,00	0,87±0,01	5,48±0,03	0,16±0,00	2,80±0,04	5,34±0,13	10,60±0,14	0,20±0,00	0,45±0,00	0,42±0,00	7,15±0,27
299,00	37,24±0,16	0,28±0,00	0,99±0,02	7,07±0,07	0,16±0,00	4,37±0,06	6,57±0,15	13,20±0,03	0,20±0,01	0,45±0,00	0,53±0,01	10,85±0,11
308,13	32,54±0,55	0,28±0,00	0,94±0,02	8,33±0,12	0,17±0,00	1,24±0,01	4,65±0,06	8,46±0,08	0,20±0,00	0,45±0,05	0,38±0,00	6,97±0,15

\*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=3).

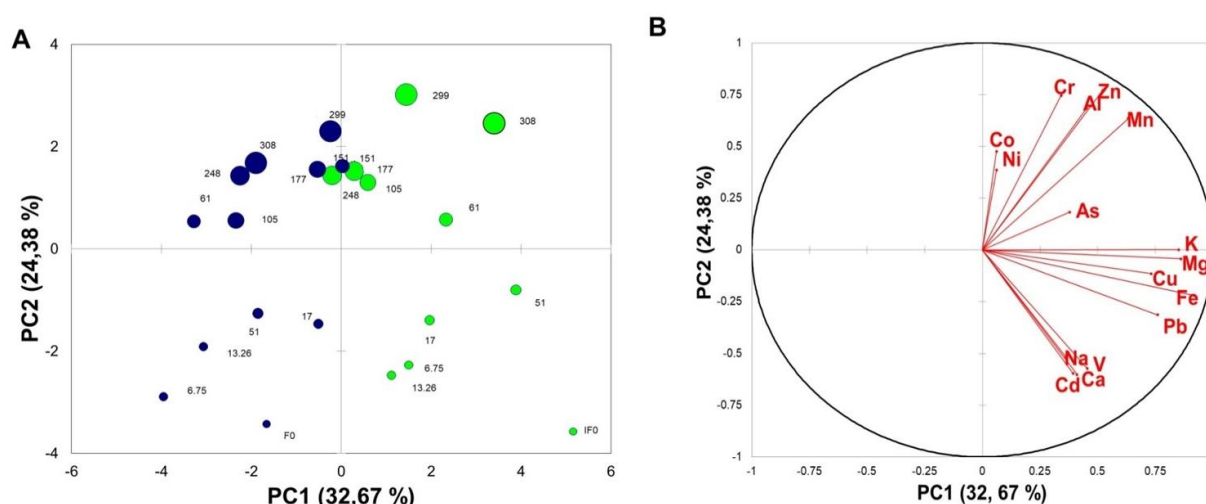
#### 4.4.1. PCA analiza primenjena na sadržaj elemenata

Na **slici 4.23.** prikazane su projekcije uzoraka unutrašnje i spoljašnje frakcije semena različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom (skorovi) i projekcije promenljivih tj. elemenata (*loading*-ovi) za prvu i drugu glavnu komponentu (*PC1* vs. *PC2*). *PC1* i *PC2* opisuju 57% totalne varijacije, pri čemu 32,7% odnosi na *PC1*, a 24,4% na *PC2*.

Može se uočiti jasno razdvajanje unutrašnje (zelena boja) i spoljašnje (plava boja) frakcije kod svih ispitivanih semena duž *PC1* dimenzije. Kako je ova dimenzija pozitivno korelisana sa sadržajem elemenata Fe, Pb, Cu, K i Mg to znači da unutrašnje frakcije imaju više vrednosti ovih elemenata u odnosu na spoljašnje frakcije.

Dobijeni rezultati pokazuju da je K dominantan od makro-elemenata, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Nešković i sar.,2003). S druge strane, Fe je bio najzastupljeniji među analiziranim mikroelementima u ispitivanim uzorcima.

Na **slici 4.23.**, duž *PC2* ose uočava se jasno razdvajanje uzoraka semena sa manjim i većim koncentracijama AFB<sub>1</sub>. Uzorci semena su predstavljeni tako da je veličina kruga srazmerna koncentraciji AFB<sub>1</sub>. Ovo razdvajanje se može objasniti većim sadržajem Zn, Mn, Cr, i Al i nižim sadržajem Cd, Ca, i Na kod visoko-kontaminiranih semena.

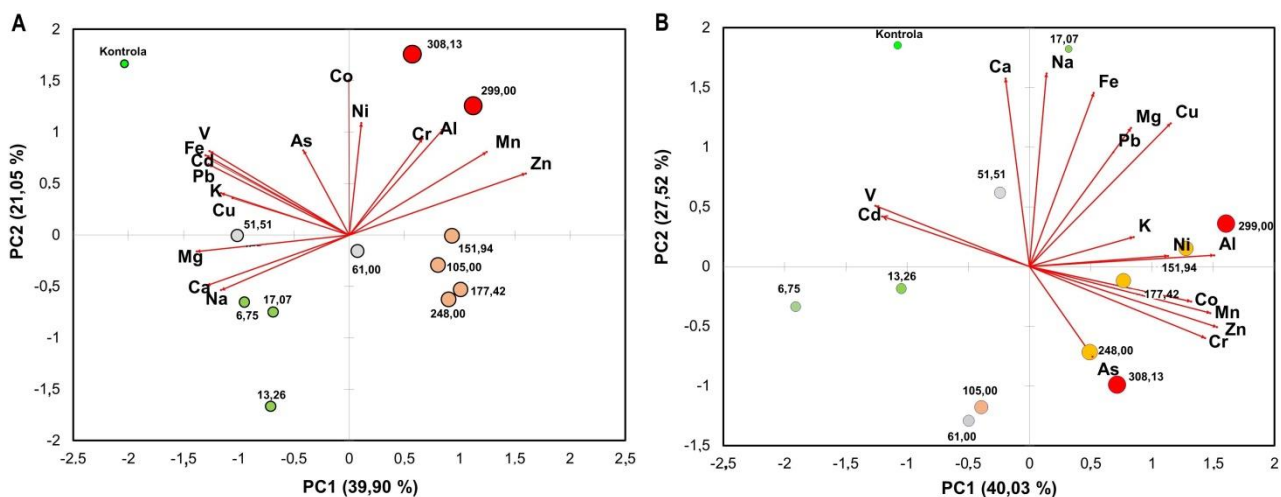


**Slika 4.23.** Grafički prikaz skorova (**A**) i *loading*-ova (**B**) u prostoru definisanom sa prve dve glavne komponente (*PC1* vs. *PC2*). Unutrašnja i spoljašnja frakcija analiziranih semena markirane su zelenom i plavom bojom, redom. Veličina kruga na slici A srazmerna je koncentraciji AFB<sub>1</sub>.

Na **Slici 4.24.**, prikazani su biplotovi (*PC1* vs. *PC2*) varijacija između sadržaja elemenata i različitih koncentracija AFB<sub>1</sub> kod unutrašnje (**A**) i spoljašnje (**B**) frakcije semena.

PCA analiza rezultata kod unutrašnje frakcije kontaminiranih uzoraka semena (**Slika 4.24A**), pokazuje da prve dve glavne komponente objašnjavaju zajedno 69,96% varijanse. *PC1* (koja objašnjava 39,90% ukupne varijacije) pozitivno je korelisana sa Zn i Mn, negativno sa Cd, Pb, Fe, V, Ca, K, Mg i Na i razdvaja semena sa visokim koncentracijama AFB<sub>1</sub> od ostalih semena. Kako vektori Zn i Mn zaklapaju oštar ugao i imaju veliku magnitudu to znači da su ova dva elementa visoko pozitivno korelisana. U **Tabeli 4.14.** data je korelaciona matrica među elementima u unutrašnjim frakcijama semena.

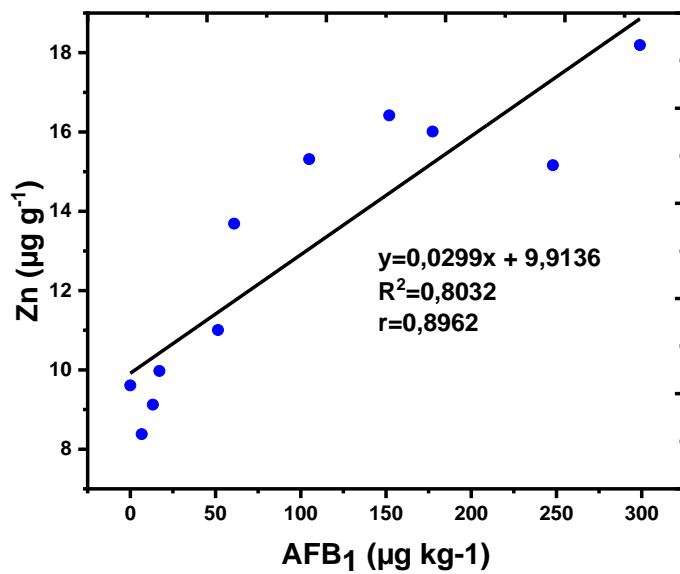
Kod spoljašnje frakcije ispitivanih semena (**Slika 4.24B**), ukupna varijansa za prve dve komponente je 67,55%. PC1 (koja objašnjava 40,03% ukupne varijacije) komponentu opisuju Zn, Al, Mn, Ni, Co, Cr i V. Među njima, najveći doprinos potiče od Zn (0,801), koji diskriminiše semena sa visokim sadržajem aflatoksina od ostalih semena. PC2 (koja objašnjava 27,52% totalne varijacije) definišu najviše Na (0,8956), Ca (0,8486), Fe (0,7246), a takođe Cu (0,494) i Mg (0,462). Na osnovu **Tabele 4.15**, mogu se uočiti korelacije između ovih elemenata u spoljašnjim frakcijama semena.



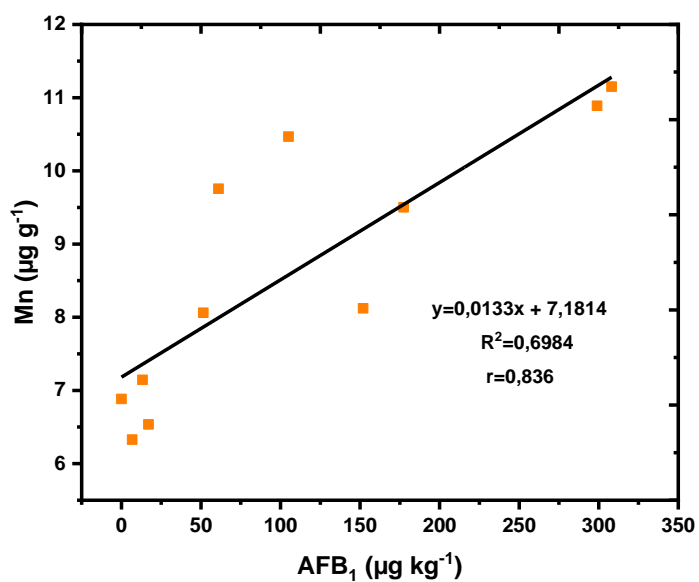
**Slika 4.24.** Biplotovi ( $PC1$  vs.  $PC2$ ) za sadržaj pojedinih elemenata u (A) unutrašnjoj i (B) spoljašnjoj frakciji semena različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom. Elementi su predstavljeni vektorima, dok su uzorci sa kružićima (različite boje i veličine).

Na osnovu navedenih rezultata, uočava se da u unutrašnjim frakcijama semena postoji veće grupisanje uzoraka po sličnosti kontaminacije, nego u spoljašnjim frakcijama, što znači da su ovi uzorci u unutrašnjoj frakciji homogeniji u pogledu sadržaja analiziranih elemenata. U obe frakcije, kod visoko kontaminiranih uzoraka semena utvrđen je veći sadržaj Zn i Mn. Zbog toga je i dalje ispitana korelacija ovih prelaznih metala sa porastom koncentracije AFB<sub>1</sub>. Dobijeni rezultati pokazuju da postoji značajno visoka linearna zavisnost između sadržaja Zn i koncentracije AFB<sub>1</sub> u unutrašnjoj frakciji semena ( $r=0,896$ ) (**Slika 4.25.**), kao i u spoljašnjoj frakciji ( $r=0,871$ ) (nije prikazano). Naime, ranije je pokazano da Zn<sup>2+</sup> joni stimulišu biosintezu aflatoksina (Wee i sar., 2016; Caceres i sar., 2020), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Iz **tabela 4.14.** i **4.15.** (**Slika 4.25A i B**), uočava se visoka pozitivna korelacija Zn i Mn kod obe frakcije semena, što znači da se sadržaj Mn menja na sličan način kao i kod Zn, odnosno sa promenom kontaminacije. Utvrđena je visoka značajna pozitivna linearna zavisnost između sadržaja Mn i koncentracije AFB<sub>1</sub> u unutrašnjoj frakciji ( $r=0,836$ ) (**Slika 4.26.**), kao i u spoljašnjoj frakciji (0,903). U literaturi se navodi da Mn ima ulogu u stimulaciji sinteze pojedinih fenolnih jedinjenja i da učestvuje u brojnim odbrambenim mehanizmima kod biljke (Cabot i sar., 2020), što može ukazati da jačina stresa u semenu izazvana aflatoksinom utiče na odgovor semena koji uključuje povećanje sadržaja Mn. Sadržaj Mn i Zn mogu da se izdvoje kao markeri kontaminacije semena aflatoksinom.





Slika 4.25. Zavisnost sadržaja Zn od koncentracije  $\text{AFB}_1$  u unutrašnjoj frakciji semena kukuruza.



Slika 4.26. Zavisnost sadržaja Mn od koncentracije  $\text{AFB}_1$  u unutrašnjoj frakciji semena kukuruza.

**Tabela 4.14.** Korelacioni matiks analiziranih elemenata u unutrašnjim frakcijama semena.

Elementi	Al	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Fe	Ca	K	Mg	Na
Al	1															
V	-0,172	1														
Cr	<b>0,634</b>	-0,297	1													
Mn	<b>0,694</b>	<b>-0,415</b>	<b>0,695</b>	1												
Co	0,446	0,379	<b>0,504</b>	0,330	1											
Ni	0,351	0,381	-0,148	0,225	<b>0,517</b>	1										
Cu	0,086	0,309	-0,047	-0,238	0,036	0,218	1									
Zn	<b>0,711</b>	<b>-0,507</b>	<b>0,469</b>	<b>0,817</b>	0,232	0,364	-0,359	1								
As	0,143	0,234	<b>0,583</b>	-0,030	<b>0,478</b>	-0,223	0,150	-0,133	1							
Cd	-0,225	<b>0,992</b>	-0,322	-0,471	0,369	0,351	0,267	<b>-0,543</b>	0,225	1						
Pb	-0,305	<b>0,643</b>	0,164	-0,279	0,394	-0,102	0,379	<b>-0,599</b>	<b>0,680</b>	<b>0,644</b>	1					
Fe	-0,022	<b>0,679</b>	0,014	-0,161	0,253	0,265	<b>0,725</b>	<b>-0,494</b>	0,166	<b>0,658</b>	<b>0,643</b>	1				
Ca	-0,362	0,159	-0,128	<b>-0,501</b>	-0,138	-0,341	<b>0,603</b>	<b>-0,779</b>	0,147	0,164	<b>0,438</b>	<b>0,492</b>	1			
K	-0,316	<b>0,629</b>	-0,328	-0,358	0,052	0,300	0,396	<b>-0,512</b>	0,178	<b>0,610</b>	<b>0,509</b>	<b>0,630</b>	0,292	1		
Mg	-0,191	<b>0,500</b>	-0,326	<b>-0,560</b>	-0,073	-0,109	<b>0,641</b>	<b>-0,722</b>	-0,030	<b>0,514</b>	<b>0,422</b>	<b>0,644</b>	<b>0,664</b>	0,258	1	
Na	-0,265	0,127	-0,050	<b>-0,435</b>	-0,194	<b>-0,490</b>	<b>0,461</b>	<b>-0,733</b>	0,248	0,123	<b>0,419</b>	0,359	<b>0,934</b>	0,227	<b>0,606</b>	1

\*Statistički značajni koeficijenti korelacije na nivou značajnosti 5% su podebljani.

**Tabela 4.15.** Korelaciona matrica analiziranih elemenata u spoljašnjim frakcijama semena.

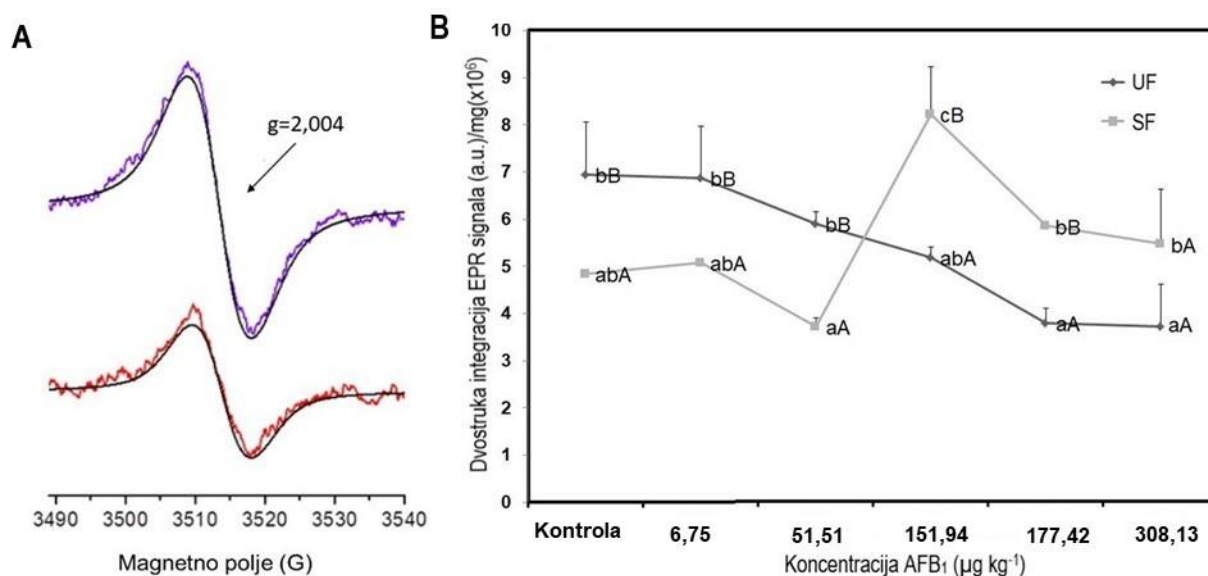
Elementi	Al	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Fe	Ca	K	Mg	Na
Al	1															
V	<b>-0,670</b>	1														
Cr	<b>0,843</b>	<b>-0,626</b>	1													
Mn	<b>0,652</b>	<b>-0,625</b>	<b>0,781</b>	1												
Co	<b>0,664</b>	<b>-0,550</b>	<b>0,620</b>	<b>0,755</b>	1											
Ni	<b>0,507</b>	-0,394	<b>0,448</b>	<b>0,430</b>	<b>0,516</b>	1										
Cu	<b>0,649</b>	-0,228	0,325	0,372	0,393	<b>0,601</b>	1									
Zn	<b>0,743</b>	<b>-0,648</b>	<b>0,865</b>	<b>0,782</b>	<b>0,736</b>	<b>0,655</b>	<b>0,433</b>	1								
As	0,372	0,021	<b>0,617</b>	0,344	0,299	0,195	-0,024	<b>0,467</b>	1							
Cd	<b>-0,583</b>	<b>0,975</b>	<b>-0,529</b>	<b>-0,617</b>	<b>-0,537</b>	-0,447	-0,240	<b>-0,577</b>	0,120	1						
Pb	0,381	0,001	0,305	0,186	-0,034	0,103	<b>0,650</b>	0,325	0,046	0,068	1					
Fe	0,244	0,130	-0,037	0,052	0,140	0,375	<b>0,816</b>	0,114	-0,287	0,100	<b>0,672</b>	1				
Ca	0,051	0,264	-0,413	-0,301	-0,173	-0,081	<b>0,551</b>	<b>-0,477</b>	<b>-0,459</b>	0,207	0,286	<b>0,660</b>	1			
K	0,167	-0,259	0,329	<b>0,671</b>	0,148	0,131	0,349	0,379	-0,044	-0,298	<b>0,509</b>	0,286	-0,072	1		
Mg	<b>0,418</b>	-0,264	0,044	0,366	0,316	0,183	<b>0,771</b>	0,144	-0,246	-0,305	<b>0,429</b>	<b>0,564</b>	<b>0,635</b>	<b>0,455</b>	1	
Na	0,226	0,225	-0,206	-0,197	-0,071	0,138	<b>0,735</b>	-0,245	-0,270	0,179	<b>0,497</b>	<b>0,790</b>	<b>0,937</b>	-0,008	<b>0,642</b>	1

\*Statistički značajni koeficijenti korelacije na nivou značajnosti 5% su podebljani.

## 4.5. Analiza uzoraka EPR metodom

### 4.5.1. Analiza slobodnih organskih radikala u ispitivanim uzorcima pomoću EPR spektroskopije

EPR je primenjena u detekciji i kvantifikaciji slobodnih radikala u unutrašnjoj i spoljašnjoj frakciji semena kukuruza različitog sadržaja aflatoksina. Kod svih analiziranih uzoraka, zabeležen je EPR signal u X-oblasti koji ima  $g$ -vrednost na oko 2,004. Ova vrednost je karakteristična za stabilne organske radikale kao što su semihinon (Bährle i sar., 2015; Patil i Argyropoulos, 2017) ili radikali ugljenih-hidrata (Łabanowska i sar., 2013). Obe analizirane frakcije imaju sličan oblik EPR spektra (slika 4.27a). Ispitan je uticaj koncentracije AFB<sub>1</sub> na sadržaj slobodnih organskih radikala u semenu (slika 4.27b). Naime, kod unutrašnje frakcije je porast nivoa kontaminacije aflatoksinom (od 151,94  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) dovelo do značajnog smanjenja intenziteta EPR signala. To se može objasniti izmenjenom sposobnošću različitih biomolekula poput ugljenih-hidrata da hvataju elektrone (Łabanowska i sar., 2013) u uslovima oksidativnog stresa izazvanim visokim koncentracijama aflatoksina. Najveći intenzitet EPR signala utvrđen je kod spoljašnje frakcije semena koncentracije AFB<sub>1</sub> od 151,94  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , dok se pri višim koncentracijama AFB<sub>1</sub> (177,42  $\mu\text{g kg}^{-1}$  i 308,13  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) uočava blagi pad u intenzitetu EPR signala do koga verovatno dolazi usled kuplovanja radikala u rastući polimer lignina (Boerjan i sar., 2003; Lewis i Yamamoto, 1990). Pokazano je prvi put, u ovoj disertaciji, da unutrašnja i spoljašnja frakcija semena različito reaguju na povećanje nivoa kontaminacije aflatoksinom u odnosu na koncentraciju slobodnih organskih radikala. Dalja istraživanja bi omogućila detaljniji uvid o molekulskim strukturama koje doprinose ovim promenama.

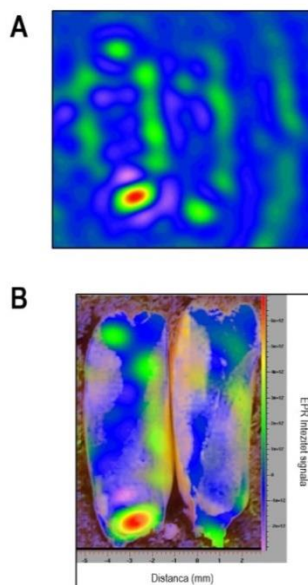


**Slika 4.27.** (A) Reprezentativni simulirani (crna boja) i eksperimentalno dobijeni EPR spektri u X-oblasti na sobnoj temperaturi, za unutrašnju (crvena boja) i spoljašnju (ljubičasta boja) frakciju semena kontaminiranog aflatoksinom. Za dobijanje spektra primenjeno je 30 akumulacija. (B) Promena u koncentraciji u odnosu na koncentraciju AFB<sub>1</sub> unutar iste frakcije (UF i SF su označene sa crnom i sivom bojom). Velika slova predstavljaju razlike između frakcija za svaku pojedinačnu koncentraciju AFB<sub>1</sub>, dok mala slova prikazuju razlike između pojedinih koncentracija AFB<sub>1</sub> unutar zasebnih frakcija. Različita slova prikazuju statistički značajne razlike.

#### 4.5.2. Ispitivanje uticaja aflatoksina na redoks status semena *Zea mays* L. primenom dvodimenzionalnog (2D) EPR imidžinga

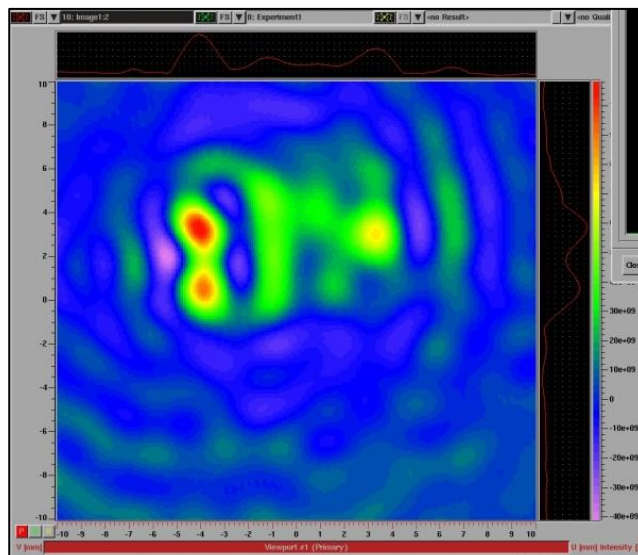
U literaturi nema puno podataka o slobodno-radikalском metabolizmu semena koja sadrže aflatoksine. U cilju ispitivanja uticaja prisustva aflatoksina u semenu kukuruza na njegov redoks status, kao i na prostornu raspodelu slobodnih radikala, rađen je dvodimenzionalni (2D) EPR imidžing u L-oblasti na semenima (kontrola i kontaminirana) posle imbibicije odgovarajućom spinskom probom. Na **slici 4.28A** dat je reprezentativan rezultat EPR imidžinga ispitivanih uzoraka semena posle usvajanja 3-karboksi-proksil (3C<sub>x</sub>P) spinske probe. Na slici mogu da se uoče jasne razlike u intenzitetu i prostornoj distribuciji 3C<sub>x</sub>P spinske probe kod kontrolnih uzoraka i kontaminiranih aflatoksinom. To ukazuje na različito okruženje spinske probe unutar analiziranih semena. Intenzitet je vizuelizovan različitom bojom od ljubičaste ka crvenoj, koje označavaju redom potprosečne i natprosečne vrednosti koncentracije spinski aktivne probe.

Poznato je da gašenje EPR aktivnih spinskih proba uglavnom nastaje jedno-elektronskom redukcijom u odgovarajući EPR neaktivni oblik hidroksilamina (Maulucci i sar., 2016; Bačić i sar., 2016), kao i redukcijom sa dvo-elektronskim donorima poput NADPH i tiola (Bačić i sar., 2016). Osim toga, u prisustvu različitih oksidanata mogu nastati oksoamonijum katjoni koji su takođe EPR neaktivni oblici. Stoga, kako je gašenje spinski aktivne probe brže u kontaminiranim semenima nego u kontroli, može da se zaključi da je kontaminacija aflatoksinom dovela do promena redoks statusa u semenu. Prema literaturnim podacima aflatoksini su fitotoksična jedinjenja (Ismail i Papenbrock, 2015), koja mogu dovesti do oksidativnih oštećenja u biljci, što ide u prilog dobijenim rezultatima. Osim toga, aminoksil spinske probe imaju antioksidativnu ulogu u biološkim sistemima (Utsumi i sar., 2006). Može da se pretpostavi da je koncentracija endogenih ROS veća u kontaminiranim uzorcima semena nego u kontroli, što može dovesti do ubrzane redukcije spinske probe i posledično gašenja EPR signala. Na **slici 4.28B** prikazana je projekcija 2D EPR imidžinga nad sagitalnim presekom semena. Kada se posmatra distribucija i intenzitet ove probe duž sagitalnog dela analiziranih semena, najizraženija promena uočava se na vrhu kapice semena i u njegovim površinskim slojevima. To je u skladu sa hidrofilnom prirodom 3C<sub>x</sub>P probe, koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu i uglavnom se redukuje u ekstraćelijskim kompartmentima.



**Slika 4.28.** Prostorna vizuelizacija signala 3C<sub>x</sub>P spinske probe kod kontrolnog uzorka (levo) i aflatoksinom kontaminiranog semena (desno) (**A**) prikazan je 2D EPR imidžing i (**B**) njegova projekcija nad fotografijom sagitalnog preseka semena (L-oblast). 2D EPR imidžing je rađen u XY ravni u odnosu na samo seme. EPR intenzitet signala izražen je na osnovu skale za boju, pri čemu je najniži (ili odsustvo) i najveći intenzitet prikazan, redom ljubičastom i crvenom bojom.

Takođe, proučen je uticaj aflatoksina na redoks status semena nakon usvajanja 3-karbamoil-proksil (3CP) spinske probe (**Slika 4.29.**). Princip delovanja ove spinske probe isti je kao i za 3CxP. Osnovna razlika između njih je u lipofilnosti, koja utiče na različitu distribuciju unutar semena. To ima uticaja i na vrstu redukujućih agenasa sa kojim stupaju u kontakt. Najjači signal 3CP probe zabeležen je u metabolički aktivnijim strukturama semena, poput klice. Kao što je navedeno, uočeno gašenje EPR signala ukazuje na promene u fiziologiji semena, kao i na redoks disbalans koji je usmeren ka oksidativnom stresu.

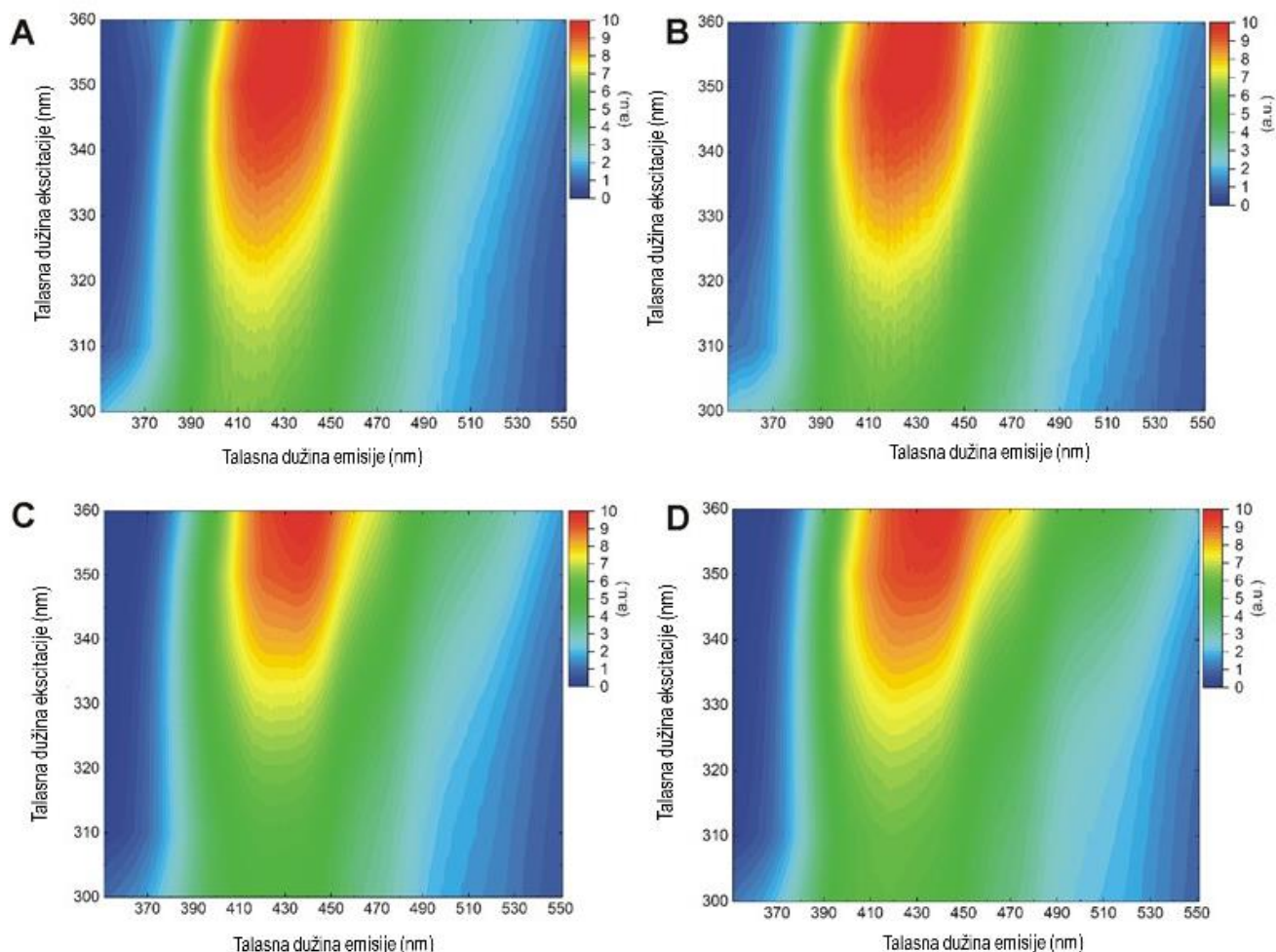


**Slika 4.29.** 2D EPR imidžing za kontrolno (levo) i aflatoksin-kontaminirano (desno) seme kukuruza projekcija u ZX ravni (L-oblast). Signal potiče od 3CP spin aktivne probe.

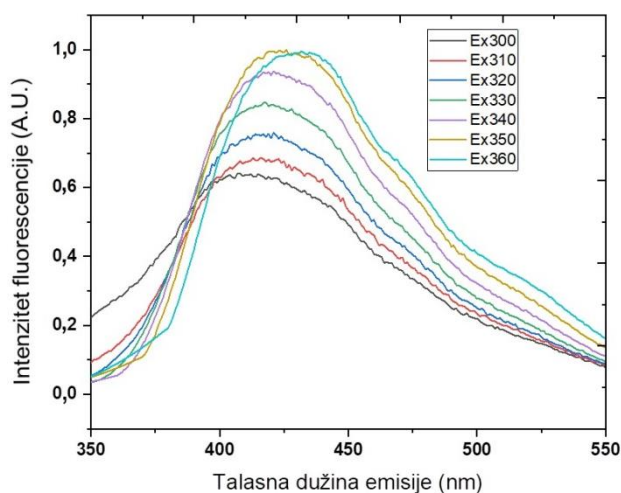
## 4.6. Analiza uzoraka fluorescentnom spektroskopijom

### 4.6.1. Analiza fluorescentnih EEM i primena MCR-ALS algoritma

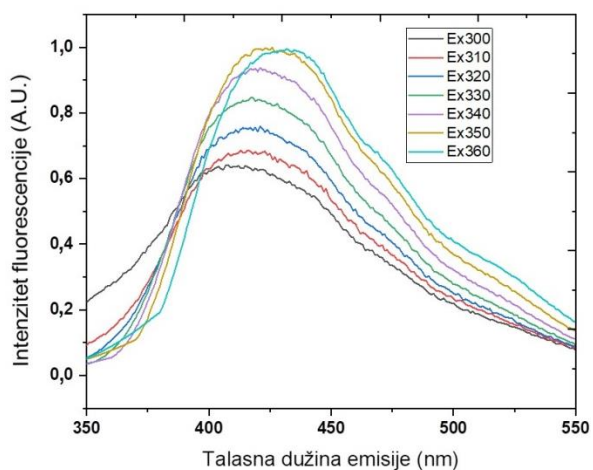
Na slici 4.30. prikazani su reprezentativni konturni grafici ekscitaciono-emisionih matrica (EEM) za (A) komercijalno brašno kukuruza, (B) kontrolu (bez aflatoksina) i kontaminirane uzorake semena sa AFB<sub>1</sub> koncentracije (C) 27 µg kg<sup>-1</sup> i (D) 486 µg kg<sup>-1</sup>. Na slikama 4.31-4.34. prikazani su emisijski spektri dobijeni ekscitovanjem na različitim talasnim dužinama (EEM).



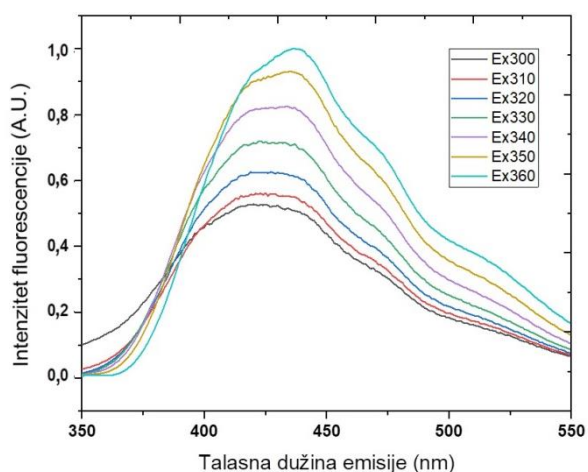
**Slika 4.30.** Reprezentativni konturni grafici EEM (A) komercijalnog brašna kukuruza (B) kontrole (bez aflatoksina) i kontaminiranih uzoraka semena sa AFB<sub>1</sub> koncentracije (C) 27 µg kg<sup>-1</sup> i (D) 486 µg kg<sup>-1</sup>. Intenzitet fluorescencije izražen je na osnovu skale za boju od plave (minimum) ka crvenoj (maksimum).



**Slika 4.31.** Emisioni spektar komercijalnog uzorka kukurznog brašna, na različitim talasnim dužinama ekscitacije.

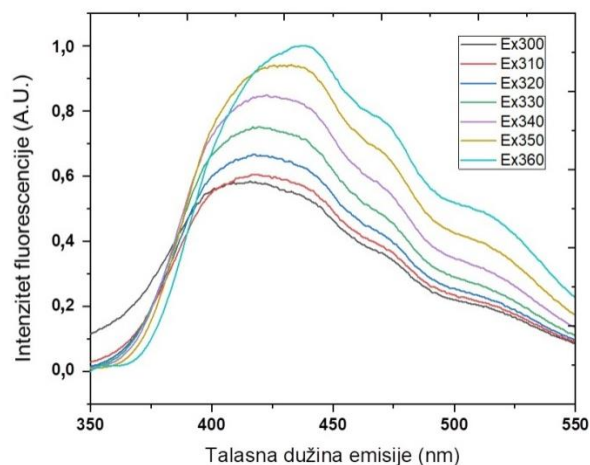


**Slika 4.32.** Emisioni spektar kontrolnih uzoraka, tj. semena kukuruza kod kojih nije utvrđeno prisustvo AFB<sub>1</sub>, na različitim talasnim dužinama ekscitacije.



**Slika 4.33.** Emisioni spektar nisko kontaminiranih uzoraka semena sa AFB<sub>1</sub> (27 µg kg<sup>-1</sup>), na različitim talasnim dužinama ekscitacije.



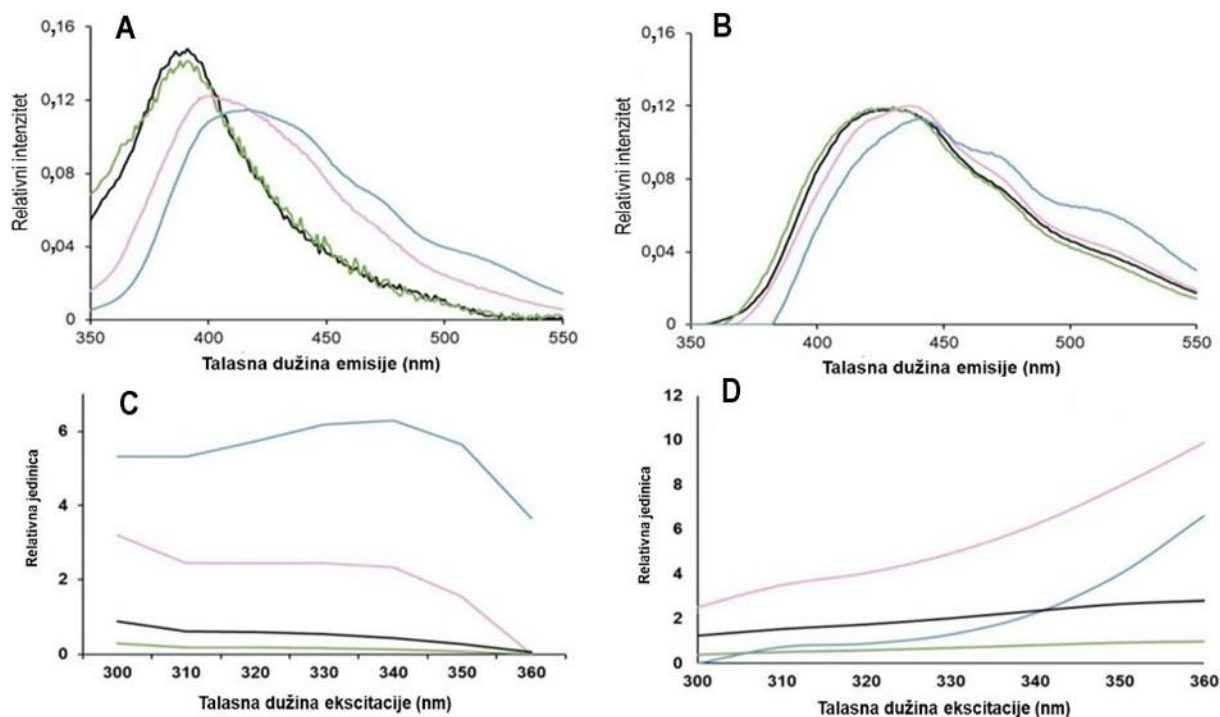


**Slika 4.34.** Emisioni spektar visoko kontaminiranih uzoraka semena sa AFB<sub>1</sub> (486 µg kg<sup>-1</sup>), na različitim talasnim dužinama ekscitacije.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti prisustvo intenzivnog pika fluorescencije u spektralnom regionu koji obuhvata emisiju od 410 nm do 470 nm i ekscitaciju od 330 nm do 360 nm. Ove emisione trake su karakteristične za fluorofore fenolnih jedinjenja (Andersoni Mortensen, 2008; Christensen i sar., 2006). Takođe, u ovom spektralnom regionu aflatoksin pokazuje autofluorescenciju (Hashemi i sar., 2008). Kontrolni uzorci i komercijalno kukuruzno brašno pokazuju slične EEM-e. S druge strane, u uzorcima koji sadrže AFB<sub>1</sub> uočava se karakterističan crveni pomeraj, koji je izraženiji sa povećanjem nivoa kontaminacije, što je u skladu sa literaturnim podacima (Hashemi i sar., 2008).

Za analizu ovih multidimenzionalnih sistema, tj. EEM, korišćena je MCR-ALS metoda, u cilju ekstrahovanja optimalnog broja čistih komponenti i njihovih spektralnih profila u cilju utvrđivanja da li promena broja komponenti emisionih spektara i položaja njihovih maksimuma u uzorcima koji sadrže aflatoksin, može biti indikator prisustva aflatoksina u semenu. Dobijeni rezultati pokazuju da je broj optimalnih spektralnih komponenti 2 u svim ispitivanim uzorcima. Ove komponente odgovaraju različitim fluoroforama. Kod uzoraka komercijalnog kukuruznog brašna i kontrole, prva spektralna komponenta (C1) ima položaj emisionog maksimuma na oko 393 nm (**Slika 4.35A**), a druga (C2) na oko 435 nm (**Slika 4.35B**).

Ispitivanjem uzoraka koji sadrže različitu koncentraciju AFB<sub>1</sub>, pokazano je da su položaji emisionih maksimuma kod obe spektralne komponente više pomereni ka većim talasnim dužinama u odnosu na iste komponente analizirane kod kontrole i komercijalnog brašna. Takođe, utvrđen je njihov crveni pomeraj sa porastom nivoa kontaminacije aflatoksinom. Kod uzoraka semena manjeg (27 µg kg<sup>-1</sup>) i većeg (486 µg kg<sup>-1</sup>) stepena kontaminacije, pozicije emisionih maksimuma prve komponente su bile, redom, na oko 402 nm i 420 nm. Druga spektralna komponenta pokazuje emisioni maksimum na oko 442 nm. Poznato je da aflatoksin B<sub>1</sub> ima emisioni maksimum na oko 440 nm (Maragos i sar., 2008; Hashemi i sar., 2008). Međutim, uočava se da je oblik spektra druge emisione komponente znatno složeniji sa porastom nivoa kontaminacije (**Slika 4.35B**), sa izraženijim sekundarnim pikovima na oko 475 nm i 530 nm, što nam ukazuje da koncentracija AFB<sub>1</sub> može imati uticaja i na druge fluorofore u semenu, koje mogu biti izmenjene u uslovima oksidativnog stresa.



**Slika 4.35.** Preklapanje emisijonih profila prve (A) i druge (B) spektralne komponente i njihovih ekscitacionih (koncentracijonih) profila (C, D), redom. Različito obojene krive odgovaraju ispitivanim uzorcima: crna -komercijalno kukuruzno brašno, zelena- kontrola, roza i tirkizna se odnose na uzorke semena čija je koncentracija AFB<sub>1</sub> (27 µg kg<sup>-1</sup>) i (486 µg kg<sup>-1</sup>).

Na **slici 4.35C** i **4.35D** dati su odgovarajući ekscitacioni (ili koncentracijonni) profili prve i druge komponente (**4.35A** i **4.35B**). Naime, ekscitacioni profili su u korelaciji sa kvantnim prinosima odgovarajućih fluorofora u ispitivanim uzorcima. U **tabeli 4.16.** prikazane su površine prve i druge spektralne komponente, koje su dalje pomnožene sa odgovarajućim ekscitacionim profilima. Zatim, određen je odnos između površina prve i druge spektralne komponente C1/C2 na različitim talasnim dužinama ekscitacije (**Tabela 4.17.**). Na osnovu dobijenih rezultata, može da se zaključida je odnos C1/C2 proporcionalan intenzitetu kontaminacije aflatoksinom.

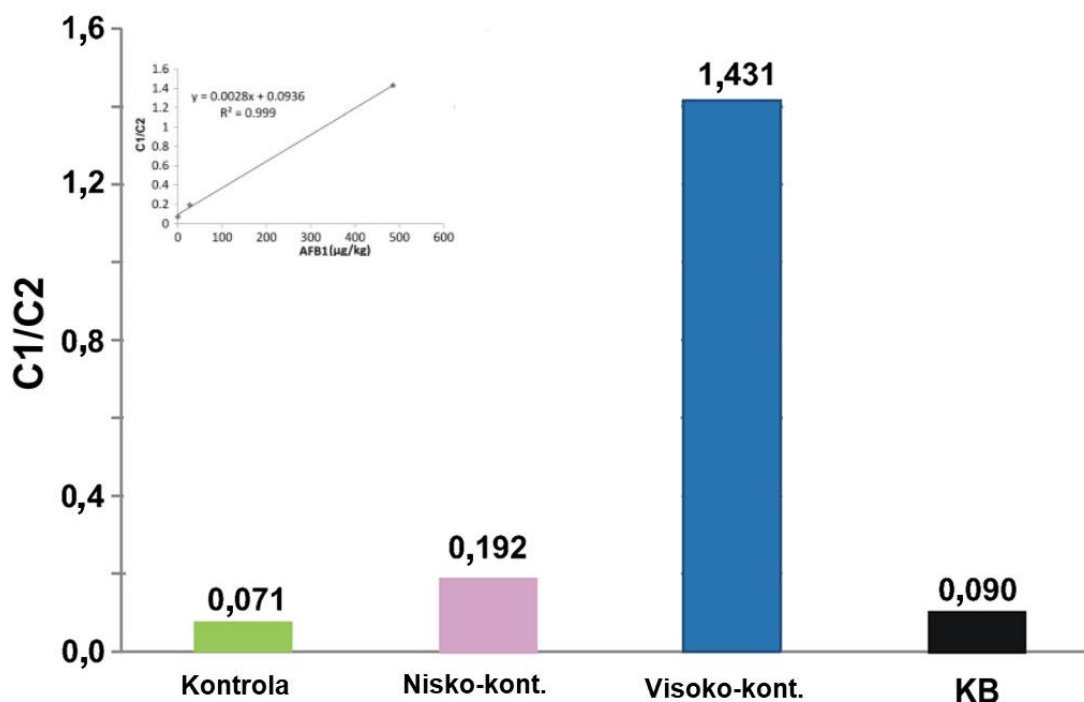
**Tabela 4.16.** Izračunate površine za komponentu 1 (C1) i 2 (C2) dobijene MCR-ALS analizom EEM za ispitivane uzorke kukuruza.

Uzorci	Površina C1 (A.U.)	Površina C2 (A.U.)
Kontrolni uzorci	15,879	17,753
Niska kontaminacija	17,640	17,844
Visoka kontaminacija	18,340	18,137
Komercijalno Brašno	15,627	17,873

Iz podataka datim u **tabeli 4.17.** može da se uoči sličan trend promene na različitim talasnim dužinama ekscitacije između posmatranog odnosa komponenti C1/C2 kod svih ispitivanih uzoraka. Rezultati pokazuju da je odnos C1/C2 najveći kod visoko-kontaminiranih uzoraka semena, na svim talasnim dužinama ekscitacije. Na **slici 4.36.** dat je odnos C1/C2 na talasnoj dužini ekscitacije od 350 nm. Dobijene su slične vrednosti odnosa C1/C2 za uzorke komercijalnog kukuruznog brašna i kontrolni uzorak. Na osnovu modela linearne regresije procenjena je veza između odnosa C1/C2 i koncentracije AFB<sub>1</sub> u ispitivanim uzorcima. Između ovih varijabli utvrđen je visok stepen korelacije ( $R^2=0,999$ ,  $p = 0,0099$ ), uprkos niskom stepenu slobode, što pokazuje da se odnos C1/C2 može koristiti kao indikator stepena kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom B<sub>1</sub>.

**Tabela 4.17.** Vrednosti odnosa površina komponente 1 i komponente 2 (C1/C2), na različitim talasnim dužinama pobuđivanja.

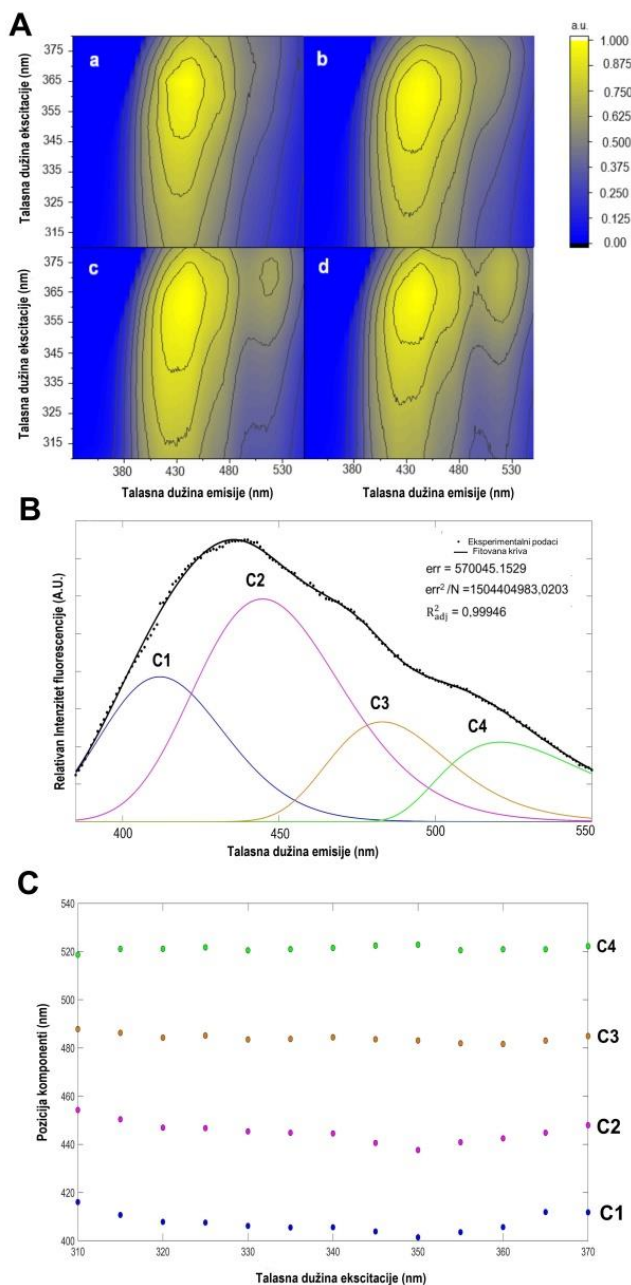
Ekscitacija (nm)	Odnos C1/C2			
	Kontrola	Niska-kontaminacija	Visoka-kontaminacija	Komercijalno brašno kukuruza
310	0,326	0,691	7,312	0,354
320	0,271	0,597	6,534	0,295
330	0,206	0,491	4,807	0,233
340	0,143	0,372	2,827	0,162
350	0,071	0,192	1,431	0,090



**Slika 4.36.** Odnos površina komponenti C1/C2 za ispitivane uzorke (kontrola, nisko- i visoko kontaminirana semena kukuruza, komercijalno brašno kukuruza (KB), na talasnoj dužini ekscitacije od 350 nm. U isečku slike nalazi se grafik linearne regersije i koeficijent određivanja ( $R^2 = 0,999$ ).

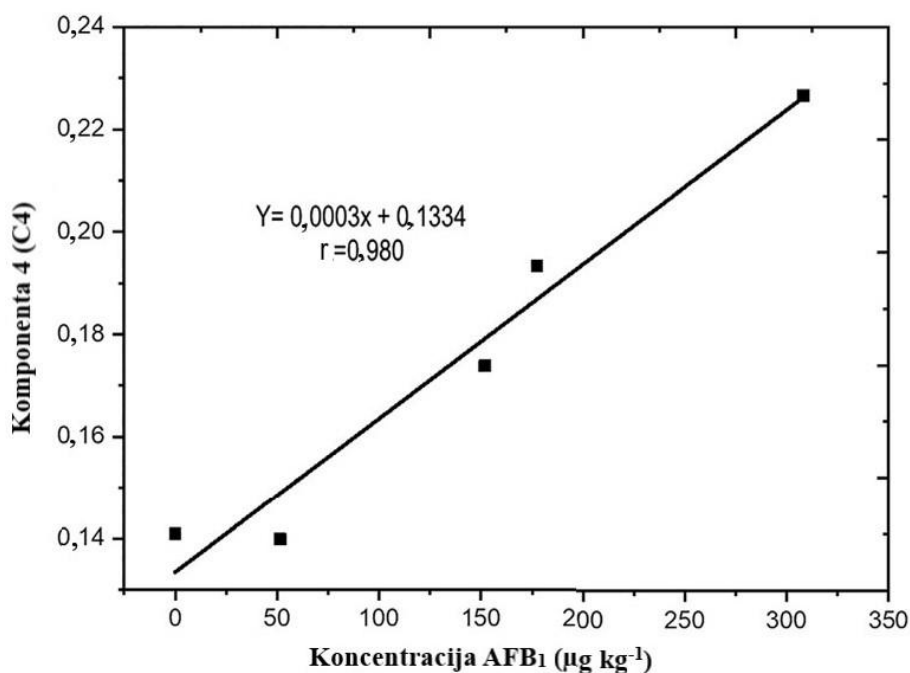
#### 4.6.2. Analiza EEM-a i primena log-normal algoritma

Na slici 4.37A dati su reprezentativni konturni grafici EEM unutrašnje i spoljašnje frakcije, izmerene za kontrolne uzorke i semena visoko-kontaminirana aflatoksinom. Uočavaju se dva spektralna regiona, pri čemu drugi region (480-530 nm) ima znatno izraženiju fluorescenciju kod spoljašnje frakcije semena u odnosu na unutrašnju frakciju. Autofluorescencija spoljašnjeg omotača semena uglavnom potiče od lignina. Zbog prisustva više fluorofora u ligninu, pokazan je karakterističan širok spektralni opseg emisije. U istom spektralnom regionu fluoresciraju još neka jedinjenja, poput, ferulinske kiseline, flavona, nakon UV-VIS ekscitovanja (Donaldson, 2020; Hashemi i sar., 2008). Uočena promena u intenzitetu u ovom spektralnom regionu, može ukazati na promene u ligninu kod spoljašnje frakcije u visoko-kontaminiranim uzorcima.



**Slika 4.37.** Reprezentativni primer za (A) konturne grafike EEM za unutrašnje (a-kontrola, b-visoko-kont.) i spoljašnje (c-kontrola, d-visoko-kont.) frakcije semena. (B) dekonvoluiran emisijski spektar ( $E_x$  360 nm) pomoću 4(četiri)-komponentnog log-normal modela; C1-C4, spektralne komponente. (C) pozicije log-normal komponenti dobijenih dekonvolucijom, u funkciji talasne dužine ekscitacije, nakon dekompozicije emisijskog spektra. \* err,  $err^2/N$ ,  $R_{adj}^2$  – statistički parametri dekonvolucije.

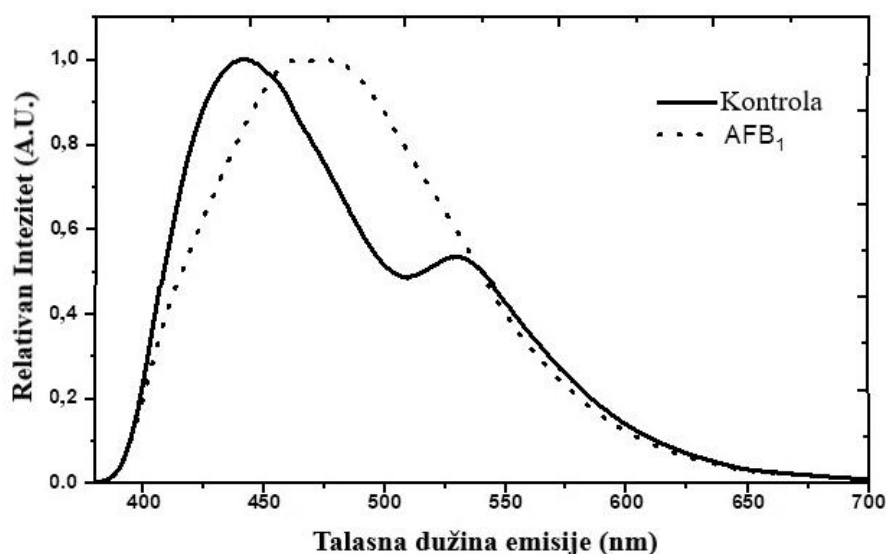
Rezultati dekonvolucije emisionih spektara primenom log-normalnog algoritma su pokazali prisustvo četiri komponente sa položajima emisionih maksimuma na oko 420 nm, 460 nm, 480 nm i 520 nm, redom. Reprezentativni primer dekonvoluiranog emisionog spektra nakon ekscitacije na 360 nm, dat je na **slici 4.37**. Kao što se može uočiti sa grafika prikazanog na **slici 4.37C**, pozicije emisionih komponenti C1, C2, C3 i C4 na različitim talasnim dužinama ekscitacije ostaju relativno stabilne, što potvrđuje tačnost fitovanja ( $R_{adj}^2 = 0,99946$ ). Pokazano je da pozicije ovih emisionih maksimuma odgovaraju fluoroforima lignina (Radotić i sar., 2006; Djikanović i sar., 2007). Radotić i sar. (2006) utvrdili su da i najjednostavniji model lignina, poput dehidrogenativnog polimera (DHP), se sastoji od nekoliko fluorofora koje pokazuju heterogenu fluorescenciju u plavo-zelenom spektralnom regionu. Naime, fluorofore lignina su različite molekulske vrste unutar polimera koje emituju na različitim talasnim dužinama (Radotić i sar., 2006). Poznato je da postoje najmanje tri tipa fluorofora, uglavnom struktura bifenila, koniferil alkohola i stilbena, sa različitim supstituentima (Machado i sar., 2001). Dobijeni rezultati o položajima emisionih komponenti dobijenih dekonvolucijom su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Djikanović i sar., 2007; Donaldson i sar., 2010). Emisioni region od 480 nm do 530 nm odgovara tzv. zelenoj komponenti C4. Ustanovljeno je da zelene spektralne komponente u spektrima lignina mogu se pripisati delu strukture lignina koji se sastoji od lanaca konjugovanih C=C i C-C veza, što pruža rigidnost molekulu. U literaturi, ova vrsta strukture je povezana sa odgovorom na spoljašnji stres, kao što je na primer mehanički (Machado i sar., 2001). Stoga, izraženija C4 komponenta može odgovarati rigidnijoj strukturi ligninskog polimera u spoljašnjem delu semena, u zaštitnom odgovoru na kontaminaciju aflatoksinom. Zatim, ispitana je zavisnost između površine C4 komponente (520 nm) i koncentracije AFB<sub>1</sub> kod unutrašnje i spoljašnje frakcije semena. Utvrđena je značajna pozitivna linearna zavisnost između površine C4 komponente i koncentracije AFB<sub>1</sub> u spoljašnjoj frakciji semena ( $R=0,980$ ,  $p<0,01$ ) (**Slika 4.38.**), što može biti pogodan indikator za praćenje promena lignina u odnosu na nivo AFB<sub>1</sub> u semenu, a samim tim i na kapacitet njegove zaštite.



**Slika 4.38.** Korelacija između površine C4 komponente i sadržaja AFB<sub>1</sub> u spoljašnjoj frakciji semena ( $r=0,980$ ,  $p<0,01$ ).

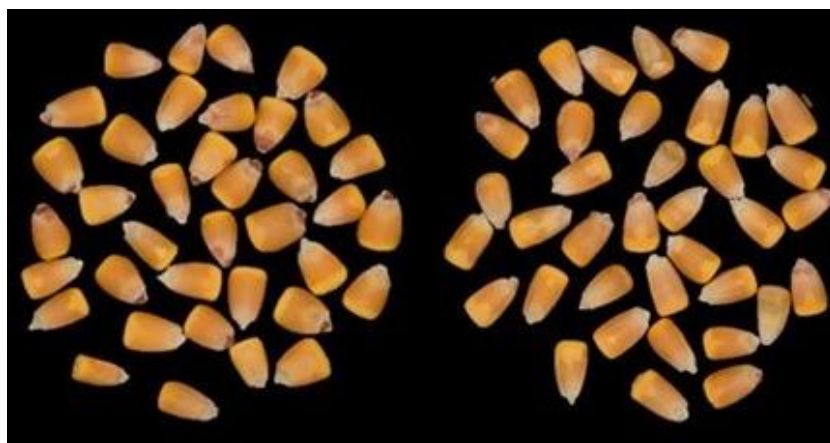
#### 4.6.3. Primena linearne diskriminacione analize (LDA) na podatke fluorescentnih spektara dobijenih merenjem intaktnih semena

Na **slici 4.39.** dat je prikaz usrednjenih fluorescentnih spektara kontrole (bez aflatoksina) i semena u kojima je utvrđena visoka koncentracija AFB<sub>1</sub>. U analiziranom emisionom spektralnom regionu od 360 do 800 nm, pri talasnoj dužini ekscitacije od 340 nm, uočavaju se razlike u poziciji emisionog maksimuma i obliku spektra između kontrolnih i kontaminiranih uzoraka. Kako je fluorescencija emitovana sa površine semena može da se pretpostavi da su navedene promene povezane sa prisustvom fluorofora u semenom omotaču, tj. ćelijskom zidu koji je izgrađen uglavnom od lignina. U istom spektralnom regionu takođe pokazuju fluorescenciju (Donaldson, 2020). Zabeležen crveni pomeraj pozicije emisionog maksimuma spektra kod uzoraka kontaminiranih aflatoksinom u odnosu na kontrolu, je pokazan i ranije u literaturi.



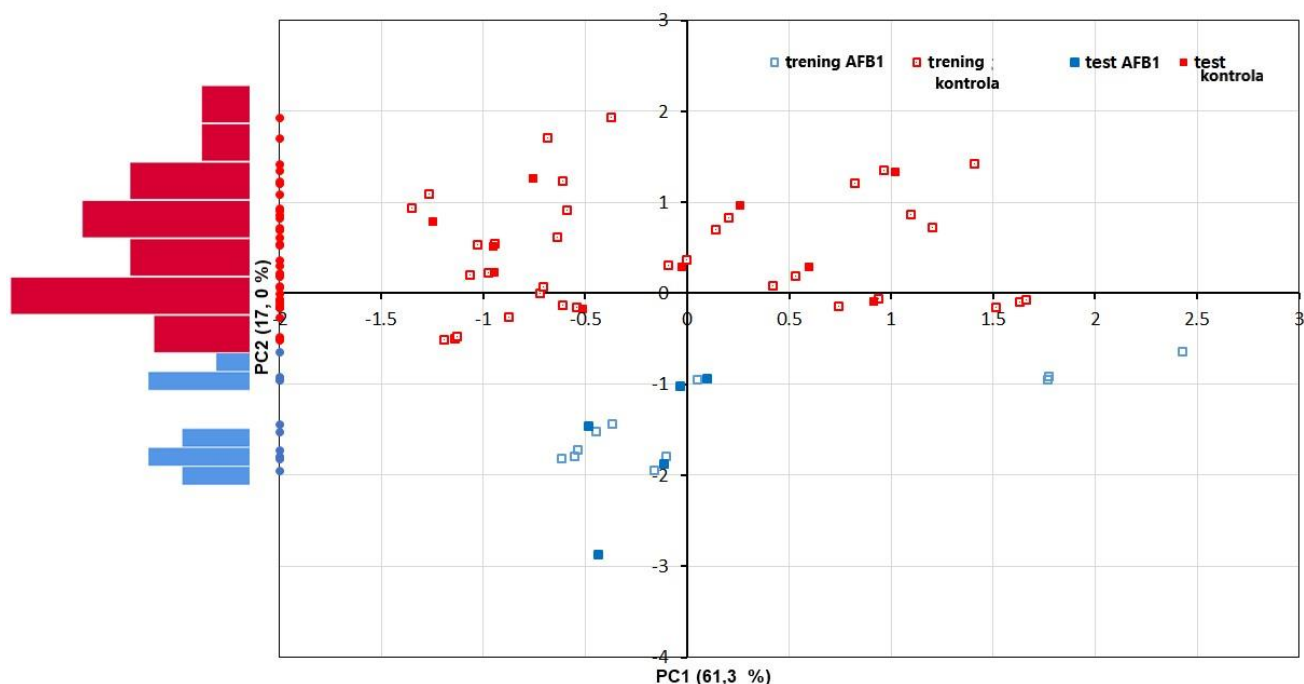
**Slika 4.39.** Normalizovani usrednjeni fluorescentni spektri snimljeni na površini dorzalne strane celog semena kukuruza, kontrola (puna linija) i aflatoksin visoko-kontaminirana (isprekidana linija) za talasnu dužinu ekscitacije od 340 nm.

Na **slici 4.40.** data je slika izgleda semena kukuruza korišćenih u ovoj studiji, kontrola (levo) i visoko-kontaminirana semena (desno). Interesantno da se ovi uzorci nisu vizuelno razlikovali. U literaturi je pokazano da semena mogu da sadrže visoke koncentracije aflatoksina, iako na izgled izgledaju zdrava, kao i obrnuto (Bullerman, 1979; Abbas i sar., 2009).



**Slika 4.40.** Vizuelni prikaz kontrolne (levo) i visoko-kontaminiranih (desno) uzoraka *Zea mays* L. semena.

Linearna diskriminaciona analiza (LDA) je primenjena na rezultatima evaluiranim metodom glavnih komponenti (PCA). Naime, problem multikolinearnosti je često prisutan u spektrofotometriji. Da bi se rešio ovaj problem, upotrebljena je PCA analiza koja omogućava transformaciju korelisanih varijabli (prediktora) u skup nekorelisanih varijabli, koje se označavaju glavnim komponentama. Zadržane su prve dve glavne komponente koje definišu 78,3% ukupne varijacije. Rezultati ove dve glavne komponente su ulazni podaci za LDA. Grafički prikaz skorova za prve dve glavne komponente je dat na slici 4.41. Uočava se jasna diskriminacija kontrole i visoko-kontaminiranih uzoraka semena. Činjenica je da je ova diskriminacija postignuta samo na PC2 dimenziji. Leva strana grafikona pokazuje histograme PC2 rezultata za ovde dve grupe. Početni skup podataka je bio podeljen na trening i test (u odnosu 46:15). Rezultati primene LDA sumirani su u matrici konfuzije koja je data u tabeli 4.18. Pouzdanost klasifikacije od 100% dobijena je u oba seta. To pokazuje da ovaj metod može uspešno da razlikuje kontaminirana semena od nekontaminiranih.



**Slika 4.41.** Dijagram rasipanja skorova koji odgovaraju kontrolnim uzorcima i semenima kontaminiranim aflatoksinom u prostoru za prve dve glavne komponente. Svaki skor odgovara jednom semenu. Sa leve strane prikazani su histogrami skorova druge glavne komponente ove dve grupe.

**Tabela 4.18.** Matrica konfuzije za trening- i test- uzorke za dve klase, uzorke (NK) bez aflatoksina i (K) koji sadrže AFB<sub>1</sub>.

		<i>Predviđena pripadnost grupi</i>			
		<b>Grupa</b>	<b>Nekontaminirana</b>	<b>Kontaminirana</b>	<b>Ukupno</b>
<b>Trening set<sup>a</sup></b>	broj	NK	35	0	35
		K	0	11	11
	%	NK	100	0	100
		K	0	100	100
<b>Test set<sup>b</sup></b>	broj	NK	10	0	10
		C	0	5	5
	%	K	100	0	100
		C	0	100	100

<sup>a</sup>Svi trening uzorci su korektno klasifikovani, <sup>b</sup>Svi test uzorci su korektno klasifikovani.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata predstavljenih u okviru ove disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci koji su sagledani u dve celine:

1. Fizičko-hemijskom karakterizacijom semena kukuruza različitog nivoa kontaminacije aflatoksinom, utvrđeno je sledeće:
  - ❖ U ispitivanim metanolnim ekstraktima semena kukuruza identifikovano je ukupno petnaest različitih jedinjenja, među kojima su različite klase konjugata poliamina, glicerola i flavonoidnih glikozida. Dominantni su konjugati poliamina tj. hidroksicinamični kiseli amidi.
  - ❖ U ispitivanim hidrolizatima semena kukuruza pronađeno je ukupno šesnaest različitih jedinjenja. Najzastupljenije su bile fenolne kiseline ferulinska, *p*-kumarinska i izoferulinska kiselina.
  - ❖ Pokazan je sličan fenolni profil kod kontrolnih uzoraka (semena bez aflatoksina) i uzoraka sa različitim sadržajem aflatoksina, kako u metanolnim ekstraktima, tako i u hidrolizatima semena. Dobijeni rezultati pokazuju da prisustvo aflatoksina ne utiče na sastav fenolnih jedinjenja u semenu, tj. na njegov fenolni profil.
  - ❖ Utvrđeno je da sadržaj i odnos specifičnih fenolnih jedinjenja zavisi od koncentracije aflatoksina u semenu.
  - ❖ Po prvi put je ustanovljena dozno-zavisna veza između odnosa zbir konjugata putrescina i spermidina P/S i koncentracije AFB<sub>1</sub> u metanolnim ekstraktima ispitivanih uzoraka semena.
  - ❖ Pokazano je da su konjugati spermidina, dikumaroil-spermidin i kumaroilferuloil-spermidin, dominantna jedinjenja u metanolnim ekstraktima semena bez toksina (kontrola) i sa nižim nivoom kontaminacije. U visoko-kontaminiranim uzorcima semena je utvrđeno da preovlađuju konjugati putrescina i to uglavnom konjugati diferuloil-putrescina i kumaroilferuloil-putrescina. Utvrđena je visoka korelacija između različitih tipova konjugata putrescina, kao i između različitih vrsta konjugata spermidina.
  - ❖ Utvrđeno je da sadržaj i odnos pojedinih konjugata poliamina može da varira u unutrašnjoj i spoljašnjoj frakciji semena zavisno od nivoa kontaminacije aflatoksinom.
  - ❖ Utvrđeno je veći sadržaj fenolnih kiselina i dehidrodimera ferulinske kiseline u hidrolizatu spoljašnje frakcije semena nego unutrašnje.
  - ❖ Sa porastom nivoa kontaminacije semena aflatoksinom utvrđeno je smanjenje u sadržaju *p*-CA i FA i povećanje ovih kiselina pri višim nivoima kontaminacije semena kukuruza.
  - ❖ Prisustvo visokih koncentracija aflatoksina u semenu dovelo je do povećanja ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (TPC).
  - ❖ Pri višim nivoima kontaminacije u spoljašnjim frakcijama semena povećan je sadržaj lignina.
  - ❖ Koncentracija aflatoksina utiče na promenu ukupnog antioksidativnog kapaciteta semena, a koje se ogleda smanjenjem ukupne antioksidativne aktivnosti pri višim nivoima kontaminacije AFB<sub>1</sub>.
  - ❖ Rezultati PCA pokazuju jasno razdvajanje kontrolnih uzoraka i uzoraka u kojima je niži nivo kontaminacije (od 6, 75 do 61 μg kg<sup>-1</sup>) od visoko kontaminiranih (od 105 μg kg<sup>-1</sup> do 308, 13 μg kg<sup>-1</sup>), na osnovu većeg sadržaja jona metala Zn i Mn i nižeg sadržaja Ca i Na.
  - ❖ Utvrđena je značajno visoka linearna zavisnost između sadržaja Zn, kao i sadržaja Mn, sa koncentracijom AFB<sub>1</sub>. Pokazana je visoka pozitivna korelacija Zn i Mn.



- ❖ Utvrđena je razlika u sadržaju slobodnih organskih radikala između unutrašnje i spoljašnje frakcije sa porastom kontaminacije.
- ❖ Kod spoljašnje frakcije semena dolazi do smanjenja EPR signala pri višim nivoima kontaminacije, što može ukazati na mehanizam lignifikacije koji obuhvata neenzimsko kuplovanje među organskim radikalima.
- ❖ 2D EPR imidžingom utvrđeno je da prisustvo aflatoksina utiče na redoks status semena. Kako spinske probe imaju ulogu antioksidanata, veće gašenje EPR signala u kontaminiranom uzorku semena je verovatno posledica stanja oksidativnog stresa u kojem je koncentracija ROS uvećana. Dobijeni rezultati, takođe, su pokazali različitu prostornu distribuciju spinskih probi u analiziranim semenima. 3CxP je više zastupljenija u površinskim delovima semena, dok je 3CP u klici.

Na osnovu navedenog se može izvesti opšti zaključak: Prvi put (prema našim saznanjima) pokazan je dvofazni odgovor semena kukuruza sa porastom koncentracije aflatoksina. Definisan je odnos P/S (odnos suma konjugata spermidina i putrescina), a koji se može uzeti kao indikator nivoa kontaminacije semena kukuruza aflatoksinom. Uočene varijacije u ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti (TAA) i ukupnom sadržaju fenola (TPC) mogu podržati ovaj dvofazni odgovor. Naime, u uzorcima semena višeg nivoa kontaminacije aflatoksinom, može da se pretpostavi da dolazi do stanja oksidativnog stresa (promene u redoks statusu semena pokazani EPR imidžingom), a koje se manifestuje uglavnom smanjenjem ukupne antioksidativne aktivnosti (TAA) i povećanjem sadržaja ukupnih fenola (TPC), konjugata putrescina (pretežno diferuloilputrescina), Zn i Mn. Stoga, ovi parametri su izdvojeni kao mogući markeri nivoa kontaminacije. Međutim, osim navedenih rezultata, mogu se izdvojiti i drugi parametri kao potencijalni markeri, što bi bio predmet daljih ispitivanja. Pored toga, pri višim nivoima kontaminacije aflatoksinom u spoljašnjoj frakciji semena utvrđeno je povećanje sadržaja lignina i jedinjenja koja se u literaturi označavaju kao markeri lignifikacije (ferulinska i *p*-kumarinska kiselina), kao i smanjenje sadržaja slobodnih organskih radikala, što može ukazati da je proces lignifikacije jedan od mehanizama zaštite semena od stresa izazvanim aflatoksinom.

2. U ovom radu pokazano je da se spektrofluorimetrija zajedno sa naprednim statističkim metodama spektralne analize, može uspešno primeniti u ispitivanju varijacija parametara emisionog profila semena kukuruza kada je kontaminacija aflatoksinom u pitanju. Na osnovu dobijenih rezultata mogu da se izdvoje sledeći parametri kao indikatori kontaminacije semena kukuruza aflatoksinima:
  - ❖ U konturnim graficima EEM (Ex 300-360nm/Em 350-550 nm) kod kontrolnih uzoraka, komercijalnog kukuruznog brašna, kao i uzoraka semena sa različitim nivoom kontaminacije aflatoksinom, utvrđeno je prisustvo intenzivnog fluorescentnog spektralnog regiona, a koji potiče od različitih fluorofora u uzorku.
  - ❖ Utvrđena je sličnost u emisionim profilima između kontrolnih uzoraka semena i komercijalnog kukuruznog brašna, dok je u odnosu na ove uzorke kod kontaminiranih semena aflatoksinom primećen pomeraj ka dugotalasnom delu spektra, tzv. crveni pomeraj, a koji je bio izraženiji sa povećanjem kontaminacije.
  - ❖ Primenom MCR-ALS na EEM (Ex 300-360nm/Em 350-550nm) utvrđeno je da je optimalni broj emisionih komponenti 2 (označene C1 i C2) u emisionim spektrima ispitivanih uzoraka. Pozicija njihovih emisionih maksimuma bila je približno ista za kontrolni uzorak i uzorak komercijalnog brašna kukuruza. Kod kontaminiranih uzoraka došlo je do pomeranja pozicije emisionog maksimuma ka dugotalasnom delu spektra (tzv. crveni pomeraj), u odnosu na kontrolne uzorke.
  - ❖ Dobijeni rezultati su pokazali da odnos površina dve spektralne komponente C1/C2 proporcionala nivou kontaminacije aflatoksinom B<sub>1</sub>.

- ❖ Konturni grafici EEM (Ex 310-380 nm/Em 350-550 nm) su pokazali jasnije razdvajanje dva spektralna regiona kod spoljašnjih frakcija semena nego kod untrašnjih, pri čemu je kod kontaminiranih uzoraka fluorescentni signal u spektralnom regionu 480-530 nm za koji se pretpostavlja da potiče od lignina, znatno izraženiji.
- ❖ Dekonvolucijom fluorescentnih spektara log-normal algoritmom pokazano je prisustvo četiri emisione komponente (C1-C4) sa pozicijama maksimuma emisije na talasnim dužinama 420 nm, 460 nm, 480 nm i 520 nm.
- ❖ Utvrđena je značajno visoka linearna pozitivna korelacija između površine zelene spektralne komponente C4 (520 nm) i koncentracije aflatoksina u spoljašnjoj frakciji semena.
- ❖ LDA je pokazala pouzdanost od 100% u klasifikaciji uzoraka nepoznatog statusa kontaminacije u jednu od dve postojeće grupe (nekontaminirane i aflatoksinom-kontaminirane).

Kako standardne analitičke metode koje se koriste za određivanje aflatoksina zahtevaju prethodnu pripremu uzoraka i ekstrakciju aflatoksina iz uzoraka, a koja može da bude nepotpuna, primenjeni analitički postupak može biti osnova za razvijanje metoda za brzu i jednostavnu procenu stepena kontaminacije uzoraka semena kukuruza aflatoksinima. Kao indikatori kontaminacije aflatoksinima izdvajaju se odnos površina emisionih spektralnih komponenti (C1/C2), pomeranje položaja emisionog maksimuma ka većim talasnim dužinama (crveni pomeraj), povećanje površine zelene spektralne komponente.

## 6. LITERATURA

Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablotowicz, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., Weaver, M. A. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28, 142-153.

Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Hajeb, P., Radu, S., Shakibazadeh, S. (2013). A Review on Mycotoxins in Food and Feed: Malaysia Case Study. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 629-51.

Aiko, V., Mehta, A. (2013). Control of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production with spices in culture medium and rice. *World Mycotoxin Journal*, 6(1), 43–50.

Akter, S., Khan, M. S., Smith, E. N., Flashman, E. (2021). Measuring ROS and Redox Markers in Plant Cells. *RSC Chemical Biology*, 2 (5), 1384–1401.

Alshannaq, A., Yu, J.-H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632.

Anderson, C.M., Mortensen, G. (2008). Fluorescence spectroscopy: a rapid tool for analyzing dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 720–729.

Antić-Jovanović, A. (2002). *Molekulska spektroskopija-spektrohemijski aspekt*, Beograd. Fakultet za Fizičku hemiju: Belgrade, Serbia, ISBN 86-82139-16-2.

Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.

Araújo, S. S., Paparella, S., Dondi, D., Bentivoglio, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A., (2016). Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology. *Frontiers in Plant Science*, 7, 646.

Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (1999). Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research*, 31(1), 89-96.

Assunção, A. G. L., Cakmak, I., Clemens, S., González-Guerrero, M., Nawrocki, A., Thomine, S. (2022). Micronutrient homeostasis in plants for more sustainable agriculture and healthier human nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 73(6), 1789–1799.

Atanasova-Penichon, V., Barreau, C. Richard-Forget, F. (2016). Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 566.

Azzouz T., Tauler R. (2008). Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples. *Talanta*, 74, 1201-1210.

Babić, N., Peyrot, F. (2019). Molecular Probes for Evaluation of Oxidative Stress by In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging: State-of-the-Art and Limitations. *Magnetochemistry*, 5(1), 13.

Bačić, G., Pavićević, A., Peyrot, F. (2016). In vivo evaluation of different alterations of redox status by studying pharmacokinetics of nitroxides using magnetic resonance techniques. *Redox Biology*, 8, 226-242.

Bährle, C., Nick, T. U., Bennati, M., Jeschke, G., Vogel, F. (2015). High-Field Electron Paramagnetic Resonance and Density Functional Theory Study of Stable Organic Radicals in Lignin: Influence of the Extraction Process, Botanical Origin, and Protonation Reactions on the Radical g Tensor. *The Journal of Physical Chemistry A*, 119(24), 6475-82.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Banu, N., Sadagopan, P. (2016). Enumeration of terrestrial mycobiota and aflatoxin in drinking water. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 18, 207-217.

Bassard, J-E., Pascaline, U., Bernier, F., Werck-Reichert, D. (2010). Phenolamides: Briding polyammonies to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*, 71, 1808-1824.

Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T. (2016). Aflatoxin b1 contamination in maize in europe increases due to climate change. *Scientific Reports*, 6, 24328.

Bauer, J. L., Harbaum-Paiyda, B., Schwarz, K. (2012). Phenolic compounds from hydrolyzed and extracted fiber-rich by-products. *LWT-Food Science and Technology*, 47, 246-254.

Benkerroum, N. (2019). Retrospective and Prospective Look at Aflatoxin Research and Development from a Practical Standpoint. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 3633.

Bento-Silva, A., Duarte, N., Mecha, E., Belo, M., Vaz Patto, M. C., Bronze, M. D. R. (2020). Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives in Broa, a Traditional Ethnic Maize Bread. *Foods*, 9(10), 1471.

Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Cleveland, T. E. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(2), 83–93.

Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology*, 11(5), 705-719.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546.

Boukaew, S., Prasertsan, P., Sattayasamitsathit, S., (2017). Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. *Industrial Crops and Products*, 97, 558–566.

Braslavsky, S. E. (2007) Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 79, 293–465.

- Brett, C. T., Wende, G., Smith, A. C., Waldron, K. W. (1999). Biosynthesis of cell-wall ferulate and diferulates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 421–424.
- Bullerman, L. B. (1979). Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human health. *Journal of Food Protection*, 42(1), 65-86.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H. (2003). Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology*, 217(2), 128–133.
- Caceres, I., Khoury, A. A., Khoury, R. E., Lorber, S., Oswald, I. P., Khoury, A. E., Atoui, A., Puel, O., Bailly, J. D. (2020). Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins*, 12(3), 150.
- Castano-Duquel, L., Gilber, M. K., Mack, B. M., Lebar, M. D., Carter-Wientjes, C. H., Sickler, C. M., Cary, J. W., Rajasekaran, K. (2021). Flavonoids Modulate the Accumulation of toxins from *Aspergillus flavus* in maize kernels. *Frontiers in Plant Science*, 12, 761446.
- Cerovic, Z. G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., Moya, I. (1999). Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*, 19, 543–578.
- Cesarino I. (2019). Structural features and regulation of lignin deposited upon biotic and abiotic stresses. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 209-214.
- Cherevko, S., Mayrhofer., K. J. J. (2018). On-line Inductively Coupled Plasma Spectrometry in Electrochemistry: Basic Principles and Applications. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier, Oxford , 326-335.
- Chiremba, C., Taylor, J. R. N., Rooney, L. W., Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chemistry*, 134(1), 81–88.
- Choi, S. W., Lee, S. K., Kim, E. O., Oh, J. H., Yoon, K. S., Parris, N., Hicks, K. B., Moreau, R. A. (2007). Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3920–3925.
- Christensen, J., Nøgaard, L., Bro, R., Engelsen, S. B. (2006). Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chemical Reviews*, 106, 1979–1994.
- Corso, M., Perreau, F., Mouille, G., Lepiniec, L. (2020). Specialized Phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations, *Plant Science*, 296, 110471.
- Croce, A.C. (2021). Light and Autofluorescence, Multitasking Features in Living Organisms. *Photochemistry*, 1: 67–124.
- Davies, M. J. (2016). Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods*, 109, 21–30.
- Del Río, J. C., Rencoret, J., Gutierrez, S. A., Kim, H., Ralph, J. (2018). Structural characterization of lignin from maize (*Zea mays* L.) fibers: evidences for diferuloylputrescine incorporated into the lignin polymer in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(17), 4402-4413.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228.

Djikanović, D., Kalauzi, A., Radotić, K., Lapierre, C. Jeremić, M. (2007). Deconvolution of lignin fluorescence spectra: a contribution to the comparative structural studies of lignins. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 81, 1425–1428.

Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants. *Molecules*, 25(10), 2393.

Donaldson, L., Radotić, K., Kalauzi, A., Djikanović, D., Jeremić, M. (2010). Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *Journal of Structural Biology*, 169, 106–115.

Dong, X., Gao, Y., Chen, W., Wang, W., Gong, L., Liu, X., Luo, J. (2015). Spatiotemporal Distribution of Phenolamides and the Genetics of Natural Variation of Hydroxycinnamoyl Spermidine in Rice. *Molecular Plant*, 8(1), 111-121.

Dubrovnik, J. (2016). Evaluation of undetectable perturbations of peak parameters estimated by the least square curve fitting of analytical signal consisting of overlapping peaks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 153, 9-21.

Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M. (2016). Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1379-1391.

Elejade-Palmett, C., Bernonville, T. D., Glevares, G., Pichon, O., Papon, N., Courdavault, V., St-Pierre, B., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A., Besseau, S. (2014). Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7271-85.

ElMasry, G., Mandour, N., Al-Rejaie, S., Belin, E., Rousseau, D. (2019). Recent applications of multispectral imaging in seed phenotyping and quality monitoring-An overview. *Sensors*, 19(5), 1090.

Filazi, A., Sireli, U. T. (2013). Occurrence of Aflatoxins in food. *Intechopen*, pp. 1-28.

Gallez, B., Swartz, H. M. (2004). In vivo EPR: when, how and why? *NMR in biomedicine*, 17(5), 223–225.

García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., Becerril, J. M. (2015). Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Science*, 236, 136–145.

Gauthier, L., Atanasova-Penichon, V., Chéreau, S., Richard-Forget, F. (2015). Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 24839-24872.

Ghughe, S. A., Tisi, A., Carucci, A., Rodrigues-Pousada, R. A., Franchi, S., Tavladoraki, P., Angelini, R., Cona, A. (2015). Cell Wall Amine Oxidases: New Players in Root Xylem Differentiation under Stress Conditions. *Plants*, 4(3), 489–504.

Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-30.

Golshan, A., Abdollahi, H., Beyramysoltan, S., Maeder, M., Neymeyr, K., Rajkó, R., Sawall, M., Tauler, R. (2016). A review of recent methods for the determination of ranges of feasible solutions resulting from soft modelling analyses of multivariate data. *Analytica Chimica Acta*, 911, 1-13.

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260–271.

Grintzalis, K., Vernardis, S. I., Klapa, M.I., Georgiou, C. D. (2014). Role of oxidative stress in Sclerotial differentiation and aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5561-71.

Gulaboski, R., Mirčeski, V., Kappl, R., Hoth, M., Bozem, M. (2019). Review—Quantification of Hydrogen Peroxide by Electrochemical Methods and Electron Spin Resonance Spectroscopy *J. Electrochem. Soc.* 166 G82.

Handa, A. K., Fatima, T., Matto, A. K. (2018). Polyamines: Bio-Molecules with diverse functions in plant and human health and disease. *Frontiers in Chemistry*, 6, 10.

Hänsch, R., Mendel R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 259–266.

Hashemi, J., Kram, G. A., Alizadeh, N. (2008). Enhanced spectrofluorimetric determination of aflatoxin B1 in wheat by second-order standard addition method. *Talanta*, 75(4), 1075-1081.

He, W., Liu, Y., Wamwe, G. W., Yin, J. J. (2014). Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *Journal of food and drug analysis*, 22, 49-63.

Herrmann, K., Nagel, C. W. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4), 315-47.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Chemical Agents and Related Occupations*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer, 2012. 100F 1-599.

Ismail, A. A., Papenbrock, J. (2015). Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture*, 5(3), 492-537.

Jevtić, B., Djedović, N., Stanisavljević, S., Gašić, U., Mišić, D., Despotović, J., Samardžić, J., Miljković, Dj., Timotijević, G. (2017). Anti-encephalitogenic effects of cucumber leaf extract. *Journal of Functional Foods*, 37, 249-262.

Juan, A., Tauler, R. (2003). Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Analytica Chimica Acta*, 500, 195-210.

Kalauzi, A., Mutavdžić, D., Djikanović, D., Radotić, K., Jeremić, M. (2007). Application of asymmetric model in analysis of fluorescence spectra of biologically important molecules. *Journal of Fluorescence*, 17, 319–329.

Kang, J., Price, W., Ashton, J., Tapsell, L., Johnson, S. (2016). Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. *Food Chemistry*, 211, 215-226.

Khramtsov, V. V. (2012). 'In vivo Spectroscopy and Imaging of Nitroxide Probes', in A. I. Kokorin (ed.), *Nitroxides - Theory, Experiment and Applications*, IntechOpen, London. 10.5772/39129.

Khulbe, K. C., Ismail, A. F., Matsuura, T. (2017). Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. In: *Membrane Characterization*. Elsevier Inc., pp. 47-68. ISBN 978-044463776-5.

Kim, E. O., Min, K. J., Kwon, T. K., Um, B. H., Moreau, R. A., Choi, S. W. (2012). Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1309–1316.

Klich, M. A. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48(2), 71–80.

Krishna M. C., Devasahayam, N., Cook, J. A., Subramanian, S., Kuppusamy, P., Mitchell, J. B. (2001). Electron Paramagnetic Resonance for Small Animal Imaging Applications, *ILAR Journal*, 42(3), 209–218.

Krnjaja, V., Lević, J., Stanković, S., Petrović, T., Lukić, M. (2013). Molds and mycotoxins in freshly harvested maize. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, 124, 111-119.

Kumar, A., Pathak, H., Bhaduarua, S., Sudan, J. (2021). Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review, *Food Production, Processing and Nutrition*, 3, 17.

Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349-364.

Kumar, K., Mishra, K. A. (2015). Multivariate curve resolution alternating least square (MCR-ALS) analysis on total synchronous fluorescence spectroscopy (TSFS) data sets: Comparing certain ways of arranging TSFS-based three-way array. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 147, 66-74.

Kunwar, A., Priyadarsini, K. I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1, 53–60.

Kurdziel, M., Dłubacz, A., Weselucha-Birczynska, A., Filek, M., Łabanowska, M. (2015). Stable radicals and biochemical compounds in embryos and endosperm of wheat grains differentiating sensitive and tolerant genotypes – EPR and Raman studies. *Journal of Plant Physiology*, 183, 95–107.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228, 367–81.

Łabanowska, M., Filek, M., Kurdziel, M., Bidzińska, E., Miszalski, Z., Hartikainen, H., (2013). EPR spectroscopy as a tool for investigation of differences in radical status in wheat plants



of various tolerances to osmotic stress induced by NaCl and PEG-treatment. *Journal of Plant Physiology*, 170(2), 136–145.

Lackowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Lan, W., Lu, F., Regner, M., Zhu, Y., Rencoret, J., Ralph, S. A., Zakai, U. I., Morreel, K., Boerjan, W., Ralph, J. (2015). Tricin, a flavonoid mono-mer in monocot lignification. *Plant Physiology*, 167, 1284–1295.

Leggieri, M. C., Toscano, P., Battilani, P. (2021). Predicted Aflatoxin B1 Increase in Europe Due to Climate Change: Actions and Reactions at Global Level. *Toxins*, 13, 292.

Levêque, P., Godechal, Q., Gallez, B. (2008). EPR spectroscopy and imaging of free radicals in food. *Israel Journal of Chemistry*, 48, 19–26.

Lewis, N. G., Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biosynthesis and bio-degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 455–497.

Li, M., Pu, Y., Yoo, C. G., Ragauskas, A. J. (2016). The occurrence of tricinand its derivatives in plants. *Green Chemistry*, 18, 1439–1454.

Li, Z., Zhao, C., Zhao, X., Xia, Y., Sun, X., Xie, W., Ye, Y., Lu, X., Xu, G. (2018). Deep Annotation of Hydroxycinnamic Acid Amides in Plants Based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry and Its In Silico Database. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14321-14330.

Loi, M., Paciolla, C., Logrieco, A.F., Mulè, G. (2020). Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction, *Frontiers in Microbiology*, 11, 243.

Lule, S. U., Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review, *Food Reviews International*, 21(4), 367-388.

Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 250-258.

Machado, A.E.H., Nicodem, D.E., Ruggiero, R., Perez, D.S., Castellan, A. (2001). The use of fluorescent probes in the characterization of lignin: the distribution, by energy, of fluorophores in *Eucalyptus grandis* lignin. *Journal Photochemistry Photobiology A: Chem* 138:253–259.

Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, O., Álvarez-González, I., Morales-González, J. A. (2011). Aflatoxin B1 - Prevention of Its Genetic Damage by Means of Chemical Agents. In: Torres-Pacheco, I., editor. *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control* London: IntechOpen.

Maragos, C. M., Appell, M., Lippolis, V., Visconti, A., Catucci, L., Pascale, M. (2008). Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins, *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 164-171.

Maulucci, G., Bačić, G., Bridal, L., Schmidt, H. H., Tavitian, B., Viel, T., Utsumi, H., Yalçın, A. S., De Spirito, M. (2016). Imaging Reactive Oxygen Species-Induced Modifications in Living Systems. *Antioxidants & redox signaling*, 24(16), 939–958.

Maurya, D. K. (2010). Devasagayam TP. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3369-3373.

Mellon, J. E., Moreau, A. R. (2004). Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by diferuloylputrescine and p-coumaroylferuloylputrescine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6660–6663.

Meyer, V.R. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th edn. Chichester, U.K.: Wiley Interscience.

Mićić, M., Radotić, K., Jeremić, M., Djikanović, D., Kämmer, S.B. (2004). Study of the lignin model compound supramolecular structure by combination of near-field scanning optical microscopy and atomic force microscopy. *Colloid and Surface B: Biointerface*, 34(1), 33-40.

Milićević, D., Nedeljković-Trailović, J., Mašić, Z., (2014). Mikotoksini u lancu ishrane-analiza rizika i značaj za javno zdravstvo. *Tehnologija mesa*, 55(1), 22-38.

Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22, 11–19.

Mojović, M., Spasojević, I., Vuletić, M., Vučinić, Ž., Bačić, G. (2005). An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70 (2), 177–186.

Monson, M. S., Coulombe, R. A., Reed, K. M. (2015). Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. *Agriculture*, 5, 742-777.

Moreau, R. A., Nuñez, A., Singh, V. (2001). Diferuloylputrescine and p-Coumaroyl-feruloylputrescine, Abundant Polyamine Conjugates in Lipid Extracts of Maize Kernels. *Lipids*, 36, 839-44.

Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., Viana, J. D. F., Dornelas, M. C., Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 360–376.

Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3380.

Nakagawa, K., Maeda, H. (2017). EPR imaging and HPLC characterization of the pigment-based organic free radical in black soybean seeds. *Free Radical Research*, 51, 187–192.

Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, Lj. (2003). *Fiziologija biljaka*. NNK-International: Belgrade, Serbia.

Nikolić, M., Savić, I., Nikolić A., Jauković, M., Kandić, V., Stevanović, M., Stanković, S. (2021). Toxigenic Species *Aspergillus parasiticus* Originating from Maize Kernels Grown in Serbia. *Toxins*, 13, 847.

Nikolova, G. (2012). Oxidative stress and Parkinson disease, *Journal science*, 10, 92-100.

Nimse, S. B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5, 27986–28006.

Ojiambo, P. S., Battilani, P., Cary, W. J., Blum, B. H., Carboe, I. (2018). Cultural and Genetic Approaches to Manage Aflatoxin Contamination: Recent Insights Provide Opportunities for Improved Control. *Phytopathology*, 108, 1024-1037.

Olea-Azar, C., Rigol, C., Mendizabal, F., Briones, R. (2006). Applications of Electron Spin Resonance and Spin Trapping in Tropical Parasitic Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 6(2), 211–220.

Oliveira, C., Gonçalves, N., Rosim, R., Fernandes, A. (2009). Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 174–183.

Pál, M., Szalai, G., Gondor, O.K., Janda, T. (2021). Unfinished story of polyamines: Role of conjugation, transport and light-related regulation in the polyamine metabolism in plants. *Plant Science*, 308, 110923.

Paterson, R. R. M., Kelley, J., Gallagher, M. (1997). Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (LINK) in water. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 435-436.

Patil, S. V., Argyropoulos, D. S. (2017). Stable organic radicals in lignin: a review. *ChemSusChem*, 10, 3284–3303.

Peles, F., Sipos, P., Györi, Z., Pfliegler, W. P., Giacometti F., Serraino A., Pagliuca G., Gazzotti T., Pócsi, I. (2019). Adverse Effects, Transformation and Channeling of Aflatoxins Into Food Raw Materials in Livestock. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2861.

Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Györi, Z., Pusztahelyi, T. (2020). The aspergilli and their mycotoxins: metabolic interactions with plants and the soil biota. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2921.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.

Piğłowski, M., (2020). Food hazards on the European Union market: The data analysis of the Rapid Alert System for Food and Feed. *Food Science & Nutrition*, 8, 1603–1627.

Pratyusha, S. (2022). Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense: An Overview, in M. Hasanuzzaman, K. Nahar (eds.), *Plant Stress Physiology - Perspectives in Agriculture*, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.102873.

Radotić, K., Kalauzi, A., Djikanović, D., Jeremić, M., Lebac, R. M., Cerović, Z. G. (2006). Component analysis of the fluorescence spectra of a lignin model compound. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 83,1–10.

Radotić, K., Simić-Krstić, J., Jeremić, M., Trifunović, M. (1994). A study of lignin formation at the molecular level by scanning tunneling microscopy. *Biophysical Journal*, 66(6), 1763–1767.

Rai, S., Singh, P. K., Mankotia, S., Swain, J., Satbhai, S. B. (2021). Iron homeostasis in plants and its crosstalk with copper, zinc, and manganese. *Plant Stress*, 1, 100008.

Ralph, J. (2010). Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews*, 9, 65–83.

Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph S. A., Christensen, J. H., Boerjan, W. (2004). Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- pro-panoids, *Phytochemistry Reviews*, 3, 29–60.

Rana, S., Kumar, R., Sultana, S., Sharma, R. K. (2010). Radiation-induced biomarkers for the detection and assessment of absorbed radiation doses. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(3), 189–196.

Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312, 105-112.

Rodrigo-Moreno, A., Poschenrieder, C., Shabala, S. (2013). Transitionmetals: a double edge sward in ROS generation and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 8(3), e23425

Rodríguez-Kessler, M., Ruzi, O. A., Maiale, S., Ruiz-Herrera, J., JiménezBremont, J. F. (2008). Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiol Biochem*, 46, 805–814.

Rose, J. Bennett, A.B. (1999). Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 4, 176– 183.

Ruckebusch, C., Blanchet, L. (2013). Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Analytica Chimica Acta*, 765, 28–36.

Sádecká, J., Tóthová, J. (2007). Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification—A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 25, 159–173.

Santiago R., Malvar R. (2010). Role of dehydrodiferulates in Maize Resistance to Pests and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 691-703.

Santiago, R. J., Barros-Rios, R., Malvar, A. (2013). Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6960–6980.

Saulnier, L., Thibault, J-F.(1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 396-402.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 217037.

Shetty, N. P., Jørgensen, H. J. L., Jensen, J. D., Collinge, D. B., Shtetty, H. S. (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267-280.

Shoeb, F., Yadav, JS., Bajaj S, Rajam MV. (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Science*, 160, 1229–1235.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Soni, P., Gangurde, S.S., Ortega-Beltran, A., Kumar, R., Parmar, S., Sudini, H.K., Lei, Y., Ni, X., Huai, D., Fountain, J.C., Njoroge, S., Mahuku, G., Radhakrishnan, T., Zhuang, W., Guo, B., Liao, B., Singam, P., Pandey, M.K., Bandyopadhyay, R., Varshney, R.K. (2020). Functional Biology and Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions for Aflatoxin Contamination in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) and Maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 11, 227.

Stanković, M., Bartolić, D., Mutavdžić, D., Marković, S., Grubić, S., Jovanović, N. M., Radotić, K. (2021). Estimation of honeybee colony infection with *Nosema ceranae* and *Varroa destructor* using fluorescence spectroscopy in combination with differential scanning calorimetry of honey samples. *Journal of Apicultural Research*, 1-7.

Suzen, S., Gurer-Orhan, H., Saso, L. (2017). Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules*, 22, 181.

Tao, F., Yao, H., Hruska, Z., Burger, W., Rajasekaran, K., Bhatnagar, D. (2018). Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products. *Trends in Analytical Chemistry*, 100, 65-81.

Tešević, V. V. (2013). *Osnove masene spektrometrije organskih jedinjenja*. Hemijski fakultet, Beograd.

Thomas, R. (2013). *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Third Edition* (3rd ed.). CRC Press.

Tohge, T., de Souza, L. P., Fernie, A. R. (2017). Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 68, 4013-4028.

Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 147-157.

Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Mishra, S., Chauhan, D. K., Dubey, N. K. (2015). Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 139.

Uka, V., Cary, J. W., Lebar, M. D., Puel, O., De Saeger, S., Diana Di Mavungu, J. (2020). Chemical repertoire and biosynthetic machinery of the *Aspergillus flavus* secondary metabolome: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2797-2842.

Urbaniak, A., Molski, M., Szela, M. (2012). Quantum-chemical Calculations of the Antioxidant Properties of *trans-p-coumaric Acid* and *trans-sinapinic Acid*. *Computational methods in science and technology*, 18(2), 117-128.

Utsumi, H., Yasukawa, K., Soeda, T., Yamada, K., Shigemi, R., Yao, T., Tsuneyoshi, M. (2006). Noninvasive mapping of reactive oxygen species by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), 228-35.

Vance, C. P., Kirk, T. K., Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 259-288.

Wacoo, A. P., Wendi, D., Vuzi, P. C., Hawuba, J. F. (2014). Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. *Journal of Applied Chemistry*, 12, 1-15.

Walters, D. R. (2003). Polyamine and plant disease. *Pytochemistry*, 64, 97-107.

Walters, D., Meurer-Grimes, B., Ivelisse, R. (2001). Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters*, 201, 255-258.

Wang, Y., Liang, Z., Liao, X., Zhou, C., Xie, Z., Zhu, S., Wei, G., Huang, Y. (2019). Identification of C-glycosyl flavones by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and quantification of five main C-glycosyl flavones in *Flickingeria fimbriata*. *BMC Chemistry*, 13(1), 94.

Wang, Z., Li, S., Ge, S., Lin S. (2020). A review of distribution, extraction methods and health benefits of bound phenolics in food plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3330–3343.

Warwar N., Mor A., Fluhr R., Pandian, R. P., Kuppusamy, P., Blank, A. (2011). Detection and imaging of superoxide in root by electron spin resonance spin-probe method. *Biophysical Journal*, 101, 1529-1538.

Wee, J., Day, D. M., Linz, J. E. (2016). Effects of Zinc Chelators on Aflatoxin Production in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins*, 8(6), 171.

Werner, C., Hu, W. Q., Lorenzi-Riatsch, A., Hesse, M. (1995). Di-coumaroylspermidines and tricoumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra*. *Phytochemistry*, 40, 461-465.

Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(5), 1106–1122.

Wilschefski, S. C., Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115-133.

Wu, F., Guclu, H. (2012). Aflatoxin Regulations in a Network of Global Maize Trade, *PLoS ONE*, 7(9), e45151.

Wu, Q., Xu, H. (2019). Application of multiplexing fiber optic laser induced fluorescence spectroscopy for detection of aflatoxin B1 contaminated pistachio kernels. *Food Chemistry*, 290, 24–31.

Zhang, X., Tauler, R. (2013). Application of Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares (MCR-ALS) to remote sensing hyperspectral imaging. *Analytica Chimica Acta*, 762, 25–38.

Zhang, Y., Legland, D., El Hage, F., Devaux, M. F., Guillon, F., Reymond, M., Méchin, V. (2019). Changes in cell walls lignification, feruloylation and p-coumaroylation throughout maize internode development. *PloS one*, 14(7), e0219923.

## 7. BIOGRAFIJA

Dragana (Dragan) Bartolić je rođena 23. januara 1985. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju. Osnovne studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Diplomirani biohemičar završila je 2013. godine. Iste godine upisala je master akademske studije na Fakultetu za Fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, Odsek za biofizičku hemiju, koje je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,75 (devet i 75/100). Doktorske akademske studije na studijskom programu „Hemija“ pri Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta upisala je školske 2015/16. godine. Volontirala je na Univerzitetu u Beogradu-Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, na Odseku za nauke o živim sistemima, od 2013 do 2018. godine. Dragana Bartolić je kao stipendista pohađala sledeće škole: 46th IFF Spring School of Functional Soft Matter, Forschungszentrum Jülich, Nemačka (23. 02. do 06. 03. 2015. godine), 47th IFF Spring School „Memristive Phenomena - From Fundamental Physics to Neuromorphic Computing“, Forschungszentrum Jülich, Nemačka (22. 02. do 04. 03. 2016. godine), „Nerka 7“, regionalna škola biofizike sponzorirana od strane IUPAB-a (International Union of Pure and Applied Biophysics) Kotor, Crna Gora (04-08. oktobar 2018. godine), II Multiforesee CA16101 training school on molecular imaging in forensics, Matriht Holandija (10-13. decembra 2018. godine). Od decembra 2018. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik, a od 2020. godine kao istraživač-saradnik, na Odesku za nauke o živim sistemima Univerziteta u Beogradu-Instituta za multidisciplinarna istraživanja, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom“(br.173017), pod rukovodstvom dr Ksenije Radotić Hadži-Manić. Pored toga, Dragana Bartolić je bila učesnik COST akcije (br. 16101) pod nazivom „Multi-modal imaging of forensic science evidence - tools for Forensic Science“ u okviru kojeg je boravila kao STSM istraživač na Univerzitetu u Matrihtu (Multi-Modal Molecular Imaging, M4I) u istraživačkoj grupi Prof. dr. Ron Heeren, Matriht, Holandija (04-29 marta 2019. godine). Kandidatkinja je učesnik u COST akciji (br. 17111) pod nazivom „Data integration to maximise the power of omics for grapevine improvement“ (od 2018. godine-). Učesnik je na projektu (br. 6039613) pod nazivom „Detekcija i kvantifikacija bioaerosola značajnih za zdravlje ljudi i biljaka u realnom vremenu“ Fonda za Nauku Republike Srbije u okviru programa PROMIS (od 2020. godine-). Kandidatkinja je učestvovala u Evropskoj noći istraživača održanoj 27. septembra 2019. godine, u okviru projekta „The Road to Friday of Science-ReFocus 2.0“ koji finansira Evropska komisija u okviru „Horizon 2020“ programa za istraživanje i inovacione delatnosti. Kandidatkinja je istraživač Centra za zelene tehnologije, Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu (centar izuzetnih vrednosti). Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije. Dragana Bartolić je do sada objavila devet naučnih radova u međunarodnim časopisima i to jedan rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (kategorija M21a), pet radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22) i jedan rad u međunarodnom časopisu (kategorija M23). Pored toga, bila je učesnik na više međunarodnih konferencija iz čega je proisteklo šesnaest naučnih saopštenja: osam saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celosti (kategorije M33) i osam saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (kategorije M34). Rezultati ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije objavljeni su u 4 naučna rada. Tri naučna rada su objavljena u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22). Pored toga, rezultati su prezentovani na naučnom skupu međunarodnog značaja štampano u izvodu.

## OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

### Spisak objavljenih radova i saopštenja koji čine deo disertacije:

#### Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. **Bartolić, D.**, Mutavdžić, D., Carstensen, J. M., Stanković, S., Nikolić, M., Krstović, S., Radotić, K. 2022. Fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for fingerprinting of aflatoxin-B1 contaminated (*Zea mays* L.) seeds: a preliminary study. *Scientific Reports*, **12**: 4849. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08352-4>
2. **Bartolić, D.**, Mojović, M., Prokopijević, M., Djikanović, D., Kalauzi, A., Mutavdžić, D., Baošić, R., Radotić, K. 2021. Lignin and organic free radicals in maize (*Zea mays* L.) seeds in response to aflatoxin B1 contamination. An optical and EPR spectroscopic study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **102**: 2500-2505. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11591>
3. **Bartolić, D.**, Maksimović, V., Maksimović, D.J. Stanković, M., Krstović, S., Baošić, R., Radotić, K. 2020. Variation in polyamine conjugates in maize (*Zea mays* L.) seeds contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub>: a dose-response relationship. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**: 2905-2910. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10317>

#### Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (M22):

1. **Bartolić, D.**, Stanković, M., Mutavdžić, D., Stanković S., Jovanović D., Radotić K. 2018. Multivariate Curve Resolution - Alternate Least Square analysis of excitation-emission matrices for maize flour contaminated with aflatoxin B1. *Journal of Fluorescence*, **28**: 729 – 733. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2246-z>

#### Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M34):

1. **Bartolić Dragana**, Stanković Mira, Mojović Miloš, Maksimović Vuk, Radotić Ksenija. (2018). Non-invasive mapping of redox status in the aflatoxin-stressed maize and wheat seeds by 2D electron paramagnetic resonance imaging. *3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting)*, 9-12 June, Belgrade, Serbia. p. 61 – 61.



## 8. IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora: Dragana D. Bartolić

Broj indeksa: DH05/2015

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Indikatori kontaminacije semena kukuruza (*Zea mays* L.) aflatoksinima"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini i u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

**Potpis autora**

*Dragana Bartolić*

## **9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA**

Ime i prezime autora: Dragana D. Bartolić

Broj indeksa: DH05/2015

Studijski program: Doktor hemijskih nauka

Naslov rada: „Indikatori kontaminacije semena kukuruza (*Zea mays* L.) aflatoksinima“.

Mentori: dr Rada Baošić, vanredni profesor Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta i dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik Univerziteta u Beogradu - Instituta za multidisciplinarna istraživanja.

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

**Potpis autora**

*Dragana D. Bartolić*

## 10. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Indikatori kontaminacije semena kukuruza (*Zea mays* L.) aflatoksinima“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence.

Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CCBY)
2. Autorstvo -nekomercijalno (CCBY-NC)
3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada (CCBY-NC-ND)**
4. Autorstvo -nekomercijalno - deliti pod istim uslovima (CCBY-NC-SA)
5. Autorstvo -bez prerada (CCBY-ND)
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (CCBY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu,

**Potpis autora**

*Zorana Čarović*

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo - nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime . autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.