

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



NATAŠA BOŠKOVIĆ

ODREĐIVANJE SADRŽAJA BIOMETALA (Ca, Mg, Cu i Zn)
U KOPRIVI (*Urtica dioica* L.) I NJENOM EKSTRAKTU SA
RAZLIČITIH LOKALITETA U CRNOJ GORI

MASTER RAD

Podgorica, 2023.

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



NATAŠA BOŠKOVIĆ

ODREĐIVANJE SADRŽAJA BIOMETALA (Ca, Mg, Cu i Zn)
U KOPRIVI (*Urtica dioica* L.) I NJENOM EKSTRAKTU SA
RAZLIČITIH LOKALITETA U CRNOJ GORI

MASTER RAD

Podgorica, 2023.

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Nataša Bošković

Datum i mjesto rođenja: 16.04.1997. godine; Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Osnovne studije: 2019. godine

Specijalističke studije: 2020. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Određivanje sadržaja biometala (Ca, Mg, Cu i Zn) u koprivi (*Urtica dioica* L.) i njenom ekstraktu sa različitih lokaliteta u Crnoj Gori

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 27.04.2023.

Datum prihvatanja teme: 11.07.2023.

Mentor: Prof. dr Zorica Leka, redovni profesor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Zorica Leka, red. prof. MTF-a, mentor

Prof. dr Nada Blagojević, red. prof. MTF-a, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, red. prof. MTF-a, član

Komisija za odbranu radu:

Prof. dr Zorica Leka, red. prof. MTF-a, mentor

Prof. dr Nada Blagojević, red. prof. MTF-a, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, red. prof. MTF-a, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 28.12.2023. godine

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Nataša Bošković

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „Određivanje sadržaja biometala (Ca, Mg, Cu i Zn) u koprivi (*Urtica dioica* L.) i njenom ekstraktu sa različitih lokaliteta u Crnoj Gori“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

Podgorica, 2023.godine

Potpis studenta

IZVOD

Biljke i biljni čajevi su još od davnina korišćeni kao lijekovi u narodnoj medicini. Kopriva (*Urtica dioica* L.) je biljka koja ima široku primjenu i koristi se za pravljenje različitih preparata. U sastavu koprive se nalaze različita bioaktivna jedinjenja (terpeni, masne kiseline, fenolna i polifenolna jedinjenja, aminokiseline, hlorofil, vitamini, ugljeni hidrati, kao i minerali). Mineralni elementi su vrlo bitni za normalno funkcionisanje organizma. Neki elementi su potrebni u manjim (mikroelementi) a neki u većim količinama (makroelementi). Nedovoljan unos ovih elemenata može dovesti do različitih oboljenja. Predmet istraživanja ovog master rada su makroelementi (Ca, Mg) i mikroelementi (Cu, Zn) elementi u listu koprive i njenom vodenom ekstraktu. U istraživanju su korišćeni uzorci lista koprive sa tri različita geografska područja Crne Gore (sjevernom, centralnom i južnom) i u dvije različite sezone rasta (jesen i proljeće). Elementi su određeni pomoću optičke emisije spektrofotometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Nađeno je da je najzastupljeniji esencijalni makroelement u biljci Ca i njegova koncentracija se kretala od 36105 do 83494 mg/kg suvog lista koprive (SLK). Drugi po zastupljenosti u koprivi je makroelement Mg (5273 - 33767 mg/kg SLK). Manje zastupljeni su mikroelementi i to redom Zn (13,73 - 19,72 mg/kg SLK) zatim Cu (3,16 - 10,42 mg/kg SLK). U ekstraktima sadržaj elemenata varira u sljedećem rasponu, Ca (6032 - 14220 mg/kg SLK), Mg (2200 - 27200 mg/kg SLK), Zn (2,26 - 11,2 mg/kg SLK) i Cu (1,82 - 3,74 mg/kg SLK). Iz biljnog materijala, sa nekih lokaliteta, ekstrahovan je značajan procenat metala u vodeni infuz (Cu do 82%, Mg do 81% i Zn do 66%). Korelacionom analizom po sezonama je nađena pozitivna korelacija između Ca i Mg i negativna između Ca i Zn; međutim, zbirnom korelacijom (nezavisno od sezone i lokaliteta) utvrđena je statistička značajnost samo negativne korelacije između Ca i Zn ($p=0,004 < 0,05$). U ovom radu je, takođe, određen sadržaj hlorofila spektrofotometrijskom metodom. Obzirom da sadržaj hlorofila varira u zavisnosti od klimatskih uslova, nađen je različit sadržaj hlorofila u uzorcima sa različitih područja Crne Gore. U jesen je najveći sadržaj ukupnog hlorofila nađen u koprivi uzorkovanoj na lokalitetu L3 (0,317 mg/kg) a najmanji na lokalitetu L1 (0,147 mg/kg). U proljećnoj sezoni je najviše ukupnog hlorofila nađeno na lokalitetu L1 (0,241 mg/kg) a najmanje na lokalitetu L3 (0,052 mg/kg). Odnos hlorofila *a/b* se kreće od 1,94 do 4,2 u ispitivanim uzorcima.

Ključne riječi: kopriva, bioelementi, makroelementi (Ca, Mg), mikroelementi (Cu, Zn), ICP-OES, spektrofotometrija, hlorofil.

ABSTRACT

Plants and herbal teas have been used as medicines in folk medicine since ancient times. Nettle (*Urtica dioica L.*) is widely used herb with extensive tradition in making various care products. Nettle contains numerous compounds (terpenes, fatty acids, phenolic and polyphenolic compounds, amino acids, chlorophyll, vitamins, carbohydrates, as well as minerals). Mineral elements are very important for the normal functioning of the human organism. Some elements are needed in smaller amounts (microelements) and some in larger amounts (macroelements). Insufficient intake of these elements can lead to various diseases. The subject of this master thesis is the determination of some macroelements (Ca, Mg) and microelements (Cu, Zn) in the nettle leaf and its water extract. Nettle leaf sample, used in this research, were collected from three different geographical areas of Montenegro (northern, central and southern), during two growing seasons (autumn and spring). The elements amount in nettle leaf and its water extracts were determined using inductively coupled plasma optical emission spectrophotometry (ICP-OES). It was determined that the most abundant essential macroelement in the plant is Ca and its concentration ranged from 36105 mg/kg to 83494 mg/kg of dry nettle leaf (DNL). The second most abundant element in nettle is the macroelement Mg (from 5273 mg/kg to 33767 mg/kg DNL). Microelements are less abundant, namely Zn (from 13,73 mg/kg to 19,72 mg/kg DNL) and Cu (from 3,16 mg/kg to 10,42 mg/kg DNL). For nettle water extracts, the situation is different, so the content of elements varies in the following range: Ca (from 6032 mg/kg to 14220 mg/kg), Mg (from 2200 mg/kg to 27200 mg/kg), Zn (from 2,26 mg/kg to 11,2 mg/kg) and Cu (from 1,82 mg/kg to 3,74 mg/kg). Significant solubility of investigated elements in the water extracts was found (Cu up to 82%, Mg up to 81% and Zn up to 66%). Correlation analysis by season revealed a positive correlation between Ca and Mg and a negative correlation between Ca and Zn; however, while the aggregate correlation (regardless of the season and locality) revealed the statistical significance only in negative correlation between Ca and Zn ($p=0,004 < 0,05$). In this work, the chlorophyll content was determined by the spectrophotometric method. Considering that the chlorophyll content varies depending on the climatic conditions, different chlorophyll content was found in samples from different areas of Montenegro. In autumn, the highest amount of total chlorophyll in nettle leaves was found in samples collected in location L3 (0,317 mg/kg) and the lowest chlorophyll content in samples from location L1 (0,147 mg/kg). In spring season, the highest total chlorophyll content was found in nettle leaves in location L1 (0,241 mg/kg)

while the lowest content was found in samples from location L3 (0,052 mg/kg). The ratio of chlorophyll *a/b* ranges from 1,94 to 4,2 in the examined samples.

Keywords: nettles, bioelements, macroelements (Ca, Mg), microelements (Cu, Zn), ICP-OES, spectrophotometry, chlorophyll

Zahvalnica

Zahvalnost na prvom mjestu dugujem svojoj mentorki prof. dr Zorici Leka na izdvojenom vremenu, svakom stručnom savjetu, strpljenju i povjerenju koje mi je ukazala, kako tokom izrade ovog rada, tako i tokom studiranja.

Takođe se zahvaljujem ostalim članovima komisije, prof. dr Nadi Blagojević i prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica na konstruktivnim i stručnim savjetima tokom studiranja i tokom izrade ovog rada. Zahvalnost dugujem i stručnoj saradnici Milici Odalović na sugestijama i smjericama pri izvođenju eksperimentalnog dijela ovog master rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene, motivisali me i pružali bezrezervnu podršku, razumjevanje i ljubav tokom svih ovih godina.

Nataša Bošković

SADRŽAJ

1. UVOD	9
2. TEORIJSKI DIO	11
2.1. BIOELEMENTI	11
2.2. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE I BIOLOŠKI ZNAČAJ METALA	14
2.2.1. Kalcijum (Ca)	14
2.2.1.1. Kalcijum u biljkama.....	17
2.2.2. Magnezijum (Mg)	18
2.2.2.1. Magnezijum u biljkama	22
2.2.2.2. Hlorofil.....	23
2.2.3. Bakar (Cu)	24
2.2.3.1. Bakar u biljkama	28
2.2.4. Cink (Zn)	29
2.2.4.1. Cink u biljkama.....	32
2.3. KOPRIVA (<i>Urtica dioica</i> L.)	34
2.3.1. List koprive	35
2.3.2. Cvijet koprive	35
2.4. HEMIJSKI SASTAV KOPRIVE	36
2.5. UPOTREBA KOPRIVE	37
2.6. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST KOPRIVE	38
2.7. METODE ANALIZE HEMIJSKOG SASTAVA LISTA I EKSTRAKATA KOPRIVE .	38
2.7.1. Optička emisiona spektrofotometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)	39
2.7.1.1. Osnovne karakteristike.....	39
2.7.2. UV-VIS spektrofotometrija	41
2.7.2.1. Lambert-Berov zakon	42
3. EKSPERIMENTALNI DIO	44
3.1. MATERIJAL I METODE	44
3.1.1. Materijal	44
3.1.1.1. Karakteristike lokaliteta L1.....	45
3.1.1.2. Karakteristike lokaliteta L2.....	46
3.1.1.3. Karakteristike lokaliteta L3.....	47
3.1.2. Metode	48
3.1.2.1. Određivanje metala u listu i ekstraktima koprive (Ca, Mg, Cu i Zn) ICP-OES tehtnikom	48

3.1.2.2. Određivanje hlorofila u listu koprive UV-VIS spektrofotometrijom.....	49
4. REZULTATI I DISKUSIJA	52
4.1. CILJ RADA	52
4.2. SADRŽAJ METALA U LISTU KOPRIVE SA RAZLIČITIH PODRUČJA CRNE GORE.....	53
4.3. SADRŽAJ METALA U EKSTRAKTIMA LISTA KOPRIVE SA RAZLIČITIH PODRUČJA CRNE GORE	60
4.3.1. Korelaciona analiza	67
4.4. SADRŽAJ HLOOROFILA U LISTU KOPRIVE SA RAZLIČITIH LOKALITETA CRNE GORE.....	69
4.4.1. Korelaciona analiza	72
5. ZAKLJUČAK	74
6. LITERATURA	76

1. UVOD

U posljednje vrijeme daje se veliki značaj ljekovitom bilju. To proizilazi iz vjerovanja da su preparati od ljekovitog bilja bezopasni za razliku od sintetički dobijenih preparata. Biljke su bogate različitim klasama jedinjenja, npr. terpenima, masnim kiselinama, aminokiselinama, fenolnim i polifenolnim jedinjenjima, hlorofilom, vitaminima, ugljenim hidratima, kao i mineralima. Mineralni elementi koji su prisutni u biljkama igraju vitalnu ulogu u metaboličkim procesima i neophodni su za opšte dobro ljudi. Zbog toga je jako bitno određivanje makro i mikroelementa jer njihov nedostatak može dovesti do raznih oboljenja (Başgel i Erdemoğlu, 2006; Arceusz i sar., 2011; Popov i sar., 2020).

Sa aspekta korisnosti za živi svijet kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), bakar (Cu) i cink (Zn) spadaju u esencijalne elemente, pri čemu Ca i Mg spadaju u makroelemente a Cu i Zn u mikroelemente. Kalcijum je komponenta ćelijskog zida i aktivator velikog broja enzima (adenozin trifosfat-aze, α -amilaze, fosforilaze itd.). Magnezijum učestvuje u biosintezi proteina. Bakar je sastojak velikog broja enzima iz grupe oksidaza (citohrom-oksidade, superoksid-dizmutaze, polifenol-oksidade itd.). Cink je poznati aktivator enzima u biosintezi ribonukleinske kiseline, triptofana i skroba (Popović, 2005). Nivo elemenata u biljkama zavisi od različitih faktora kao što su starost biljke kada se bere, genetika biljaka, stanje zemljišta, padavine i nadmorska visina (Malik i sar., 2008). Mogućnosti primjene biljaka i njihovih ekstrakata su vrlo široke, počevši od farmaceutske industrije, preko hrane i pića do svakodnevne primjene u poljoprivredi i mnoge druge. Minerale treba "izvući" iz biljnog materijala što je više moguće kako bi se zadovoljile dnevne potrebe ljudskog organizma (Đurović i sar, 2018; Popov i sar., 2020).

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je višegodišnja biljka iz botaničke porodice Urticaceae. Ova biljka je široko rasprostranjena. Kopriva je poznata po primjeni u narodnoj medicini, gdje se koristi za liječenje raznih bolesti i poremećaja. Različite klase jedinjenja su prisutne u ovoj biljci, što objašnjava širok spektar njene biološke aktivnosti. Poznato je da ova biljka djeluje antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno i ima citotoksična i analgetička svojstva (Đurović i sar, 2018; Popov i sar., 2020).

Osnovni cilj ove master teze jeste odrediti koncentraciju navedenih biometala (Ca, Mg, Cu i Zn) u listu koprive i njenom vodenom ekstraktu sa različitih lokaliteta u Crnoj Gori iz različitih sezona rasta (proljeće/jesen).

Ovim radom je utvrđeno da li uzorci lista koprive sa različitih geografskih područja iz različitih vegetacionih perioda (sezona) sadrže istu ili različitu količinu navedenih biometala. Određen je procenat zadovoljenja dnevnih potreba za ispitivanim biometalima pri konzumiranju lista koprive i njenog vodenog ekstrakta pozanatog u narodu kao “čaj”. Dobijeni rezultati su upoređeni sa dosadašnjim istraživanjima sličnog tipa.

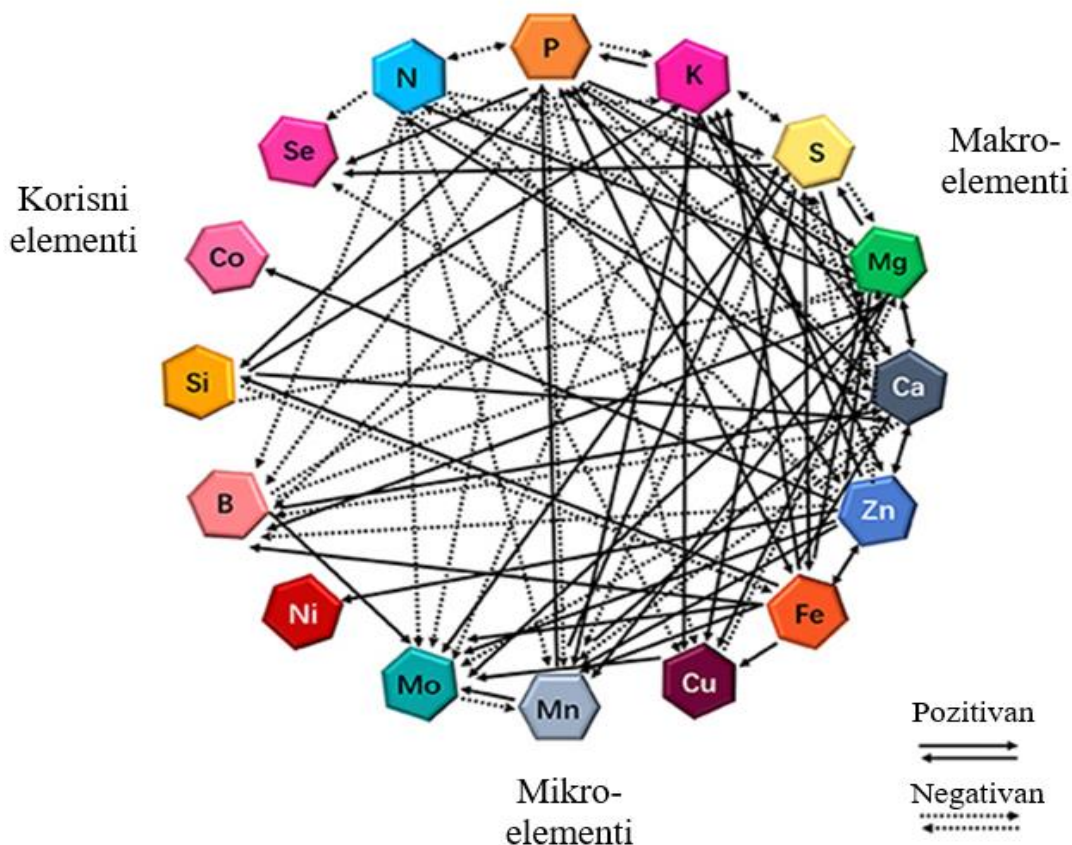
2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOELEMENTI

Neorganski elementi su neophodni za biološke procese što je predmet istraživanja bioneorganske hemije. Bioneorganska hemija obuhvata proučavanje uloge prirodnih neorganskih elementa u biološkim sistemima. Ova naučna disciplina se bavi istraživanjem neorganskih elemenata u ishrani, ispitivanjem njihove toksičnosti kao i transporta i skladištenja metalnih jona (Lippard and Berg, 1994). Poznato je da nisu svi elementi podjednako zastupljeni u biološkim sistemima. Neki neorganski elementi, kao npr. natrijum i kalijum, kalcijum i magnezijum, prisutni su u prilično velikim koncentracijama (makroelementi) dok drugi, kao što su kobalt, bakar, gvožđe i cink su prisutni u manjim koncentracijama (mikroelementi). U ljudskom tijelu su najviše zastupljeni sledeći elementi (redom po zastupljenosti: vodonik, kiseonik, ugljenik i azot) (Crichton, 2007). Za izgradnju svih važnih molekula i biomolekula prisutnih u živim sistemima (proteina, nukleinskih kiselina i biomembrana) koristi se šest elemenata (vodonik, ugljenik, azot, kiseonik, fosfor i sumpor) (Sigel i sar., 2013; Jomova i sar., 2022). U esencijalne metale pored natrijuma, kalijuma, magnezijuma i kalcijuma spadaju i mangan, gvožđe, kobalt, bakar, cink i molibden (slika 1a) (Jomova i sar., 2022). Na slici 1b dat je odnos između makro- i mikro-elemenata ili korisnih elemenata u biljkama kao odgovor na individualni nedostatak određenih metala. Interakcije koje su rezultat nedostatka jednog elementa (bilo koji od 16 elemenata) dovode do pojačanog (pune linije) ili smanjenog (isprekidane linije) unosa drugih minerala (Fan i sar., 2021).

H											
Li	Be										
Na	Mg										
K	Ca										
Rb	Sr										
Cs	Ba										
		Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
		Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd
		Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg

Slika 1a. Esencijalni elementi (zelena) (Jomova i sar., 2022).



Slika 1b. Odnos između makro- i mikro-elemenata ili korisnih elemenata u biljkama (Fan i sar., 2021).

Metalni joni imaju važnu biološku ulogu ali ako su prisutni u višku, mogu imati toksične efekte. Nedostatak ili višak esencijalnih metala je povezan sa mnogim bolestima. Mnogobrojne studije se bave ispitivanjem mehanizama ovih bolesti. Shodno tome sprovode se istraživanja koja bi bila značajna sa aspekta dizajna lijekova (Palermo i sar, 2021; Jomova i sar., 2022).

Esencijalni metal je onaj koji je neophodan za kompletan životni ciklus organizma, čije odsustvo proizvodi specifične simptome nedostatka koje ublažava samo taj metal i čiji efekat treba da se izrazi na osnovu njegove krive “doza-odgovor”. Često se na pogrešan način koristi termin “esencijalan” jer bi po pravilu trebalo naznačiti koji organizmi pokazuju potrebu za tim elementom. Ali opet, koristi se slobodno za označavanje i elemenata i njegovih jedinjenja (Zoroddu i sar., 2019).

Biološko funkcionisanje deset esencijalnih metala je povezano sa njihovim fizičko-hemijskim svojstvima. Naročito je značajano svojstvo vezivanja liganda i mobilnost (tabela 1). Mobilnost metala je u obrnutoj korelaciji sa vezivanjem liganda. Joni metala, Na^+ , Mg^{2+} , K^+ i Ca^{2+} , vezuju ligande slabo do umjereno i posjeduju visoku mobilnost u biološkim sistemima. Nasuprot tome, Fe, Cu, Zn, Co, Mn i Mo su d-metali (sadrže d-elektrone), koji formiraju metalne

komplekse u kojima su ligandi snažno vezani i imaju širok spektar načina koordinacije (Jomova i sar., 2022).

Tabela 1. Esencijalni metali i njihova oksidaciona stanja, svojstva vezivanja liganda, mobilnost, funkcija u biološkim sistemima i količine koje se prirodno javljaju u ljudskom tijelu (Jomova i sar., 2022).

Metalni jon	Vezivanje liganda	Mobilnost	Biološka funkcija	Masa u ljudskom tijelu (g)
Na ⁺	Slabo	Velika	Regulatorna funkcija	65-115
K ⁺	Slabo	Velika	Nervno djelovanje, osmotski pritisak	155-195
Mg ²⁺	Srednje	Semi mobilan	Energetski metabolizam adenzin trifosfat → adenzin difosfat hlorofil	30
Ca ²⁺	Srednje	Semi mobilan	Signalizacija, regulacija enzima, kontrakcija mišića, skeletni sistem	1100
Zn ²⁺	Srednje/Jako	Srednja	Luisova kiselina, strukturna uloga	2,5
Co ^{2+,3+}	Jako	Velika	Vitamin B12 koenzim	0,003
Cu ^{+,2+}	Jako	Velika	Prenos elektrona, skladištenje kiseonika	0,075
Fe ^{2+,3+}	Jako	Velika	Prenos elektrona, skladištenje kiseonika	4,2
Mn ^{2+,3+,4+}	Jako	Velika	Enzim	0,013
Mo ^{2+,3+,4+,5+,6+}	Jako	Velika	Enzim	0,005

2.2. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE I BIOLOŠKI ZNAČAJ METALA

2.2.1. Kalcijum (Ca)

Kalcijum je hemijski element koji pripada grupi zemnoalokalnih metala. Nalazi se u drugoj grupi i četvrtoj periodi Periodnog sistema elemenata i njegov atomski broj je 20. Kalcijum je po masi treći metal u zemljinoj kori, gdje se najčešće javlja u obliku sedimentnih stijena. Njegova ukupna koncentracija u morskoj vodi je znatno veća u odnosu na slatkovodnu sredinu (5 do 50 puta veća). Koncentracija kalcijuma u običnoj vodi iz slavine varira u zavisnosti od lokacije. U serumu odraslih ljudi koncentracija kalcijuma obično iznosi 2,45 mM (Perrone i Monteiro, 2016).

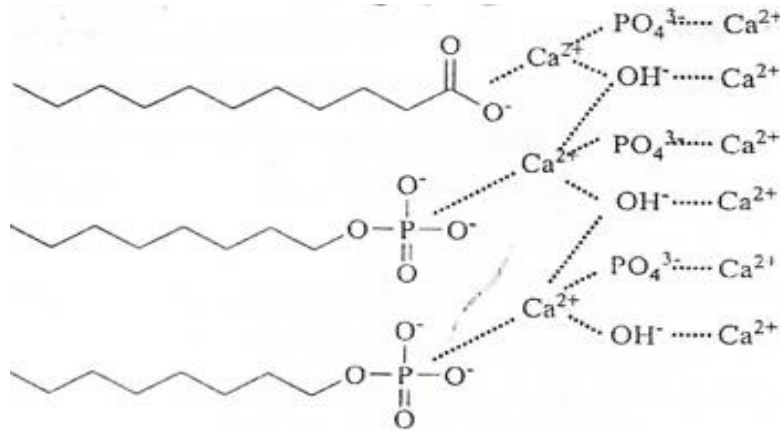
Ime je dobio po latinskoj riječi „calk“ što znači kreč. Još od antičkog doba ljudi su koristili jedinjenja koja u sebi sadrže kalcijum. Spoljni poklopac piramide u Gizi je u potpunosti napravljen od krečnjaka (kalcijum-karbonata, CaCO_3). Rimljani su pripremali beton tako što su miješali kreč (kalcijum-oksidi, CaO) sa vulkanskim stijenama. Kalcijum ima elektronsku konfiguraciju ($[\text{Ar}] 4s^2$). Dva elektrona u valentnoj ljusci se lako gube i time se povećava stabilnost i omogućava formiranje jonskih veza sa anjonima. Radijus Ca^{2+} jona iznosi 99 ppm. Kalcijum formira bezbojne neorganske soli koje su obično rastvorljive u vodi (osim kalcijum-sulfata, CaSO_4 , kalcijum-karbonata, CaCO_3 i kalcijum-fosfata, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Rastvorljivost kalcijumovih kompleksa, helata, zavisi od pH vrijednosti. pH ima veliki uticaj na apsorpciju kalcijuma u ljudskom organizmu (Perrone i Monteiro, 2016).

Ca^{2+} je tvrda Luisova kiselina što znači da će se prije vezivati za tvrde Luisove baze. Zbog toga kalcijum srednje jako vezuje organske ligande i ima manju pokretljivost od jona natrijuma i kalijuma (Jomova i sar., 2022). Za jon Ca^{2+} se najčešće koordinuju atomi kiseonika koji potiču od glutaminske i asparaginske kiseline, karbonil-grupe i vode. Koordinacioni broj Ca^{2+} je obično od šest do osam (Linse i Forsen, 1995; Jomova i sar., 2022).

Pored koordinacije sa donorskim atomima koji potiču iz proteina, Ca^{2+} je često koordinovan sa jednim ili dva molekula vode. Postoje primjeri koordinacije i sa tri ili četiri koordinovana molekula vode (npr. proteinaza K) (Linse i Forsen, 1995; Jomova i sar., 2022).

Kao tvrda Luisova kiselina preko O-donorskih atoma nekih biomolekula, gradi rastvorna kompleksna jedinjenja koja su prisutna u različitim biološkim tečnostima i tkivima. Preporučeni dnevni unos kalcijuma za odrasle osobe iznosi 700-800 mg po danu. Za muškarce i žene starije od 50 godina se preporučuje veća količina ovog elementa odnosno 1200 mg

dnevno kalcijuma. Najvećim dijelom, oko 99% se nalazi u kostima i zubima, i to u obliku minerala hidroksiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$, i karbonata (Zoroddu i sar., 2019). U kostima je hidroksiapatit povezan sa matriksom kojeg najviše izgrađuje kolagen (slika 2).

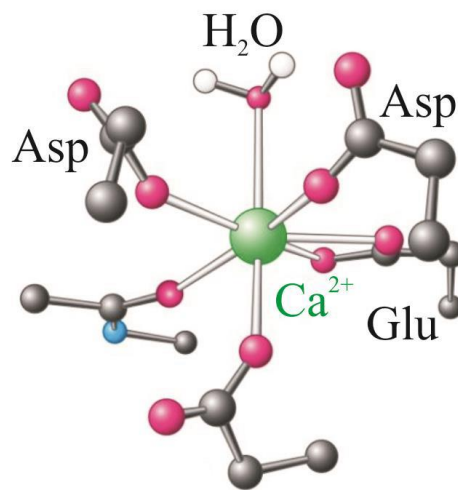


Slika 2. Hidroksiapatit vezan za kolagen (Grgurić-Šipka, 2014)

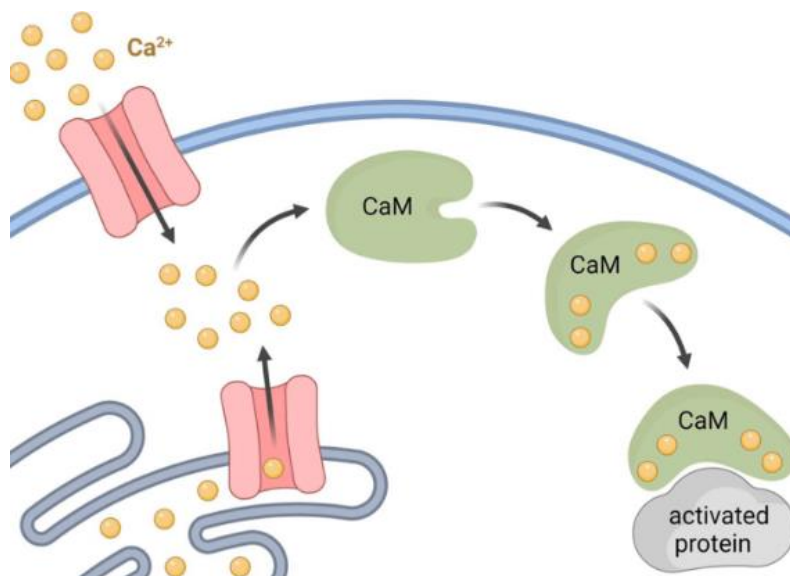
Preostali dio od 1% kalcijuma se nalazi u ćelijama i tkivima i ima značajnu ulogu u regulaciji čitavog niza ćelijskih odgovora (Crichton, 2007). Kalcijum je ekstracelularni katjon jer je njegova koncentracija van ćelije 10^4 puta veća nego unutar nje. Ekstracelularni kalcijum je neophodan za mnogobrojne procese (formiranje skeletnih tkiva, prenos impulsa nervnog tkiva, ekscitacija kontrakcije skeletnih i srčanih mišića i zgrušavanje krvi) (Moreira i sar., 2016). Postoje djelovi u ćeliji u kojima je najviše prisutan a to su mitohodrije, endoplazmatični retikulum i Golžijev aparat (Grgurić-Šipka, 2014). Za održavanje koncentracije Ca u serumu na konstantnom nivou odgovorna su tri hormona (paratiroidni hormon, vitamin D i kalcitonin). Ovi hormoni su odgovorni za pravilnu crijevnu apsorpcija Ca, bubrežnu reapsorpciju, izlučivanje Ca i upotrebu zaliha Ca u kostima (Maud i sar., 2009; Saad i sar., 2016).

Mogućnost Ca^{2+} jona da se koordinuje sa šest ili osam kiseonikovih atoma, omogućava mu da se veže na različite segmente proteina i tako indukuje značajne konformacijske promjene u proteinima. Jedan od primjera gdje je Ca^{2+} jon koordinovan sa 6 atoma kiseonika koji potiču iz karboksilnih grupa proteina, i sa jednim kiseonikovim atomom koji potiče od molekula vode, jeste kalmodulin (CaM) (slika 3a). Vezivanje Ca za kalmodulin dovodi do konformacionih promjena koje omogućavaju kalmodulinu da se veže za enzim čiji supstrat onda biva aktiviran (slika 3b). Kalmodulin je protein koji veže 4 Ca^{2+} jona. Vezanje Ca^{2+} na CaM se dešava kada je koncentracija Ca^{2+} u citoplazmi veća od 500 nmol/dm^3 . U prisustvu visoke koncentracije

Mg²⁺ jona, priroda ovih koordinacionih mjesta obezbjeđuje selektivnost ka Ca²⁺ jonu zbog njegovog većeg poluprečnika u odnosu na Mg²⁺ (Grgurić-Šipka, 2014).



Slika 3a. Vezivanje kalcijuma u kalmodulinu (Grgurić-Šipka, 2014)



Slika 3b. Aktivacija kalmodulina (Beghi i sar., 2022)

Ako ishranom ne mogu da se obezbjede dovoljne količine ovog elementa, organizam će mobilisati kalcijum iz kostiju što uzrokuje povećan nivo cirkulacije hormona paratiroidne žlijezde (PTH). Kostu su u stanju da održe nivo kalcijuma u krvi stabilnim (Zoroddu i sar., 2019). U organizmu čovjeka se odvija intenzivan promet kalcijuma pa se može govoriti o njegovom bilansu. Visoka koncentracija kalcijuma (hiperkalcijemija) pogađa neuromišićni, gastrointestinalni, bubrežni, skeletni i kardiovaskularni sistem. Povećan unos kalcijuma

mineralnog porijekla (više od 2000 mg dnevno) može da izazove kardiovaskularne i nefrološke probleme (Moreira i sar., 2016).

Hipokalcijemija (pojava manjka kalcijuma) se može javiti usled hipoparatiroidizma, akutne ili hronične bubrežne insuficijencije, niskog unosa vitamina D, genetske anomalije ili terapijskih razloga vezanih sa nekim lijekovima za antiosteoporozu ili helaciju (Fong i Khan, 2012; Zoroddu i sar., 2019).

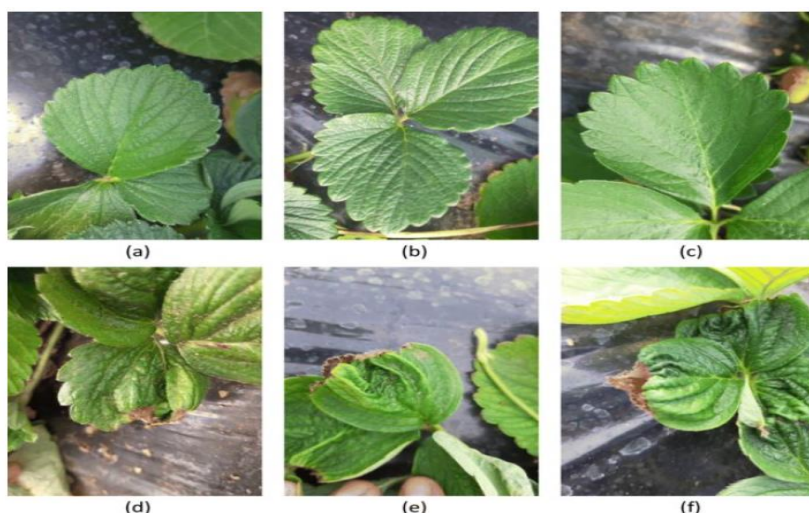
2.2.1.1. Kalcijum u biljkama

Kalcijum igra važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka. Ovaj metal predstavlja esencijalnu hranljivu materiju za brojne biljne vrste (posebno za njihov korijen i vrh izdanka). Divalentni katjon Ca^{2+} ima strukturnu ulogu u ćelijskom zidu i membranama, kao protivkatjon za neorganske i organske anjone u vakuoli i kao intracelularni glasnik u citosolu (Marschner H., 1995; White i Broadley, 2003).

Biljne vrste se razlikuju po sadržaju Ca^{2+} jona. Sadržaj Ca^{2+} jona se kreće između 0,1 i 5,0% suve mase za različite biljne vrste i organe. Koncentracija kalcijuma u zemljištu varira od <0,01% kalcijuma u kiselim zemljištima do veoma velike koncentracije u krečnjačkim zemljištima (Burstrom, 1968; Tuteja i Mahajan, 2007).

Ca^{2+} jon ulazi u biljne ćelije kroz Ca^{2+} propustljive jonske kanale u njihovim plazma membranama. Prisustvo visokog nivoa Ca^{2+} jona može ublažiti toksične efekte koji se prouzrokuju uzimanjem nekih drugih katjona iz zemljišta (kao npr. Sr^{2+} , Al^{3+}). Tako usled nedostatka kalcijuma može da dođe i do apsorpcije stroncijuma iz zemljišta. Zbog hemijske sličnosti Ca sa Sr može da dođe do zamjene Ca sa Sr. Tako, ako je u zemljištu prisutan Sr-90 (radioaktivni) biljka može da apsorbuje radioaktivni Sr čime se on dalje prenosi kroz lanac ishrane do životinja i čovjeka. Postoje istraživanja koja potvrđuju prisustvo Sr-90 u zubima, kostima kao i bubrežnim kamencima čovjeka. Ugradnjom Sr-90 u kosti one se oštećuju kao i obližnja tkiva usled zračenja tokom vremena (vrijeme poluraspada Sr-90 je 29 godina) (Greger, 2004).

Nedostatak kalcijuma je rijedak slučaj ali se u određenim slučajevima može javiti na zemljištima sa visokim nivoom kiselog taloženja ili sa niskom baznom zasićenošću (Mc Laughlin i Wimmer, 1999). Poremećaji nedostatka Ca se javljaju zbog nedostupnosti kalcijuma za tkiva koja su u razvoju. Kod biljaka nedostatak kalcijuma dovodi do usporavanja rasta korijena i izmjenjenog izgleda listova (slika 4).



Slika 4. Vizuelni izgled zdravih listova jagode a–c i listova sa nedostatkom kalcijuma d-f (Hariri i Avşar, 2022).

Dok visok sadržaj kalcijuma ograničava biljne zajednice na krečnjačka zemljišta (White i Broadley, 2003).

2.2.2. Magnezijum (Mg)

Magnezijum pripada grupi zemnoalkalnih metala. Elektronska konfiguracija magnezijuma Mg je $[\text{Ne}] 3s^2$. Po zastupljenosti u Zemljinoj kori ovaj element je osmi. Magnezijum se nalazi u preko 60 minerala. Magnezijum je uglavnom vezan za mineralna nalazišta kao npr. magnezit, MgCO_3 i dolomite, $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$. Pored minerala, magnezijum i magnezijumova jedinjenja se proizvode iz morske vode (Kramer, 2013). Međutim, hidrosfera (okeani i rijeke) su najbogatiji izvor biološki raspoloživog magnezijuma. Koncentracija magnezijuma u morskoj vodi iznosi ~55 mmol/L. Kao ekstremno primjer navodi se koncentracija magnezijuma u Mrtvom moru koja iznosi 198 mmol/L (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012).

Magnezijum je drugi najzastupljeniji element u ćelijskim sistemima i četvrti najzastupljeniji element u ljudskom tijelu (posle kalcijuma, kalijuma i natrijuma). Ukupna količina magnezijuma u ljudskom tijelu varira između 20 i 28 g. Oko 99% od ukupnog magnezijuma se nalazi u intracelularnom prostoru, uglavnom u kostima (50–65%), gdje zajedno sa kalcijumom i fosforom učestvuje u konstituciji skeleta, ali i mišićima, mekim tkivima i organima (Fiorentini i sar., 2021).

Sadržaj magnezijuma u kostima se smanjuje sa godinama i magnezijum koji se skladišti na ovaj način nije u potpunosti biodostupan. U krvi i ekstracelularnim tečnostima se nalazi manje od 1–2% Mg^{2+} jona. Magnezijum u serumu može biti kategorisan u tri frakcije. Javlja se kao slobodan/jonizovan, vezan za protein ili kompleksiran sa anjonima kao što su fosfati, bikarbonati i citrati ili sulfati. Jonizovani magnezijum ima najveću biološku aktivnost (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012).

Određivanje koncentracije magnezijuma u serumu (SMC) je glavni medicinski test koji se koristi za procjenu statusa magnezijuma kod pacijenata (Zoroddu i sar., 2019). Koncentracija magnezijuma u eritrocitima je tri puta veća nego u plazmi (Ismail i sar., 2018).

Magnezijum je element sa jonskim karakterom što dokazuje njegova niska energija jonizacije. Karakteriše ga tipičan jonski radijus od 0,72 Å ili 72 pm i težnja za heksakoordinacijom. Mg^{2+} jon se vezuje za druge molekule uglavnom preko kiseonika mada u određenim slučajevima vezivanje se može ostvariti i preko azota npr. u hlorofilu. Mg^{2+} se ne može vezati preko sumpora, za razliku od većine drugih katjona (Maguire, 2006).

Magnezijumove soli su poznate po vrlo dobroj rastvorljivosti u vodi, mnogo bolje se rastvaraju o odnosu na kalcijumove soli. Kao rezultat toga magnezijum je lako dostupan organizmima. Ovaj element igra vrlo važnu ulogu i kod biljaka i kod životinja. Kod biljaka je magnezijum vrlo važan jer je on centralni jon u biljnom pigmentu hlorofilu. Kod kičmenjaka je neophodan, posebno unutar ćelija, jer je drugi najčešći intracelularni katjon posle kalijuma. Kada je u rastvorenom stanju poznato je da magnezijum ima veći afinitet prema vodi nego kalcijum, kalijum i natrijum. Hidratisani magnezijum katjon teško dehidrira i njegova zapremina je 400 puta veća od jonske zapremine, dok je taj odnos za Na^+ i Ca^{2+} oko 25 a za K^+ oko 5 (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012). Jedna od važnijih uloga Mg je u metabolizmu fosfata a samim tim u energetske procesima. Vezuje se za difosfate i fosfate, kao i karboksilate i na taj način pokreće aktivacione procese (npr. kinaze, adenzin trifosfat-aze, enolaze i dr.). Sadržaj magnezijuma u tijelu se reguliše mehanizmima crijevne apsorpcije, bubrežne reapsorpcije/izlučivanjem i razmjenom magnezijuma iz tijela (tj. kostiju) (Rude i Gruber, 2004).

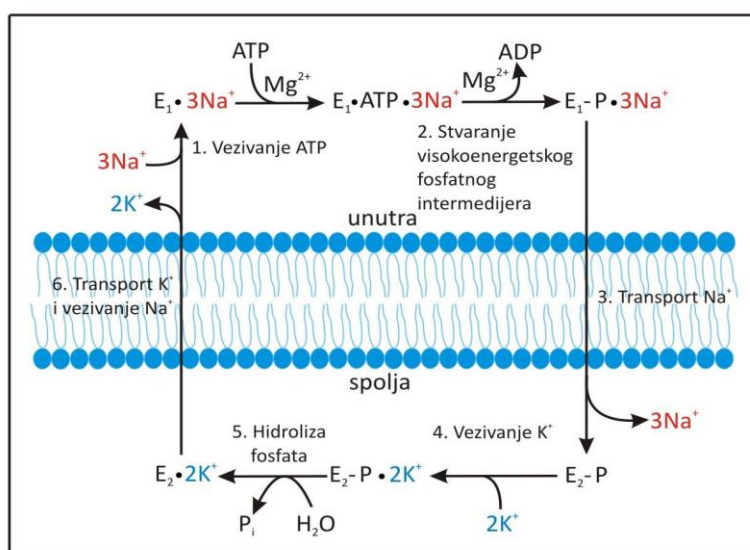
Magnezijum je kofaktor za više od 300 enzimskih reakcija. Tu igra bitnu ulogu u prenosu nervnih impulsa i sinteze masnih kiselina i proteina. Mnogi procesi zavise od magnezijuma kao npr. metabolizam adenzin trifosfata, kontrakcija i opuštanje mišića, normalna neurološka funkcija kao i oslobađanje neurotransmitera. Magnezijum doprinosi regulaciji vaskularnog tonusa, srčanog ritma, tromboze aktivirane trombocitima i formiranju kostiju. Neke od ovih funkcija su prikazane u tabeli 2 (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012).

Tabela 2. Magnezijumove funkcije u organizmu (Swaminathan, 2003; Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012).

Enzimska funkcija	Membranska funkcija	Antagonist kalcijumu	Strukturna funkcija
Enzimski supstrat (ATP-Mg, GTP-Mg)	Adhezija ćelija	Kontrakcija/opuštanje mišića	Proteini
Kinaze B (Heksokinaza, Kreatin kinaza, Protein kinaza)	Transmembranski tok elektrolita	Oslobađanje neurotransmitera	Poliribozomi
ATPaze ili GTPaze (Na ⁺ /K ⁺ -ATPaza, Ca ²⁺ -ATPaza)		Provođenje akcionog potencijala u nodalnom tkivu	Nukleinske kiseline
Ciklaze (Adenilat ciklaza, Gvanilat ciklaza)			Višestruki enzimski kompleksi
Direktna aktivacija enzima			Mitohondrije

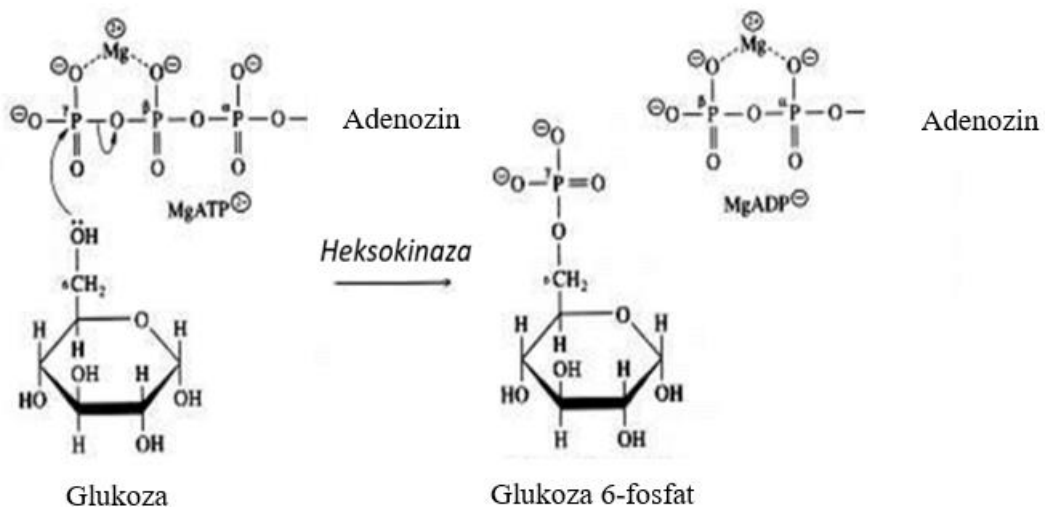
U kontrakciji mišića magnezijum stimuliše ponovni unos kalcijuma pomoću ATP-aze. Magnezijum je važan za ćelijsku adheziju i transmembranski transport uključujući transport jona kalijuma i kalcijuma (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012).

Mg²⁺ ima ulogu u jednoj od faza primarnog aktivnog transporta (jona K i Na) kada se vrši fosforilacija enzima (E₁), odnosno vezivanje ATP-aze. Za fosforilaciju enzima (E₁-fosforilovana tj. Na⁺ osjetljiva) neophodno je prisustvo Mg²⁺ sa unutrašnje strane membrane (slika 5) (Grgurić-Šipka, 2014).

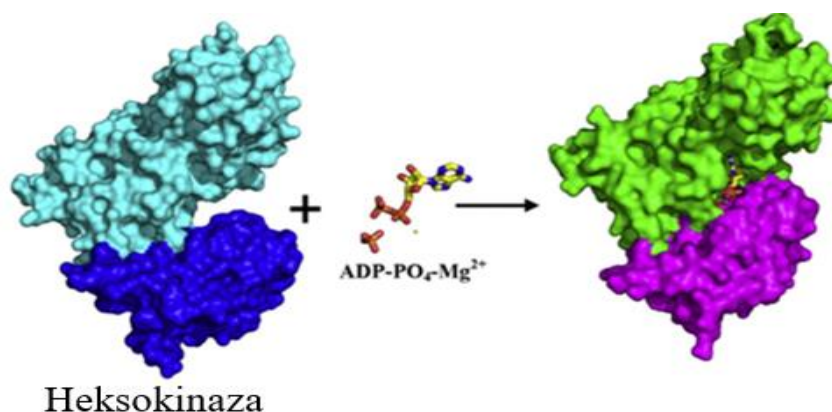


Slika 5. Uloga Mg²⁺ u transportu kroz ćelijske membrane (Grgurić-Šipka, 2014).

Mnogi enzimi uključeni u puteve intermedijarnog metabolizma su Mg^{2+} zavisni, kao i veliki broj enzima uključenih u metabolizam nukleinskih kiselina. Od ukupno 10 enzima uključenih u glikolitički put, 5 su Mg^{2+} zavisni od čega su četiri uključena u prenos fosfata-kinaze. Kinaze katalizuju uvođenje fosforil grupe u organske molekule, kao što je glukoza-6-fosfat u glikolizi. Donor fosforil grupe je Mg^{2+} -ATP kompleks. Heksokinaza katalizuje transfer fosforil grupe od Mg^{2+} -ATP na glukoza-6-fosfat i Mg^{2+} -ADP (sl. 6a) (Grgurić-Šipka, 2014). Na slici 6b su prikazane konformacione promjene heksokinaze pri vezivanju $ADP-PO_4-Mg^{2+}$.



Slika 6a. Nukleofilni napad C_6 -OH grupe glukoze na γ -fosforni atom Mg^{2+} -ATP (Grgurić-Šipka, 2014).



Slika 6b. Vezivanje $ADP-PO_4-Mg^{2+}$ za heksokinazu (He i sar., 2019)

Sadržaj magnezijum jona je odlučujući faktor imunog sistema (Van Niekerk i sar., 2018). Preporučeni dnevni unos magnezijuma za odrasle osobe iznosi 100 mg po danu. Za muškarce je preporučen veći unos nego za žene (oko 300 mg po danu) i on iznosi oko 400 mg magnezijuma dnevno (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012).

Usled nedostatka Mg mogu nastati poremećaji u organizmu kao što su: kardiovaskularne bolesti, migrene, astma, nedostatak energije u organizmu. Ozbiljan nedostatak magnezijuma može dovesti do hipomagnezijemije (Jahnen-Dechent i Ketteler, 2012). Hipomagnezijemija je stanje u kome je nivo magnezijuma u serumu manji od 1,7-1,8 mg/dL (0,75 mmol/L) (Witkowski i sar., 2011).

2.2.2.1. Magnezijum u biljkama

Magnezijum je jedan od devet esencijalnih makronutrijenata biljke. Poznato je da je magnezijum sastavna komponenta molekula hlorofila i da je uključen u više procesa koji su neophodni za rast i razvoj biljaka. Pored toga magnezijum ima ulogu i u asimilaciji ugljen-dioksida, CO₂, ponaša se kao kofaktor za brojne enzime i čini strukturnu komponentu ribozoma (Chaudhri i sar., 2021; Bakshi i Gilroy, 2022). Mg učestvuje u formiranju biljnog pigmenta hlorofila i neophodan je element za normalnu strukturu hloroplasta. Oko 2,7% molekulske težine hlorofila čini magnezijumov jon. Magnezijum je biljni aktivator mnogih enzima. Skoro sve fosforilaze i kinaze zahtjevaju aktiviranje Mg²⁺ jona. Mg²⁺ podstiče hidrolizu adenozin trifosfata ili adenozin difosfata i oslobađa fosfornu kiselinu i energiju. Magnezijum je potreban za osnovne procese prenosa energije kao što su npr. fotosinteza, glikoliza i disanje (Yan i Hou, 2018).

Količina magnezijuma koja je potrebna za optimalan rast biljke je 1,5–3,5 g po kg u vegetativnim dijelovima biljke, i oko 125 mmol L⁻¹ i 8,5 mmol L⁻¹ u zemljišnim rastvorima. Velika količina padavina u tropskim područjima dovodi do luženja magnezijuma. Iscrpljivanje magnezijuma se javlja i usled dugotrajnog neuravnoteženog đubrenja usjeva (Guo i sar., 2016). Koncentracije magnezijuma u biljci i tlu zavise od brojnih unutrašnjih i spoljašnjih faktora (npr. tipa zemljišta, pH vrijednosti, konkurentnih katjona, vlage, aeracije, temperature, svjetlosti, đubrenja itd.). Različite biljne vrste sadrže različit sadržaj Mg²⁺ jona. To je posljedica genotipske varijacije, heterogenih uslova uzgoja, različitog stadijuma rasta i starosti analiziranih tkiva. U mnogim biljkama, optimalna koncentracija Mg iznosi 0,15–0,50% suve mase lista. Koncentracija Mg u listovima uveliko varira u zavisnosti od biljne vrste (Ishfaq i sar., 2022).

Pojava nedostatka magnezijuma u biljkama je važan faktor koji ograničava prinos i kvalitet biljaka (Yan i Hou, 2018). Nedostatak magnezijuma u biljkama obično dovodi i do određenih vizuelnih promjena (kraćih korijena, manjih izdanaka i mrlja na listovima). Ove promjene se dešavaju usled poremećaja fizioloških procesa koji se ogledaju poremećajem metabolizma ugljenika, smanjenjem biljnog pigmenta hlorofila i fiksacijom ugljenika (Hermans i sar., 2010; Guo i sar., 2016).

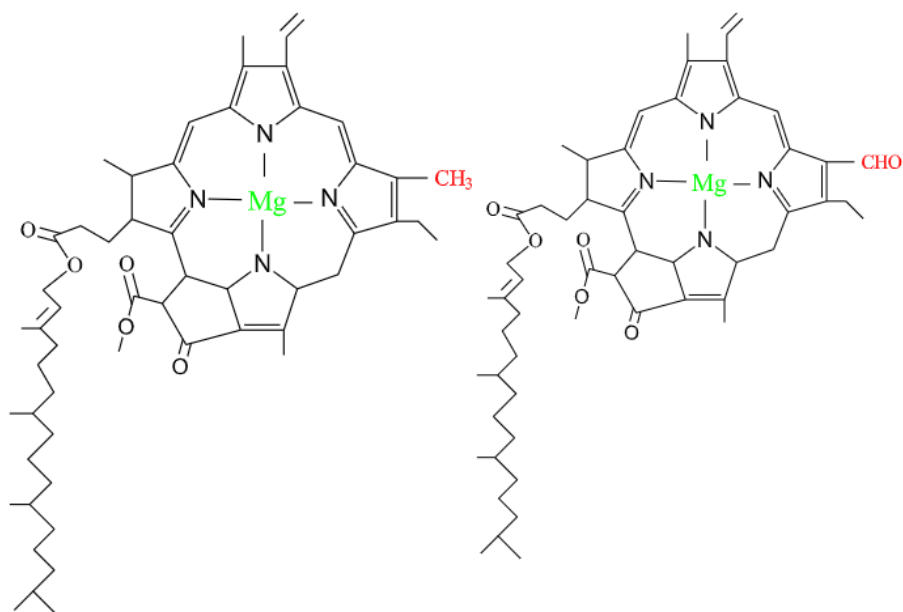
Nedostatak magnezijuma smanjuje fotosintetski sadržaj pigmenta, kapacitet apsorpcije svjetlosti hloroplasta, prividni kvantni prinos i efikasnost karboksilacije (Yan i Hou, 2018). Nedostatak magnezijuma u biljci može da izazove i velika količina kalcijuma u zemljištu koji je antagonist magnezijumu.

2.2.2.2. Hlorofil

Hlorofili spadaju u grupu najvažnijih bioorganskih molekula. Odgovorni su za zelenu boju listova jer apsorbuju svjetlost u plavom (430-490 nm) i crvenom (630-760 nm) dijelu spektra a zelenu svjetlost propušta (reflektuju). Postoji nekoliko različitih vrsta hlorofila (hlorofil *a*, *b*, *c* i *d*). Glavni pigmenti koji se nalaze u biljkama su hlorofil *a* i *b*. Hlorofil *a* je primarni fotosintetski pigment koji omogućuje pretvaranje svjetlosne energije u hemijsku. Svi ostali hlorofili su sekundarni zbog pomoćne i zaštitne uloge (Taiz i Zeiger, 2010).

Strukturu hlorofila čini porfirinski prsten koji je sastavljen od četiri povezana pirolova prstena i petog prstena koji nastaje reakcijom ciklizacije bočnog lanca na trećem prstenu. U sredini molekula se nalazi magnezijumov jon (Mg^{2+}) (Von Wettstein i sar., 1995).

Na četvrtom prstenu je estarskom vezom vezan fitol. Hlorofil *a* i *b* se razlikuju po tome jer je kod hlorofila *a* na trećem prstenu vezan metan ($-CH_3$) a kod hlorofila *b* aldehidna grupa ($-CHO$). Na slici 7 je prikazana struktura hlorofila *a* i hlorofila *b* (Von Wettstein i sar., 1995). Na sadržaj hlorofila utiču; starost i položaj listova, intenzitet svjetla, uporedni procesi sinteze i razgradnje hlorofila, mineralna ishrana, temperatura, vlaga, genotip i drugo.



Slika 7. Struktura hlorofila *a* (lijevo) i hlorofila *b* (desno) (Grgurić-Šipka, 2014)

2.2.3. Bakar (Cu)

Latinski naziv za bakar je „cuprum”. Bakar je bio jedan od prvih pronađenih metala. Bakar je važan element za sve poznate žive organizme i u prirodi se javlja u svim biljkama i životinjama. Njegova prosječna koncentracija u zemljinoj kori iznosi 55 ppm. U morskoj vodi se javlja u koncentraciji od $3 \cdot 10^{-3}$ mg/L (Theophanides i Anastassopoulou, 2002). Bakra više ima u ekstracelularnoj tečnosti nego unutar ćelija. Kroz krv se prenosi proteinom ceruloplazminom. Ceruloplazmin sadrži čak osam atoma bakra po jednom molekulu (Grgurić-Šipka, 2014). Ceruloplazmin sadrži oko 95% bakra koji se nalazi u serumu (Jomova i Valko, 2011).

Bakar je treći mineral po zastupljenosti u ljudskom tijelu. Ukupna količina bakra kod normalnih odraslih osoba je 50-150 mg, od čega je 50%-70% u mišićima i kostima, 20% u jetri i 5%-10% u krvi. U tijelu ima veoma malo slobodnih Cu jona (Wang i sar., 2020).

Prema američkom institutu za medicinu, odgovarajuća doza Cu za odrasle je 0,9 mg/dan dok Evropska agencija za bezbjednost hrane preporučuje 1,6 mg/dan za muškarce i 1,3 mg/dan za žene. Gornja granica unosa za odrasle iznosi 10 mg/dan (Jacobs i sar., 2020).

Njegova elektronska konfiguracija je $3d^{10}4s^1$. To znači da Cu(I) ima elektronsku konfiguraciju $3d^{10}$ i popunjene d orbitale dok Cu(II) gubi 2 elektrona i ima $3d^9$ konfiguraciju pa se zbog toga ponaša kao prelazni element sa djelimično popunjenim d-orbitalama (Theophanides i Anastassopoulou, 2002).

Činjenica da bakar u redukovanom, a Fe u oksidovanom obliku grade nerastvorna jedinjenja, imala je vrlo važne posledice na biogenezu, odnosno razvoj života iz neorganskog materijala, prije skoro 3 milijarde godina. Naime, u to doba, okeani su bili potpuno bez kiseonika, ali s velikim udjelom sumporovodika. Kao posledica toga, većina raspoloživog bakra bila je vezana u obliku veoma nerastvornog sulfida (Cu_2S , $K_s=2 \cdot 10^{-47}$). Kako je kiseonik nastajao u ranoj evoluciji tako se gvožđe taložilo u obliku Fe(III)-hidroksida ($K_s=4 \cdot 10^{-38}$) a nerastvorni sulfid se oksidacijom pretvarao u rastvorni bakar(II)-hidroksid ($K_s=2 \cdot 10^{-19}$) i postao biodostupan. Tako, za mnoge proteine koji sadrže Fe postoje analogni proteini koji sadrže Cu sa sličnim funkcijama. Pošto se kasnije pojavio u biodostupnom obliku, Cu više ima u ekstracelularnoj tečnosti dok Fe ima više unutar ćelije (Grgurić-Šipka, 2014).

Bakar je u enzimima zadužen za prenos, aktivaciju i upotrebu kiseonika, te za prenos elektrona, odnosno za reakcije oksidoredukcije u kojima bakar kao centralni jon oksiduje ili redukuje supstrat, a pri tome i sam mijenja oksidaciono stanje oksidujući se iz Cu(I) u Cu(II), odnosno, redukujući se iz Cu(II) u Cu(I) (Grgurić-Šipka, 2014).

Na osnovu njihove funkcije bakarni proteini se mogu podijeliti u tri grupe:

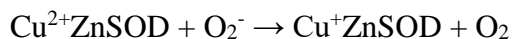
1. Proteine za prenos molekula kiseonika,
2. Enzime za aktivaciju i ugradnju kiseonika u supstrat, koji se još zovu i oksigenazama,
3. Enzime koji katalizuju razilčite reakcije oksidoredukcije, i koji se još zovu oksidazama.

Ovim trima grupama mogu se dodati i heteronuklearni enzimi koji uz bakar sadrže i neki drugi metal u aktivnom centru – heteronuklearni metaloenzimi npr. superoksid-dismutaza (SOD) i citohrom C oksidaza (Grgurić-Šipka, 2014).

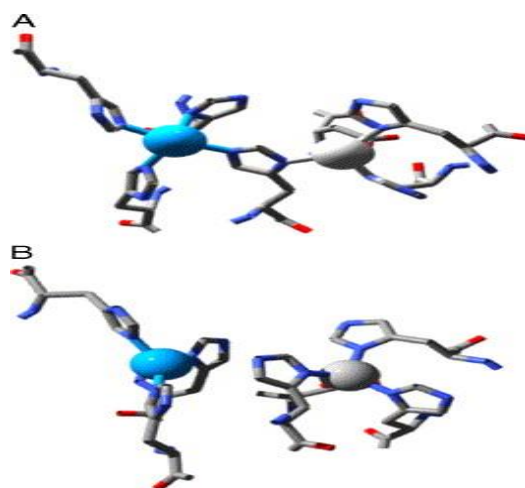
Superoksid je reaktivni kiseonikov radikal koji nastaje jednoelektronskom redukcijom molekula kiseonika. Njega u organizmu, u normalnim uslovima, ne može biti puno. Čelije sisara svojim vrlo sofisticiranim sistemom za odbranu od štetnih superreaktivnih slobodnih radikala (poput Cu, Fe, Mn- enzima) koji sadrži dva međudjelujuća redoks centra, sprovode dvoelektronsku redukciju kiseonika u molekul vode. Pri tome nastaju uvijek i male količine nepoželjnog superoksida. Ključni faktor u njegovoj neutralizaciji je enzim superoksid-dismutaza (SOD) koji katalizuje disproporcionisanje superoksida, gdje kiseonik ima oksidacioni broj $-1/2$, na peroksid, gdje je kiseoniku oksidacioni broj -1 i molekulski kiseonik s oksidacionim brojem nula. Kako ni peroksid nije bezopasan, u igru ulazi enzim gvožđa, katalaza, koji disproporcioniše peroksid na vodu i molekulski kiseonik (Lipard, 1994).

Cu/Zn superoksid-dismutaza, je enzim koji detoksikuje superoksidge, pretvarajući ih u kiseonik i vodonik peroksid prema reakciji: $2\text{HO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.

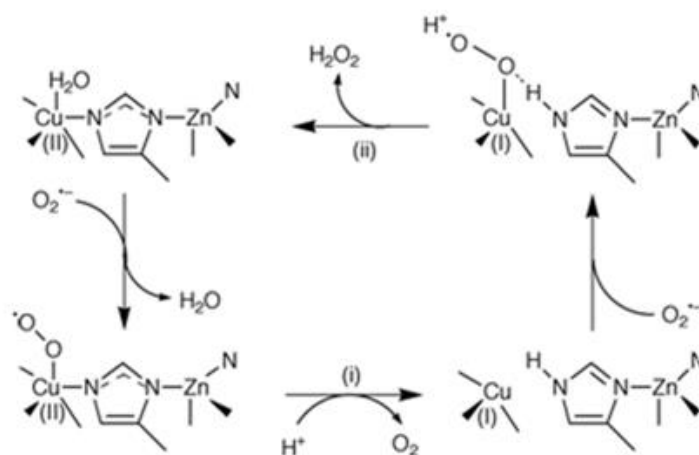
Tokom reakcije peroksid se oksiduje do kiseonika, a Cu(II) se redukuje do Cu(I), koji onda redukuje drugi superoksid do peroksida a sam se oksiduje do Cu(II):



SOD ubrzavaju disproporcionisanje superoksida 10000 puta, što je dovoljno da onemogući brzu reakciju superoksida sa biološkim tkivom. Na slici 8 je dat prikaz oksidovanog i redukovanog oblika Cu/Zn superoksid dismutaze.



Slika 8. Cu, Zn –Superoksid dismutaza A-oksidovani oblik, B- redukovani oblik (Rakhit i Chakrabartty, 2006).



Slika 9. Šema mehanizma djelovanja SOD (Pierre, 2000).

SOD je opremljena binuklearnim aktivnim mjestom koje sadrži bakar i cink. Svaka od dvije podjedinice sadrži isto aktivno mjesto u kojem su dvovalentni bakar i cink povezani preko

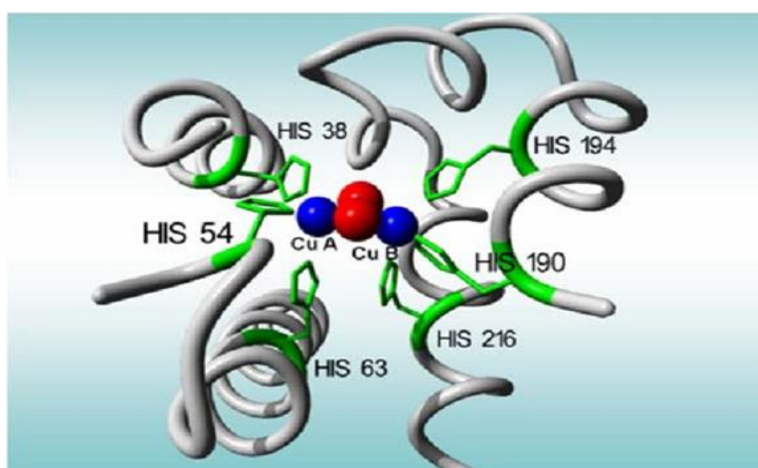
deprotonovanog histidina, odnosno njegove imidazolne jedinice iz proteinskog lanca. Koordinaciona sfera se u oba slučaja može opisati kao tetraedarska, iako je u slučaju bakra taj tetraedar snažno a u slučaju cinka samo lagano izobličen (Pierre, 2000).

Vezivanjem superoksida, koordinaciona sfera bakra postaje kvadratno piramidalna s koordinacionim brojem 5. Cu(II) oksiduje superoksid u molekul kiseonika, a bakar se redukuje do Cu(I), te se povlači iz koordinacione sfere zajedničkog, veznog imidazola gdje biva zamijenjen protonom. To omogućuje formiranje normalne, energetski relaksirane energetske sfere cinka, ali i Cu(I) (slika 9).

Organizam, u okviru imunološkog odgovora na infekciju, sam proizvodi reaktivne kiseonikove vrste namijenjene eliminisanju bakterija. Ovaj moćni imunološki alat može se pretvoriti u svoju suprotnost, i tada nastaju autoimune bolesti, poput reumatoidnog artritisa, uzrokovane prevelikom koncentracijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. U tim slučajevima SOD može da se prepisuje kao lijek (Younus, 2018).

Bakar kao centralni jon se može naći i u oskigenazama – enzimima koji su sposobni da aktiviraju inače vrlo inertni molekul kiseonika, odnosno da raskinu vezu između dva atoma kiseonika unutar tog molekula, te atome da ugradi u specifične supstrate. Jedna od takvih oskigenaza je i tirozinaza. Tirozinaza se nalazi i u biljkama i u životinjama. Aktivno mjesto u tirozinazi je s dva Cu(I) centra u deoksiobliku, i s dva Cu(II) centra i premošćujućom, bočno vezanim molekulom kiseonika u oksidovanom obliku (slika 10) (Agarwal i sar., 2016).

Tirozinaza katalizuje reakcije formiranja pigmenta melanina, karakteristične tamnosmeđe boje, koji se nalazi u koži, kosi, perima, ali uzrokuje i karakteristično tamnjenje voća koje ostane da stoji na vazduhu, tj. u prisustvu kiseonika (Lipard, 1994).



Slika 10. Cu centri u tirozinazi (Agarwal i sar., 2016).

Pored toga što je bakar esencijalan element, u većim količinama on može biti toksičan. U većim koncentracijama bakar je u stanju da zamijeni manje konkurentne metalne jone iz metaloproteina, kao što su cink i gvožđe (Zoroddu i sar., 2019). Wilsonova bolest je patološki poremećaj koji se javlja usled poremećaja koncentracije bakra. Javlja se usled većih koncentracija kada se on taloži, vezan za ceruloplazmin u jetri i mozgu (Grgurić-Šipka, 2014). Povećan unos bakara može dovesti do nekoliko toksičnih efekata kao i nedostatak bakra koji može imati teške ishode često povezane sa neurodegeneracijom. Pravilna ravnoteža između unosa bakra i njegove eliminacije se mora postići na ćelijskom nivou kao i na skali tkiva i organa (Jomova i sar., 2022).

Precizna regulacija bakra se postiže proteinima (metaloproteinima) koji su odgovorni za očuvanje bakra i njegovu isporuku proteinskim receptorima (Jomova i sar., 2022)

2.2.3.1. Bakar u biljkama

Biljkama su neophodni mineralni hranljivi elementi koji se uglavnom dobijaju iz zemlje kako bi održale normalan rast i razvoj i obezbjedile završetak životnih ciklusa (Yruela, 2009). Bakar je esencijalni redoks-aktivan prelazni metal koji je uključen u mnoge fiziološke procese u biljkama. Biološka funkcija bakra se zasniva na njegovoj funkciji strukturnog elementa u regulatornim proteinima i učestvovanju u fotosintetskom transportu elektrona. Takođe, ovaj element učestvuje i u procesima mitohondrijskog disanja, odgovorima na oksidativni stres, metabolizmu ćelijskog zida i hormonskoj signalizaciji (Yruela, 2005).

U vegetativnim biljnim tkivima koncentracija bakra varira u zavisnosti od biljnih vrsta ili ekotipova, razvojne faze i faktora životne sredine kao što su snabdjevanje azotom i hemijska svojstva zemljišta. Biljke koje se uzgajaju u uslovima visokog snabdjevanja azotom zahtjevaju znatno više bakra od biljnih vrsta koje su manje snabdjevene azotom. Zemljište je bitan faktor od kojeg zavisi koncentracija bakra u biljnoj vrsti i obično su kisela zemljišta ta koja raspoložu sa većom količinom ovog elementa. Koncentracija bakra u biljnim tkivima obično varira između 1 i 5 mg g⁻¹ suve težine, a prosječan sastav u listovima je 10 mg g⁻¹ suve težine. Ove koncentracije su podložne varijacijama među biljnim vrstama i sortama. Ovaj element je izuzetno toksičan s obzirom na svoja visoka redoks svojstva pa je preporučljivo da se njegova koncentracija u ćelijama održava u niskim nivoima (Yruela, 2009).

Korjeni biljaka apsorbiraju dvovalentni oblik bakra (Cu^{2+}) i mogu ga lako redukovati u monovalentni oblik. Bakar pomaže u formiranju lignina u ćelijskim zidovima, koji pružaju podršku za držanje biljaka uspravno. Posebno je za biljku važno formiranje održivog polena, sjemena i otpornost na stres (Havlin i sar., 2014).

Dvovalentni bakrov jon (Cu^{2+}) učestvuje u zaštiti biljke djelujući protiv gljivica i bakterija. Usled djelovanja jona bakra dolazi do denaturacije strukturnih i enzimskih proteina i promjene polupropustljivosti membrane. Joni bakra rastvoreni u slojevima vode na površini biljke mogu ući u ćelijsku protoplazmu gljive i bakterije. Joni bakra unutar ćelije ometaju brojne enzimske reakcije i blokiraju respiratorne aktivnosti. Bakar se koristi kao zaštitnik, što znači da joni bakra moraju biti prisutni na površini biljaka prije javljanja bolesti (La Torre i sar., 2018).

Međutim, u biljkama višak bakra negativno utiče na metaboličke aktivnosti korijena i apsorpciju hranljivih materija. Glavni simptomi viška bakra su poremećeni rast korijena i izdanaka (Miotto i sar, 2014), nedostatak hranljivih materija, hloroza i u teškim slučajevima nekroza tkiva i smrt biljaka. Postoje i biljke koje su tolerantne na teške metale uprkos rastu u veoma zagađenim okruženju (Xiong i Wang, 2005).

2.2.4. Cink (Zn)

Cink je metal sa atomskim brojem 30 i prosječne atomske mase 65,38. Cink je prirodni element koji se nalazi u stijenama na zemljinoj površini. Ukupan sadržaj Zn u tijelu ljudi je 2-4 g. Međutim, Zn se naziva elementom u tragovima jer njegova koncentracija u plazmi iznosi samo 12-16 mM (Rink i Gabriel, 2000).

Cink je drugi najzastupljeniji element u tragovima u ljudskom tijelu odmah posle gvožđa (Crichton, 2007). Kod ljudi je ovaj element prisutan u svim organima, tkivima, tečnostima i sekretima (Jomova i Valko, 2011). Visoka koncentracija Zn se može naći u vezikulama u mozgu, u kostima i mišićima (Vasák i Hasler, 2000). U serumu i plazmi količina cinka iznosi oko 14 mmol/L (0,1% od ukupnog cinka). Tu je cink pretežno vezan za albumin, dok je većina cinka u tijelu vezana za proteine cinka u citosolu. Slobodan cink je prisutan u pikomolarnim koncentracijama i mora biti strogo kontrolisan (Krezel i Maret, 2006).

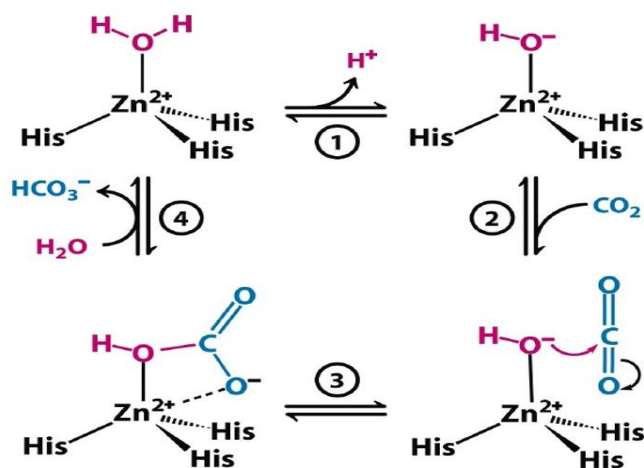
Oko 95% cinka je intracelularno. Najčešće oksidaciono stanje cinka je +2. Zn +2 je u rastvoru redoks stabilan pod fiziološkim uslovima a to je rezultat popunjene d elektronske ljuske (Tsonev i Lidon, 2012).

Jon Zn (II) ima elektronsku konfiguraciju $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3d^{10}$. Cink +2 jonu samim tim nedostaju nepopunjene d podljuske, što je neophodan kriterijum za prave prelazne metale. Zn(II) je bezbojan, za razliku od pravih prelaznih metala koji često formiraju jedinjenja i komplekse jarkih boja. Cink se jedini sa drugim elementima i gradi sulfide, sulfate, okside, karbonate, fosfate i silikate. Postoji oko 55 mineralizovanih oblika cinka. Većina od njih sadrži tetraedarske ili oktaedarske koordinacije poliedara sa apikalnim S ili O (Barak i Helmke, 1993). Cink se nalazi u velikom broju enzima (više od 300) i u velikom broju proteina. Sastavni je dio proteina koji vezuju nukleinske kiseline pa je uključen u procese transkripcije i translacije genetskih informacija. Poznate su tri vrste vezujućih mjesta kod Zn enzima i proteina: katalitičko, kokatalitičko i strukturno. Strukturna uloga se ispoljava kroz stabilizaciju tercijarnih struktura proteina (npr. kod Cu/Zn-SOD, citohrom *c* oksidaze) kao i kvaternarne strukture (npr. heksamerno skladištenje hormona insulina kod koga su monomeri povezani sa $[\text{Zn}(\text{His})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$). Enzimi mogu da budu mononuklearni i polinuklearni. Prvi otkriveni mononuklearni enzim Zn je bio karboanhidraza (CA) a ubrzo posle je otkriven i karboksipeptidaza A. Karboanhidraza je značajan jer katalizuje jedan od najprostijih procesa, nastajanje i razlaganje hidrogenkarbonata/ugljene kiseline (Grgurić-Šipka, 2014).

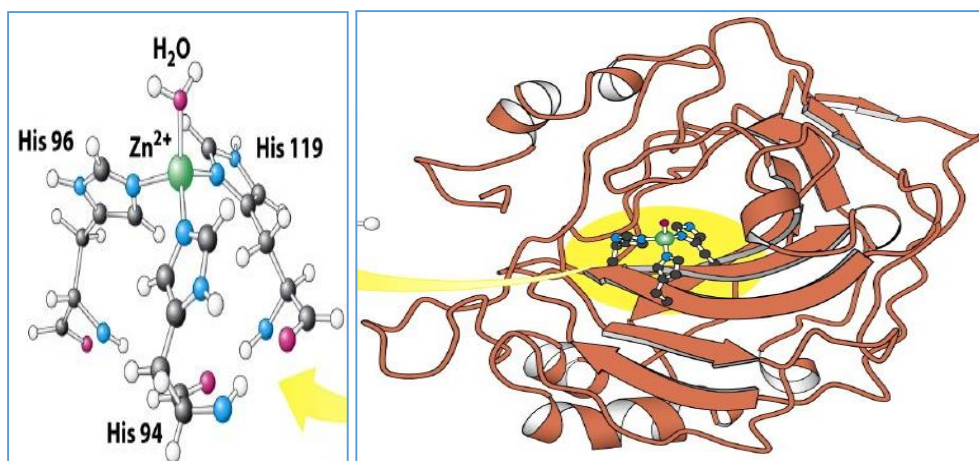
Sa hemijske strane gledano cink djeluje kao Luisova kiselina, elektrofilni agens, što ima za posledicu da je voda vezana za njega kiselija tj. lakše otpušta proton i tako Zn kompleks postaje izvor OH^- grupe čak i ispod neutralnog pH. Sa obzirom da se cink vezuje za neutralne ligande javlja se višak pozitivnog naelektrisanja pa se lakše i otpušta proton. OH^- jon vezan za cink vrši napad na CO_2 i prevodi ga u HCO_3^- anjon (slika 11) (Grgurić-Šipka, 2014).

U karboanhidrazi Zn^{2+} jon je koordinovan sa tri atoma azota iz histamina dok četvrto mjesto zauzima molekul vode (neaktivno stanje enzima) ili hidrosidna grupa (aktivno stanje enzima). Dakle Zn^{2+} jon u karboanhidrazi ima tetraedarsku koordinaciju (slika 12).

Karboanhidraza je izolovana iz mnogih biljaka i životinja i u većini slučajeva određena je sekvenca aminokiselina. U ljudskim eritrocitima je karboanhidraza najčešći protein posle hemoglobina. Ima važnu ulogu u fotosintezi, respiratornom lancu, (de) kalcifikaciji i pH kontroli (Lipard, 1994; Grgurić-Šipka, 2014).



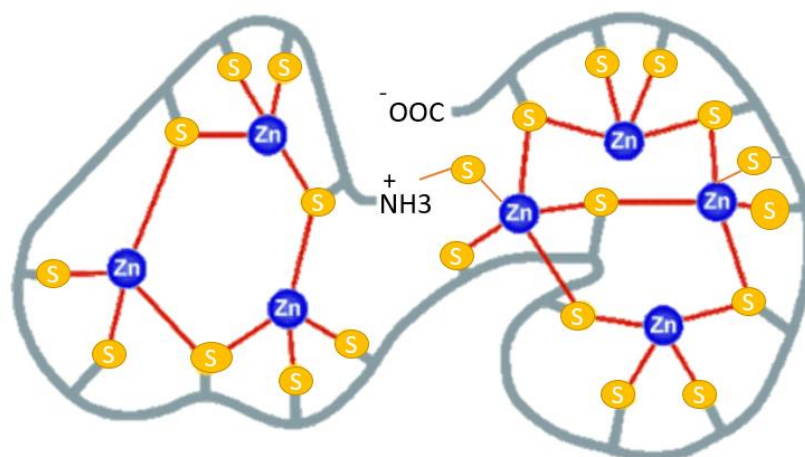
Slika 11. Mehanizam djelovanja karboanhidraze (Shekh i sar., 2012).



Slika 12. Položaj Zn u karboanhidrazi (Lipard, 1994).

Zn učestvuje u mnogim biohemijskim procesima i mehanizmima. Cink ima mnoge važne funkcije ljudskom tijelu, npr. u regulaciji djelovanja insulina i koncentracije glukoze u krvi, za zarastanje rana, zdravlje zubi, normalan odgovor ukusa i ima antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo. Mehanizmi koji su odgovorni za antioksidativno dejstvo cinka su vezivanje i zaštita-SH grupa proteina i enzima protiv napada reaktivnih kiseoničnih vrsta i takmičenje sa redoks metalima kao što su gvožđe i bakar (Jomova i sar., 2022). Redovan unos cinka može aktivirati stvaranje moćnih antioksidanata (npr. metalotionein). Jedan molekul metalotioneina može da veže čak sedam atoma cinka (Powell, 2000).

Tioneini takođe obavljaju i detoksikaciju organizma od štetnih jona kao što su Hg^{2+} i Cd^{2+} . Na slici 13 je prikazan primjer tioneina koji se sastoji od dva domena, jednog M3S3 klastera i drugog M4S5 klastera (Grgurić-Šipka, 2014).



Slika 13. Aktivno mjesto tioneina (Grgurić-Šipka, 2014).

Preporučeni dnevni unos cinka za odrasle iznosi oko 15 mg po danu. Dnevno potreban unos za muškarce je 11 miligrama i 8 miligrama za žene. Nizak sadržaj cinka može da izazove usporavanje rasta i razvoja ćelija kao i apoptozu u nekim ćelijama. Nedostatak cinka dovodi do različitih oboljenja jer usled nedostatka ovog metala dolazi do smanjenja otpornosti protiv infekcija. U teškim slučajevima nedostatak Zn može dovesti do hipogonadizma i patuljastosti (Zoroddu i sar., 2019). Obilan unos cinka je dobar jer izaziva sintezu proteina koji vezuje metal, metalotionein, i na taj način se može zaštititi organizam od toksičnog dejstva bakra (npr. kod Vilsonove bolesti) (Horn i sar., 2019, Zoroddu i sar., 2019).

2.2.4.1. Cink u biljkama

Cink je esencijalna hranljiva materija za biljke (Broadley i sar., 2007). Zn ulazi u sastav različitih enzima koji katalizuju mnoge metaboličke reakcije u biljkama (Rudani i sar., 2018). Biljni enzimi aktivirani cinkom su uključeni u metabolizam ugljenih hidrata, održavanje integriteta ćelijskih membrana, sintezu proteina, regulaciju auksina (hormona rasta) potom sintezu i formiranje polena (Hafeez i sar., 2013).

Unos cinka varira u zavisnosti od biljne vrste. Translokacija Zn do korjena ksilema se vrši preko simplasta i apoplasta (Tsonev i Lidon, 2012).

Koncentracije Zn u biljkama koje rastu na nezagađenim zemljištima variraju između 0,02-0,04 mg/g⁻¹ suve težine. Nezagađena zemljišta sadrže manje od 125 ppm cinka (Tsonev i Lidon, 2012).

U zemljištu Zn može formirati nerastvorljive taloge sa fosfatima, hidroksidima i karbonatima. Sa povećanjem pH vrijednosti smanjuje se rastvorljivost cinka u zemljištu. Pod visokim pH

vrijednostima, negativno naelektrisana čestica zemljišta (npr. karbonati) može jako adsorbovati pozitivno naelektrisani joni Zn (Stanton i sar., 2022).

Na količinu cinka i njegovu dostupnost u zemljištu mogu uticati različiti faktori:

- pH: povećana pH vrijednost smanjuje dostupnost cinka,
- Fosfor: visoki nivoi fosfora smanjuju dostupnost cinka,
- Organska materija: organska materija može povećati dostupnost cinka,
- Azot: nizak nivo azota može smanjiti potražnju biljke za cinkom,
- Vлага: previše vlažna zemljišta smanjuju sposobnost biljake za apsorpcijom cinka,
- Bakar: biljke preuzimaju cink i bakar putem istog mehanizma pa kada je jedan u višku, biljke ne upijaju dovoljno drugog elementa,
- Magnezijum: magnezijum pomaže u unosu cinka,
- Arsen: visoki nivoi arsena mogu inhibirati unos cinka.

Nedostatak cinka predstavlja ozbiljan problem i jedno je od glavnih ograničenja u svjetskoj proizvodnji hrane. Posljedica je niskog sadržaja cinka u kulturi koja se gaji na zemljištima sa nedostatkom cinka (Rudani i sar., 2018). Vizuelne simptome nedostatka Zn u biljkama je veoma lako prepoznati. Najčešći simptomi nedostatka Zn su usporavanje rasta, skraćene internodije i peteljke i mali deformisani listovi (slika 14) (Hafeez i sar., 2013).

Takođe može doći i do hloroze odnosno promjene boje listova iz normalne zelene boje hlorofila u blijedo zelene i žute, ili čak bijele (Rudani i sar., 2018).

Na listovima je uočljiv i razvoj crvenkasto-bronze ili bronzane nijanse (bronzovanje). Nedostatak Zn karakteriše nekroza vrha korjena (odumiranje) (Broadley i sar., 2007). Nedostatak cinka nije ujednačen i obično zavisi od stepena stresa (Hafeez i sar., 2013).



Slika 14. Izgled biljke pirinač usljed nedostatka cinka. Tipični simptomi uključuju visoku smrtnost biljaka, zakržljalost, bronzovanje lista i odlaganje cvjetanja (Broadley i sar., 2007).

2.3. KOPRIVA (*Urtica dioica* L.)

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je zeljasta višegodišnja korovska jednodomna ili dvodomna biljka (Ghimire i sar., 2022). Ime roda „*Urtica*“ potiče od latinskog glagola „*urere*“, što znači „gorjeti“, zbog svojih dlaka koje peckaju. Naziv vrste „*dioica*“ znači „dviije kuće“ jer biljka obično sadrži muško ili žensko cvjeće (Tabasum i sar., 2018; Upton, 2013).

Biljka potiče iz hladnijih krajeva sjeverne Evrope i Azije. Obično naraste od 2 do 4 m, i dobro uspeva na zemljištu koje je bogato azotom. Biljka cvjeta u periodu izeđu juna i septembra svake godine. Sastoji se od stabljike koja je uspravna i zelena, duguljastih sitno zbijenih listova koji su odozgo tamno zeleni a odozdo blijedi i cvijetova koji su bijeli do žućkasti. Biljka ima ili muške ili ženske cvjetove u odvojenim cvastima (Tabasum i sar., 2018).

Listovi i stabljika biljke su prekriveni peckavim trihomima (žljezdane dlačice), ponekad poznatim i kao spikule (Ghimire i sar., 2022). Žljezdane dlačice sadrže između ostalih jedinjenja i acetilholin, mravlju kiselinu, 5-hidroksitriptamin i histamin. Na listovima se nalaze dlačice. Ako se dodirne bez rukavica ova biljka izaziva iritaciju kože upravo zbog ovih dlačica. List koprive se prodaje u svježem, osušenom i zamrznutom obliku (Tabasum i sar., 2018).

U poslednje vrijeme *Urtica dioica* L. se svrstava i u klasu ljekovitih biljaka zbog svojih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi u mnogim zemljama širom svijeta (Ahmed i Parasuraman, 2016). Na slici 15 je prikazan spoljašnji izgled biljke.



Slika 15. Kopriva - cijela biljka (*Urtica dioica* L.) (Asgarpanah i Mohajerani, 2012).

2.3.1. List koprive

Listovi koprive su jednostavni, suprotni i grubo nazubljeni. Lamina je 1,5-20 cm dužine i 0,6-12 cm širine. Donja površina lista se sastoji od vena sa nekoliko peckavih dlačica koje su svijetlije boje dok je gornja površina uglavnom bez dlaka. Peteljke su duge 0,7-7 cm, užljebljene iznad i uz stranu peckavih dlačica. Listovi biljke su prekriveni bodljikavim trihomima. Svježi listovi su svijetlo zelene boje. Na poprečnom presjeku lista uočava se sloj gornjeg i donjeg epidermisa izgrađen od stomata. Stomati su prisutni više na donjoj strani. Listovi se sastoje od tečnosti koja je bogata acetilholinom, aminokiselinom, odnosno histaminom i serotoninom (Joshi i sar., 2014). Na slici 16 je prikazan izgled lista koprive.



Slika 16. List *Urtica dioica* L. (Asgarpanah i Mohajerani, 2012).

2.3.2. Cvijet koprive

Cvijetanje se dešava u sezoni proljeće-ljeto. Tokom avgusta biljka proizvodi plodove kremaste ili zlatne boje koji se koriste u liječenju (Joshi i sar., 2014). Na slici 17 je prikazan izgled cvijeta koprive.



Slika 17. Cvijet koprive (Asgarpanah i Mohajerani, 2012)

2.4. HEMIJSKI SASTAV KOPRIVE

Listovi koprive se sastoje od širokog spektra hemijskih sastojaka. Poznata fitohemijska jedinjenja u biljci *Urtica dioica* L. su flavonoidi, tanini, isparljiva jedinjenja i steroli (Asgarpanah i Mohajerani 2012). Za iritaciju (peckanje) kože kada dođe u kontakt sa dlačicama na listovima koprive odgovorna su sledeća jedinjenja: acetilholin, histamin, 5-hidroksitriptamin (serotonin) kao i male količine leukotriena (Devkota i sar., 2022).

Biljka je i bogat izvor nutritivnih komponenti, kao što su aminokiseline, vlakna, fenolna jedinjenja, vitamini i minerali (Devkota i sar., 2022).

Listovi koprive su bogati jedinjenjima kao što su polisaharidi, ugljeni hidrati, esencijalne aminokiseline, masne kiseline, vitamini poput sterola A, B i C, hlorofil, karotenoidi, minerali kao što su gvožđe, kalijum, kalcijum i magnezijum, tanini, izolektini. Nadzemni delovi su bogati i polifenolima, dok podzemni delovi sadrže isparljiva jedinjenja poput steril glikozida, sterola i oleanolne kiseline, izolektina i flavonoida (Ghimire i sar., 2022). Hemijski sastav koprive je prikazan u tabeli 3.

Tabela 3. Hemijski sastav koprive (*Urtica dioica* L.) (Upton, 2013; Joshi i sar., 2014; Tabasum i sar., 2018).

Hemijski sastav	Glavna jedinjenja
Flavonoidi	patuletin, kempferol, izorhamnetin, kvercetin i 3-rutinozidi i 3-glikozidi
Fenoli	derivati šikimične kiseline fenil propani, kafeinska kiselina, estri ove kiseline kao što su hlorogenska kiselina i kafeoilimalična kiselina (do 1,8%)
Esencijalno ulje	estri (14,7%), slobodni alkoholi (2%) i ketoni (38,5%) identifikovani kao 2-metil-2-hepten-2-on, acetofenon i etilketon, i tragovi azotnih supstanci, fenola i aldehida
Masne kiseline	6,8% palmitinske kiseline, 1,1% stearinske kiseline, 3,6% oleinske kiseline, 20,2% linolne kiseline i 12,4% linolenske kiseline
Karoteni	B-karoten, hidroksi-a-karoten (0,9%), lutoksantin (10,3%), lutein epoksid (13,1%) i violaksantin (14,7%)
Vitamini	askorbinska kiselina, vitamin B2-laktoflavin, pantotenska kiselina, vitamin-K1
Minerali	silikati (1-4% SiO ₂), kalcijum, gvožđe, magnezijum, fosfor, kalijum i natrijum

2.5. UPOTREBA KOPRIVE

Kopriva je biljka koja je od davnina koršćena u tradicionalnoj medicini u liječenju reumatizma i artritisa i kao tonik, adstringent i diuretik. Smatra se da su stari Egipćani znali za benefite ove biljke i koristili njen infuz za olakšanje problema sa artritismom i lumbagom (Tabasum i sar., 2018).

Ova biljka se tradicionalno i danas koristi u Maroku, Turskoj, Brazilu, Jordanu i veoma često u sjevernom Iranu. Kopriva se koristi za liječenje bolova u stomaku u turskoj narodnoj medicini. Balkanske zemlje koriste infuz koprive za liječenje dijareje kao i unutrašnjeg i spoljašnjeg krvarenja. Infuz i dekoti koprive se često koriste za liječenje anemije. Primjena koprive povećava nivo gvožđa, kao i nivo folata i vitamina B12 u krvi (Tabasum i sar., 2018). Pored medicinske, važna je i dijetetska primjena koprive u ishrani kao veoma važne nutritivne komponente. Listovi i stabljike se koriste za salatu i kao povrće ili kao ekstrakt poznat u narodu kao „čaj” (Kirtikar i Basu, 2008).

Kopriva je specifična po tome jer je svaki njen dio upotrebljiv i ljekovit (korjen, stablo, list i cvijet). Može se i kuvati sa drugim biljkama, kao što su kukuruz, proso, ili pšenično brašno. Koristi se i kao nutritivni tonik i za mnoge druge preparate (supe i tečne ekstrakte). Inhalacijom uz pomoć ove biljke se ublažava astma i slične bronhijalne tegobe (Kirtikar i Basu, 2008). Kopriva se upotrebljava i kao dodatak u ishrani životinja odnosno kao aditiv za stočnu hranu (Palka i sar., 2022).

U literaturi postoje podaci o uticaju dodatka lista koprive i ekstrakta lista koprive na hemijski profil hljeba. Istraživanja Đurović i saradnika, 2020. su pokazala poboljšanje nutritivnih svojstava proizvoda (hljeba) pri dodatku listova i ekstrakta koprive, pri čemu se dobija hljeb sa dodatkom vrijednošću. Hemijska analiza je pokazala da je ekstrakt lista koprive odlična zamjena za same listove, jer ekstrakt obezbeđuje dovoljno biološki aktivnih jedinjenja u hljebu, koji su potrebni ljudskom organizmu (Đurović i sar. 2020).

Evropska komisija - Direktorat za zdravlje i bezbjednost hrane je svrstala koprivu u biljke koje ispunjavaju sve kriterijume potrebne za korišćenje u ljudskoj ishrani (Uredba (EC) No178/2002). Ovo mišljenje je podržano od strane Evropske agencije za bezbjednost hrane (EFSA). Zaključeno je da kopriva nema ni trenutno ni produženo štetno dejstvo na zdravlje ljudi i životinja kao ni negativan uticaj na životnu sredinu (European Commission, 2017).

2.6. FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST KOPRIVE

Ljekovite biljke su značajne upravo zbog svojih biološki aktivnih komponenti koje biljkama daju antioksidativna svojstva. Antioksidansi se pojavljuju kao profilaktički i terapijski agensi. Oni uklanjaju slobodne radikale ili reaktivne kiseonične vrste i sprečavaju njihovo štetno dejstvo (Gozum i sar., 2007; Tabasum i sar., 2018).

Slobodni radikali izazivaju poremećaje kao što su rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, autoimune bolesti i neurodegenerativni poremećaji. Kopriva je među najzastupljenijim biljnim komplementarnim i alternativnim ljekovima koje koriste pacijenti koji su oboljeli od kancera (Gozum i sar., 2007; Tabasum i sar., 2018).

Urtica dioica se može koristiti za liječenje benigne hiperplazije prostate (BHP). Efekat korijena koprive na BPH izazvan testosteronom proučavan je u *in-vitro* studijama za procjenu inhibitorynog potencijala 5 α -reduktaze. Istraživanja su pokazala da je kopriva efikasna za ublažavanje urinarnih tegoba (Nahata i Dixit, 2012; Tabasum i sar., 2018).

Preparati od koprive su sposobni da inhibiraju agregaciju trombocita. Sirovi vodeni ekstrakt koprive inhibira agregaciju izazvanu trombinom u zavisnosti od doze. Lipofilniji rastvarači ekstrahuju više bioaktivnih komponenti iz koprive i pokazuju jači efekat. Etil-acetatni ekstrakt koprive pokazuje najveći efekat protiv agregacije. Istraživanja su pokazala da bioaktivne komponente iz koprive imaju značajan efekat u sprečavanju hipertenzije, što se može povezati sa visokim sadržajem kalijuma u koprivi. Jedna od primarnih upotreba biljke koprive je kao nutritivni tonik za liječenje anemije. Rađene su studije za određivanje akutne i hronične toksičnosti biljke koprive. Intravenske doze veće od 500 mg/kg izazivaju prolaznu hipotenziju i srčane aritmije (Tabasum i sar., 2018).

2.7. METODE ANALIZE HEMIJSKOG SASTAVA LISTA I EKSTRAKATA KOPRIVE

Za određivanje metala u biljkama se koriste različite instrumentalne tehnike. Najčešće se sadržaj metala određuje pomoću atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), masene spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) i uz pomoć optičke emisijske spektrofotometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES).

2.7.1. Optička emisiona spektrofotometrija sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES)

2.7.1.1. Osnovne karakteristike

ICP-OES je analitička tehnika koja se pokazala kao jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje elemenata u tragovima u različitim tipovima uzoraka (Hou i Jones, 2000).

Pomoću ove tehnike se može istovremeno odrediti čak i do 70 elemenata, što je čini jako popularnom (Hou i Jones, 2000).

Ovu tehniku karakteriše veća temperatura atomizacije i inertnija sredina u odnosu na druge analitičke tehnike. Tehnika se zasniva na spontanoj emisiji fotona iz pobuđenih atoma i jona. Čvrsti uzorci se prvo na odgovarajući način pripreme, prevode u tečno stanje a potom se vrši analiza. Uzorci tečnosti i gasa ne moraju biti prethodno pripremljeni već se mogu direktno ubrizgati u instrument. Rastvoreni uzorci se pretvaraju u aerosol i usmjeravaju u centralni kanal plazme. Temperatura se održava na približno 10 000 K, tako da aerosol brzo ispari. Analiti se oslobađaju kao slobodni atomi u gasovitom stanju. Dalje se vrši pobuđivanje unutar plazme, atomi dobijaju dodatnu energiju i prelaze u viša - pobuđena stanja. Pobuđeni atomi i joni emituju svoje karakteristično zračenje koje prikuplja uređaj koji sortira zračenje po talasnoj dužini. Zračenje se detektuje i pretvara u elektronske signale. Ti signali se potom pretvaraju u informacije o koncentraciji (Boss i Fredeen, 1997; Hou i Jones, 2000).

Neke od najvažnijih prednosti ICP-a su:

1. visoka temperatura (6000-8000 K);
2. visoka elektronska gustina (10^{14} - 10^{16} cm⁻³);
3. značajan stepen atomizacije i pobuđivanja aerosola ispitivanog rastvora, koji se uvodi strujom argona kroz centralnu kvarcnu cijev;
4. mogućnost istovremenog određivanja više elemenata (preko 70);
5. niska pozadinska emisija i relativno niske hemijske smetnje;
6. visoka stabilnost koja dovodi do odlične tačnosti i preciznosti;
7. odlični limit detekcije za većinu elemenata ($0,1$ – 300 mgL⁻¹);
8. široki linearni dinamički opseg (četiri do šest redova veličine);
9. primjenljivost na vatrostatne elemente i
10. isplative analize (Thompson i Barnes, 1992; Hou i Jones, 2000).

Obično se kod ove instrumentalne tehnike argon koristi kao gas plazme. Dodavanje drugih gasova (H₂, N₂, O₂ i dr.) na sastav pomoćnog gasa ili na gasa za raspršivanje može poboljšati karakteristike plazme (toplotnu provodljivost, gustinu broja elektrona i temperaturu plazme). Ove modifikacije olakšavaju atomizaciju, jonizaciju i pobuđivanje elemenata (Hou i Jones, 2000; Chirinos i sar, 2002; Fisher i Hill, 2007).

Broj elemenata koji se mogu odrediti uz pomoć ICP-OES je nekad i više od 70 od ukupno 92 elementa koja se javljaju u prirodi (tabela 4) (Mermet i Poussel, 1995; Hou i Jones, 2000).

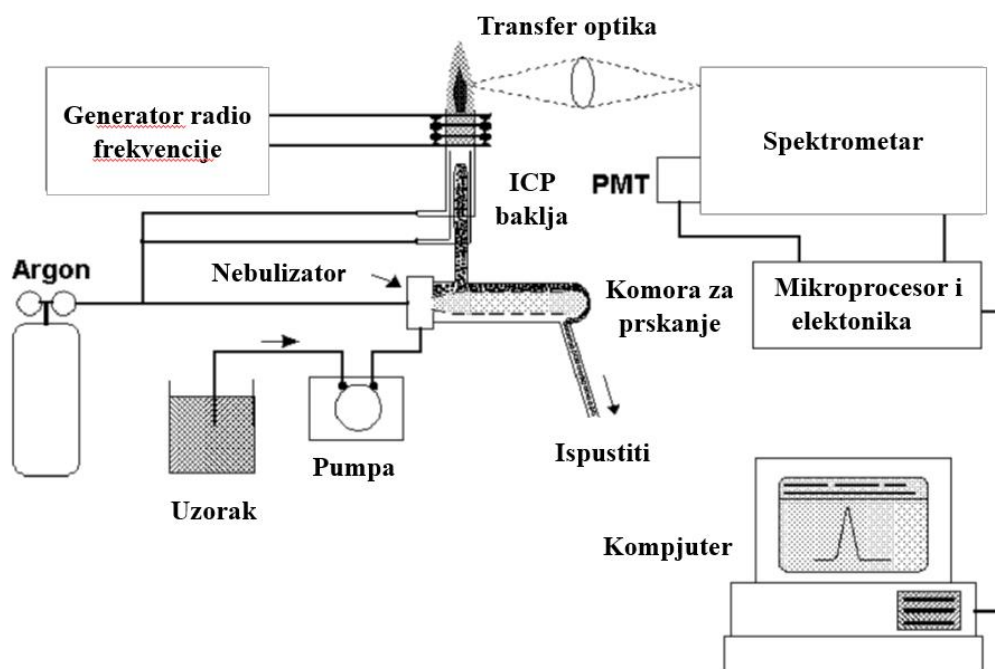
Tabela 4. Elementi koji se mogu odrediti pomoću ICP-OES metode (Mermet i Poussel, 1995; Hou i Jones, 2000)

Alkalni i zemnoalkalni metali	Rijetke zemlje	Prelazni metali	Drugi
Li, Na, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr, Ba	Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Th, U	Sc, V, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Nb, Zr, Mo, Ru, Th, Pd, Ag, Cd, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg	B, C, N, Al, Si, P, S, Cl, Ga, Ge, As, Se, Br, In, Sn, Sb, Te, I, Tl, Pb, Bi

Iz tabele se može uočiti da se skoro svi prirodni elementi, izuzev vodonika, kiseonika, fluora i inertnih gasova mogu odrediti uz pomoć ICP-OES analitičke tehnike. Ovom metodom se ne mogu odrediti sledeći elementi:

1. Elementi koji se javljaju kao zagađivači u tragovima u argonu (C iz CO₂),
2. Elementi koji zahtjevaju visoku energiju pobuđivanja (halogeni),
3. Kratkotrajni radioaktivni elementi (Mermet i Poussel, 1995; Hou i Jones, 2000).

Šematski prikaz tipičnog ICP-OES instrumenta je prikazan na slici 18 (Boss i Fredeen, 1997).



Slika 18. Glavne komponente i raspored tipičnog ICP-OES instrumenta (Boss i Fredeen, 1997).

U optičkoj emisionoj spektrofotometriji sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) uzorak se obično transportuje u instrument kao mlaz tečnog uzorka. Nebulizacijom se tečnost pretvara u aerosol. Ovaj proces se odvija u unutrašnjosti instrumenta. Aerosol se zatim transportuje u plazmu gdje se rastvara i isparava (Boss i Fredeen, 1997).

2.7.2. UV-VIS spektrofotometrija

U analitičkoj hemiji se apsorpcija svjetlosti koristi za kvantitativno određivanje i karakterizaciju supstanci. Spektrofotometrija je analitička tehnika kojom se mjeri interakcija molekula sa elektromagnetnim zračenjem (Schmid, 2001).

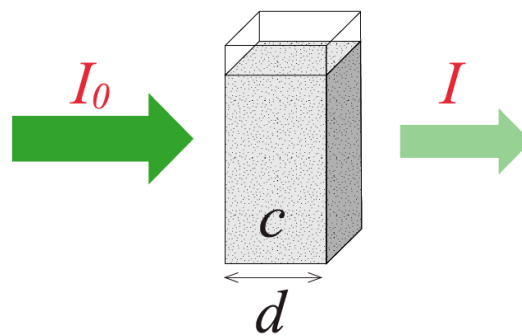
U UV-VIS spektrofotometriji je uzorak osvijetljen elektromagnetnim zracima talasnih dužina iz vidljivog i ultravioletnog dijela spektra. U zavisnosti od supstance svjetlost će se djelimično apsorbovati. Preostala svjetlost se snima kao funkcija talasne dužine odgovarajućim detektorom. Na ovaj način se formira UV-VIS spektar uzorka. Svaka supstanca apsorbuje svjetlost na drugačiji način i ima jedinstven UV-VIS spektar. Samim tim, spektar se koristi za identifikaciju ili kvantifikaciju supstance Uz pomoć UV-VIS spektrofotometrije se određuje širok spektar uzoraka (organski molekuli, neorganski joni, kompleksi u rastvorima, čvrsti materijali itd.) (Cosimo i Haller, 2015).

UV oblast zračenja odgovara opsegu talasnih dužina od 100 nm do 380 nm. Dijeli se na blisko i daleko UV područje. Oblast od 200 nm do 380 nm se naziva blisko ultraljubičasto područje a ispod 200 nm se nalazi daleko ultraljubičasto područje. Vidljivo zračenje odgovara opsegu talasnih dužina od 380 nm do 780 nm. Talasna dužina u UV i VIS oblasti se izražava u nanometrima ili u angstromima. Apsorpcijom elektromagnetnog zračenja iz UV-VIS oblasti spektra dolazi do elektronskih prelaza koji su u molekulima i njihovim jonima, kombinovani sa nizom vibracionih i rotacionih prelaza. Svaki prelaz prati pojava jedne apsorpcione trake u spektru, a sistem traka sačinjava UV-VIS apsorpcioni spektar nekog jedinjenja (Lakshmi, 2018).

2.7.2.1. Lambert-Berov zakon

Spektrofotometrijski se mjeri intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz rastvor uzorka u kiveti. Koliko će rastvor apsorbovati svjetlosti zavisi od koncentracije uzorka. I dužina kivete utiče na apsorpciju pa će duža kiveta dovesti do veće apsorpcije svjetlosti (Cosimo i Haller, 2015).

Dakle, apsorpcija svjetlosti (A) se može izraziti kao funkcija koncentracije i dužine kivete (slika 19) (Cosimo i Haller, 2015).



Slika 19. Slabljenje intenziteta svjetlosti je proporcionalno koncentraciji rastvora uzorka kao i dužini kivete (Cosimo i Haller, 2015)

Apsorbancija A je jednaka proizvodu koeficijenta apsorpcije ϵ , koncentracije c i dužine putanje d , (jednačina 1):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Ovaj odnos se naziva Lambert- Berov zakon, gdje je c - koncentracija uzorka (mol/L ili g/mL), d - dužina puta, kivete (cm), ϵ - koeficijent apsorpcije (epsilon) (L/(mol·cm) ili mL/(g·cm) (Cosimo i Haller, 2015).

Pomoću Lambert-Berovog zakona se može odrediti koncentracija uzorka iz izmjerene vrijednosti apsorpcije.

Ako je poznato ϵ i d , koncentracija se izračunava iz jednačine 2:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (2)$$



Slika 20. Šema UV-VIS spektrofotometra (Cosimo i Haller, 2015).

Na slici 20 je prikazana je šema UV-VIS spektrofotometra. Princip rada spektrofotometra se zasniva na određivanju apsorbancije slijepe probe a potom i apsorbancije uzorka. Prilikom prolaska svjetlosti kroz kivetu, dio svjetlosti se apsorbuje od strane molekula uzorka u rastvoru. Propušteno svjetlosno zračenje se mjeri detektorom. Detektor mjeri intezitet propuštene svjetlosti (I) i njegova vrijednost je niža od inteziteta upadne svjetlosti, I_0 .

Odnos ova dva intenziteta I/I_0 se definiše kao transmisija (T) (jednačina 3):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

Transmisija se izražava u procentima (%). Apsoorbancija se može izraziti preko transmisije, (jednačina 4):

$$A = -\log(T) \quad (4)$$

Apsoorbancija A je bezdimenzionalna vrijednost (Cosimo i Haller, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada je rađen u Laboratoriji za opštu u neorgansku hemiju na MTF-u i u Laboratoriji Centra za ekotoksikološka ispitivanja – Podgorica.

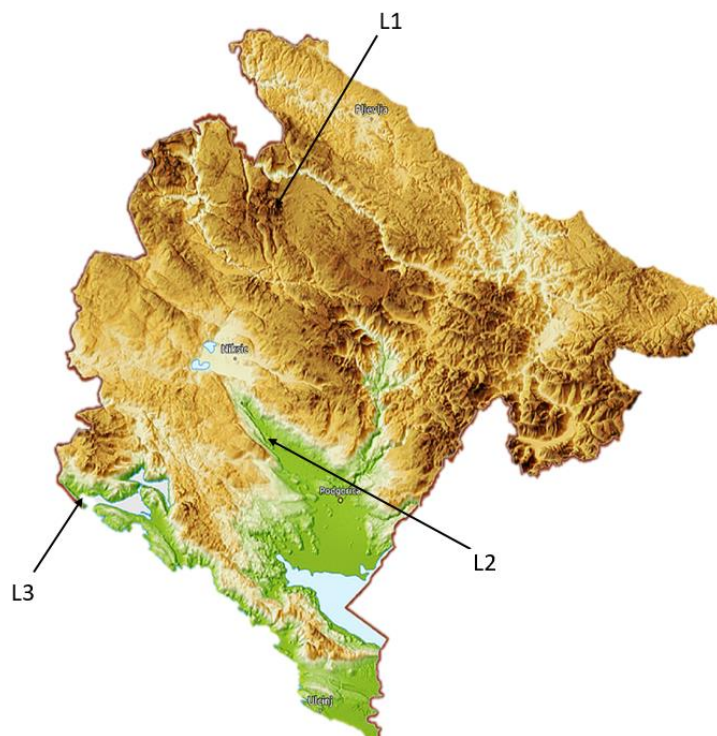
3.1. MATERIJAL I METODE

3.1.1. Materijal

Uzorci koprive (*Urtica dioica* L.) koji su korišćeni u ovom radu su sakupljeni sa različitih lokaliteta na području Crne Gore. Uzorkovanje je vršeno u različitim sezonama rasta biljke (proljeće/jesen). Biljka je uzorkovana sa tri različita lokaliteta Crne Gore:

1. L1- sjeverni region (selo Virak - opština Žabljak)
2. L2- centralni region (naselje Kujava - opština Danilovgrad)
3. L3- južni region (naselje Igalo - opština Herceg Novi).

Lokacije su bile udaljene od velikih saobraćajnica i industrijskih objekata. Na slici 21 je prikazana mapa Crne Gore sa označenim lokacijama na kojima je vršeno uzorkovanje.



Slika 21. Mapa Crne Gore sa označenim lokalitetima uzorkovanja (autor: Bošković N.)

Za sezonu jesen uzorkovanje je izvršeno tokom novembra 2022. godine. Dakle uzorkovanje je izvršeno na kraju vegetacionog perioda biljke. Za proljećnu sezonu uzorkovanje je izvršeno tokom juna 2023. godine. Faza cvijetanja biljke je od maja do septembra i obično se u tom periodu vrši uzorkovanje (Stešević, 2013). Dio biljke koji je uzorkovan za ispitivanja u ovom master radu je list. Listovi su sortirani i osušeni u zatvorenoj prostoriji. U tabeli 5 je dat prikaz geografskih karakteristika lokaliteta.

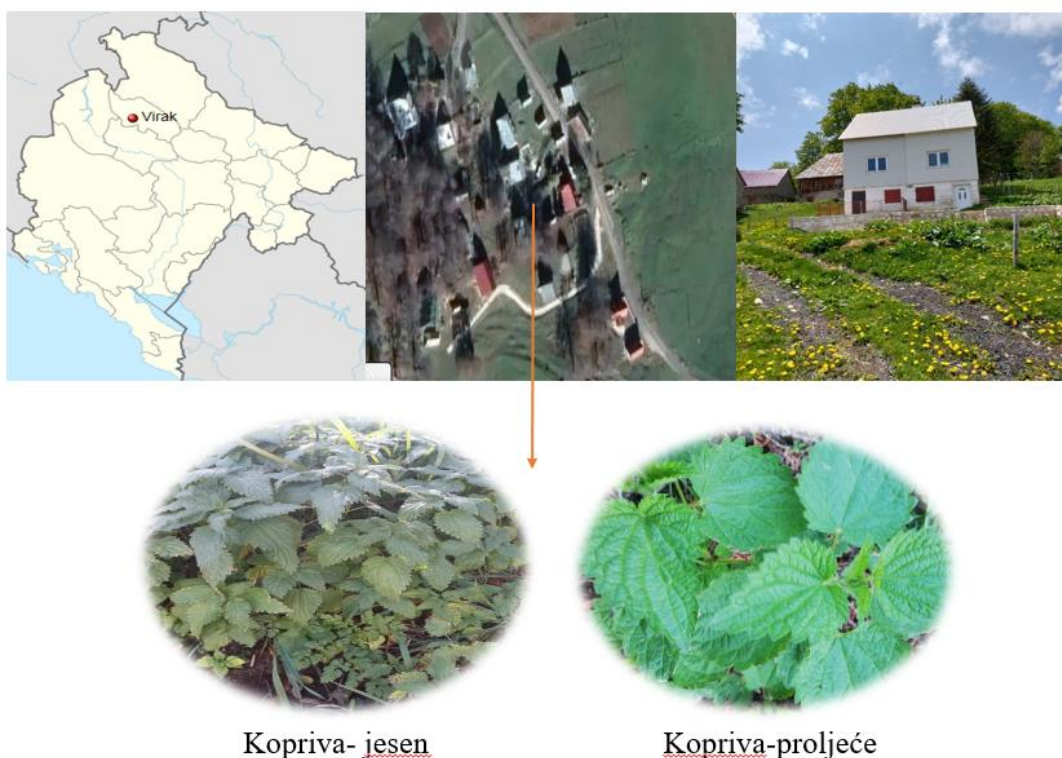
Tabela 5. Geografska dužina, širina i nadmorska visina opština u kojima je kopriva uzorkovana

Lokacije	Geografska širina	Geografska dužina	Nadmorska visina
L1 (Žabljak)	43.1555° N	19.1226° E	1456 m
L2 (Danilovgrad)	42.5538° N	19.1077° E	48 m
L3 (Herceg Novi)	42.4572° N	18.5315° E	0 m

Ova biljka uspeva u različitim krajevima Crne Gore uprkos različitim klimatskim karakteristikama. Na jugu je klima mediteranska sa karakterističnim suvim i toplim ljetima i blagim zimama. Dok su u planinskim oblastima na sjeveru ljeta relativno hladna i vlažna, a zime duge i oštre, sa čestim mrazovima i niskim temperaturama, koje naglo opadaju sa visinom.

3.1.1.1. Karakteristike lokaliteta L1

Područje opštine Žabljak nalazi se na sjeverozapadu Crne Gore i zahvata površinu od 445 km². Oko 30% teritorije Opštine se nalazi na nadmorskoj visini iznad 1 500 m. Geografski ovo područje pripada jugoistočnim dinaridima. Durmitor je dominantni planinski masiv ove oblasti. Selo Virak je udaljeno 5 kilometara od Žabljaka na južnoj strani Durmitora, u čijoj blizini se nalaze vrhovi Savin kuk, Međed i Šljeme. Nalazi se na nadmorskoj visini 1 470 m. Klima se kreće od subplaninske do tipične alpske. Zime su duge i hladne, ljeta relativno kratka i svježija. Jeseni su toplije od proljeća. Srednja godišnja relativna vlažnost je 75-80%. Godišnje je oko 120 dana pod snijegom. Na ovom prostoru raste više od 1 500 biljnih vrsta i podvrsta (među njima 500 vrsta ljekovitog bilja) (Spasić, 2016; Jovanović i sar., 2019). Na slici 22 je prikazan lokalitet uzorkovanja L1.



Slika 22. Selo Virak na mapi Crne Gore, tačan satelitski prikaz lokaliteta i uzorkovana kopriva (autor: Bošković N.)

3.1.1.2. Karakteristike lokaliteta L2

Danilovgrad je grad koji se nalazi u središnjem dijelu Crne Gore (u centralnom dijelu Bjelopavličke ravnice) i zahvata površinu od 501 km². Gradsko naselje je u ravnici, uglavnom na 50–60 m nadmorske visine. Rijeka Zeta je glavni vodotok šireg područja. Kujava je naselje u opštini Danilovgrad, gdje je uzorkovana kopriva. Klima je mediteransko- kontinentalna sa dominantnim uticajem mediteranske klime, što znači da to područje karakterišu duga, vrela i suva ljeta, a zime su relativno blage i kišovite. Procjenjuje se da suma padavina iznosi 2 300-2 500 mm prosječno godišnje. Opština Danilovgrad orijentaciono ima preko 2 000 biljnih vrsta (Burić i sar, 2019).

Na slici 23 je prikazan lokalitet uzorkovanja L2.



Kopriva

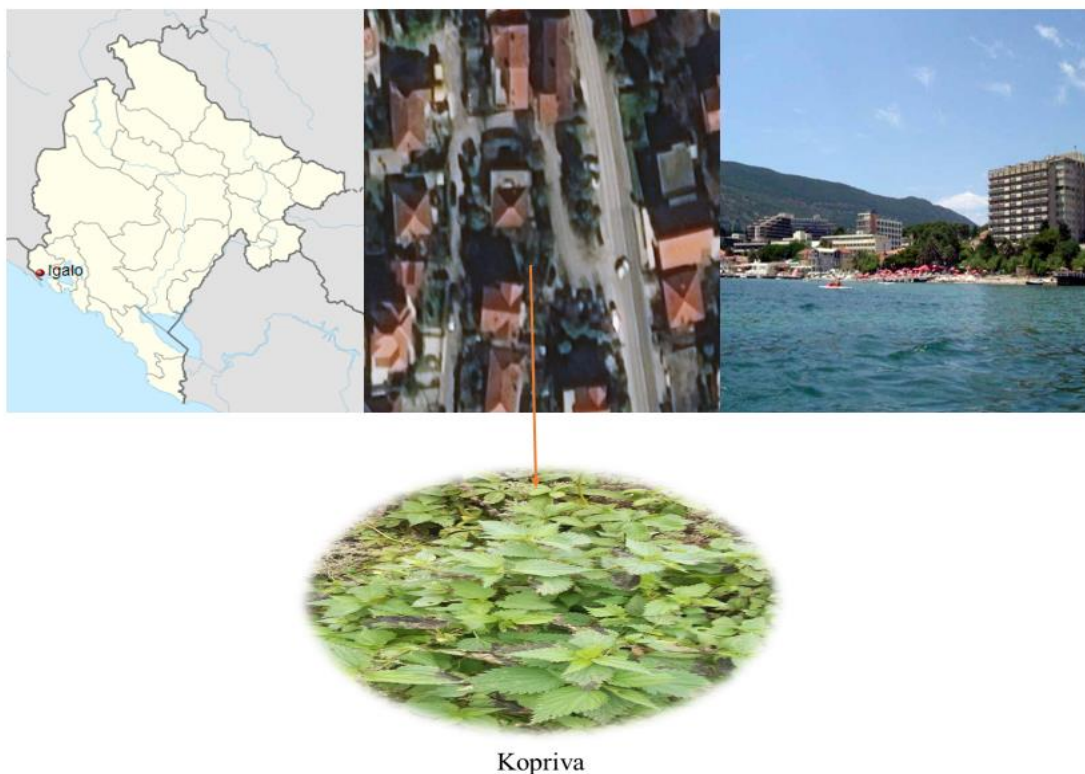
Slika 23. Naselje Kujava na mapi Crne Gore, tačan satelitski prikaz lokaliteta i uzorkovana kopriva (autor: Bošković N.)

3.1.1.3. Karakteristike lokaliteta L3

Opština Herceg Novi nalazi se na krajnjem jugozapadnom dijelu Crnogorskog primorja. Prostire se na površini od 235 km² i obuhvata veliki broj naselja. Igalo predstavlja prigradsko naselje urbanog tipa (veoma naseljeno) (Lukić i Lukić, 2020).

Grad ima specifičnu mikroklimu koja je uslovljena južnom ekspozicijom, blizinom mora, krečnjačkom podlogom i planinskim zaleđem koje sprječava prodor hladnih vazdušnih masa. Klima je mediteranska: suva i topla ljeta, a blage zime. Godišnje je u prosjeku oko 200 dana sunčano. Zahvaljujući mnogobrojnim prirodnim ljepotama Herceg Novi je stekao naziv grada sunca, cvijeća i zelenila. U gradu i okruženju raste nekoliko stotina raznih biljnih vrsta sa svih meridijana svijeta. Takođe, uspjeva i veliki broj ljekovitih biljaka koje se koriste kao čajevi, kao npr. lavanda, a između ostalog u uslovima ovako blage klime uspjeva i kopriva (Lukić i Lukić, 2020).

Na slici 24 je prikazan lokalitet uzorkovanja L3.



Slika 24. Naselje Igalo na mapi Crne Gore, tačan satelitski prikaz lokaliteta i uzorkovana kopriva (autor: Bošković N.)

3.1.2. Metode

3.1.2.1. Određivanje metala u listu i ekstraktima koprive (Ca, Mg, Cu i Zn) ICP-OES tehnikom

Reagensi

HNO₃

H₂O₂

Postupak

Za određivanje metala (Ca, Mg, Cu i Zn) u suvim uzorcima lista koprive i vodenim ekstraktima lista koprive korišćena je ICP-OES instrumentalna tehnika (ICP-OES Thermo iCAP 7400). Nakon što su uzorci lista koprive ubrani, sortirani i osušeni vršena je priprema uzorka za elementarnu analizu. Osušeni uzorci su homogenizovani mljevenjem u laboratorijskom mlinu predviđenom za mljevenje uzoraka hrane. Za digestiju uzoraka i referentnog materijala korišćena je mikrotalasna pećnica (Berghof, SV Xpert).

Prvo je izmjereno tačno 200-300 mg uzorka, a potom je vršena digestija u smješi od 5 mL azotne kiseline i 2 mL vodonik peroksida. Nakon digestije, uzorci su kvantitativno prenijeti u odmjerne sudove koji su dejonizovanom vodom dopunjeni do crte, a sadržaj elemenata je analiziran pomoću optičkog emisionog spektrometra sa indukovano spregnutom plazmom.

Za dobijanje ekstrakata korišćena je vrela dejonizovana voda. Ekstrakti biljke su pripremljeni tako što je 1 g homogenizovanog uzorka preliven sa 20 mL vrele dejonizovane vode. Uzorak (biljka) je stajao u vreloj vodi 10 minuta a potom je filtriran. Za filtraciju je korišćen filter papir srednje gustine. Mjerenja makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima ekstrakta lista koprive su izvršena na pomenutim optičkom emisionom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom.

3.1.2.2. Određivanje hlorofila u listu koprive UV-VIS spektrofotometrijom

Reagensi

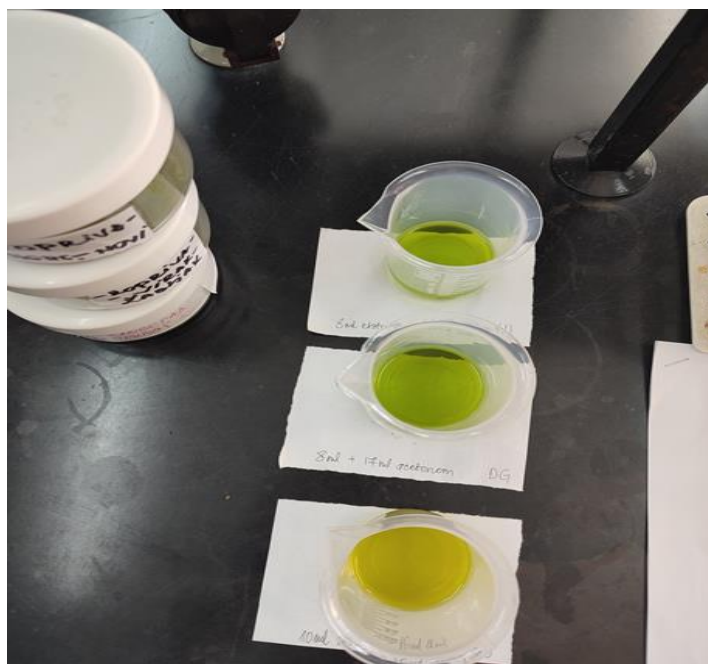
C₃H₆O (Aceton)

CaCO₃

Postupak

Sprašeni biljni materijal je odmjeren na analitičkoj vagi. Mjereno je tačno po 0,5 g uzorka za svaki lokalitet. Nakon mjerenja je vršena homogenizacija sa acetonom. Postepeno je dodavano 10 mL acetona. Da bi se izbjeglo zakiseljavanje rastvora dodata je i mala količina kalcijum-karbonata, CaCO₃ (na vrh kašičice). Homogenizacija je trajala oko 3 minuta (materijal je sprашen pa se lako homogenizuje). Nakon toga je vršena filtracija. Dobijeni filtrat predstavlja ekstrakt pigmenta, koji je prenijet u odmjerni sud od 25 mL. Dopuni se acetonom do crte i dobro promućka (Smiljić i sar, 2018).

Na slici 25 su prikazani dobijeni ekstrakti lista koprive sa različitih područja Crne Gore (L1-L3).



Slika 25. Dobijeni ekstrakti lista koprive redom Herceg Novi, Danilovgrad, Žabljak (autor: Bošković N.)

Apsorbancija ekstrakta se očitava na spektrofotometru na talasnim dužinama 662 i 644 nm a potom vrši izračunavanje po obrascu Holma (1954) i Wetsteina (1957):

$$\text{Hlorofil } a = 9,784 A_{662} - 0,99 A_{644} ;$$

$$\text{Hlorofil } b = 21,426A_{644} - 4,65A_{662} ;$$

$$\text{Hlorofil } (a+b) = 5,134A_{662} + 20,436A_{644} ;$$

gdje je: A - apsorbancija pri odgovarajućoj talasnoj dužini; vrijednosti 9,784; 0,990; 21,426; 4,650; 5,134; 20,436 predstavljaju molarne apsorpcione koeficijente po Holmu (1954) i Wetstein-u (1957). Na ovaj način se izračunava koncentracija pigmenta u mg/L. Potrebno je izračunati i sadržaj mg hlorofila/g suvog biljnog materijala.

Proračun se vrši po obrascu 5:

$$c = \frac{c_1 \cdot V \cdot R}{G \cdot 1000} \text{ [mg hlorofila/g suvog biljnog materijala]} \quad (5)$$

gdje je:

c- sadržaj pigmenta mg/g svježeg ili suvog biljnog materijala;

***c*₁**- koncentracija pigmenta izračunata po obrascu Holma i Wetsteina;

V- prvobitna zapremina ekstrakta (mL)

R- razblaženje ako ga ima

G- odmjerena svježa (suva) masa biljnog materijala (g)

1000- faktor za pretvaranje (mg/g)

Dobijeni ekstrakti se sipaju u staklenu kivetu i redom očitavaju apsorbancije na spektrofotometru. Za ovo očitavanje potrebno je podesiti baznu liniju. Prvo se očitava apsorbancija za slijepu probu (acetone) a potom redom za uzorke (Smiljić i sar, 2018). Na slici 26 je prikazan UV-VIS spektrofotometar na kojem je vršena analiza.



Slika 26. UV-VIS spektrofotometar (autor: Bošković N.)

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. CILJ RADA

Cilj ovog rada je bio da se odredi koncentracija biometala (Ca, Mg, Cu i Zn) u listu koprive sa različitih lokaliteta Crne Gore i iz različitih sezona rasta (proljeće/jesen). Pored toga cilj je bio da se odredi koncentracija biometala (Ca, Mg, Cu i Zn) u ekstraktu lista koprive koji je dobijen pomoću vrele dejonizovane vode na način sličan dobijanju napitka poznatog u narodu kao "čaj". Takođe je bilo potrebno odrediti sadržaj hlorofila *a*, *b* i *a+b* u listovima koprive sa pomenutih ispitivanih lokaliteta i sezona rasta.

Specifični ciljevi ovog rada su bili:

1. da se utvrdi da li uzorci koprive sa različitih geografskih područja i iz različitih vegetacionih perioda (sezona) sadrže istu ili različitu količinu navedenih biometala;
2. da se odredi koji je procenat metala ekstrahovan iz biljke;
3. da se odredi procenat zadovoljavanja dnevnih potreba za ispitivanim biometalima pri konzumiranju lista koprive (kao dodatak ishrani) i vodenog ekstrakta ("čaja");
4. da se odrede korelacioni faktori ispitivanih elemenata i utvrdi da li postoji statistička značajnost između njih;
5. da se utvrdi kakva je veza između bioelemenata i hlorofila.

U tu svhu je urađeno sljedeće:

- Sakupljeni su uzorci lista biljke koprive sa tri različita lokaliteta: L1- sjeverni region (selo Virak - opština Žabljak); L2- centralni region (naselje Kujava - opština Danilovgrad) i L3- južni region (naselje Igalo - Herceg Novi). Uzorkovanje je vršeno dva puta. Prvi put u jesen (novembar 2022. godine) a drugi put u proljeće (jun 2023. godine).

- Osušeni uzorci su fino sprašeni u mlinu predviđenom za mljevenje uzoraka hrane a potom uz pomoć tehnike mikrotalasne digestije u peći (Berghof, SV Xpert) pripremljeni za dalje analize.
- Pripremljeni su vodeni ekstrakti prelivanjem uzorka vrelom dejonizovanom vodom na način sličan dobijanju napitka poznatog u narodu kao “čaj”.
- Ekstrahovan je hlorofil.
- Određeni su metali (Ca, Mg, Cu i Zn) uz pomoć tehnike optičke emisione spektrofotometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Metali su određeni u uzorcima lista koprive i u vodenim ekstraktima lista koprive sa tri lokacije i za dvije sezone (jesenje i proljećne).
- Metodom korelacione analize su određeni korelacioni faktori između metala (Ca, Mg, Cu i Zn).
- Određen je hlorofil *a*, hlorofil *b* i ukupan hlorofil (*a+b*) za sve uzorke pomoću UV- VIS spektrofotometrije.
- Metodom korelacione analize su određeni korelacioni faktori između metala (Ca, Mg, Cu i Zn) i ukupnog hlorofila.
- Dobijeni rezultati su poređeni međusobno kao i sa dostupnim literaturnim podacima.

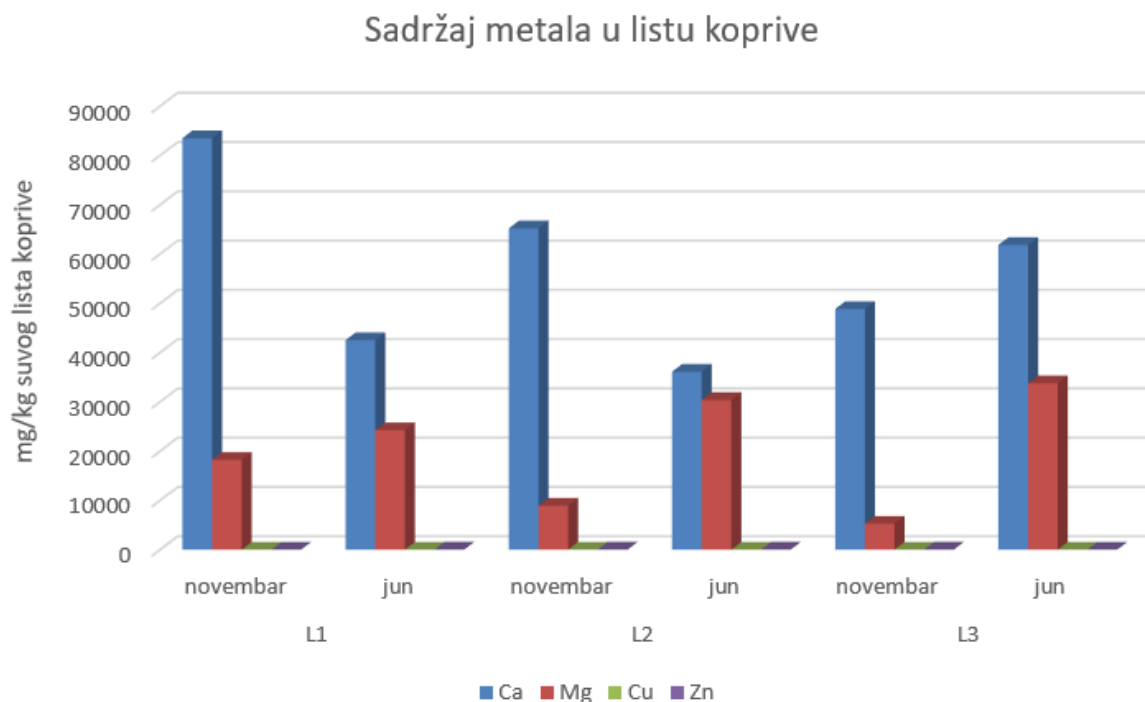
4.2. SADRŽAJ METALA U LISTU KOPRIVE SA RAZLIČITIH PODRUČJA CRNE GORE

Mineralni elementi se mogu naći u biljkama u jonskom obliku, kao organske i neorganske soli, ili se akumuliraju u različitim organskim jedinjenjima (Petrovska, 2012).

U novijim studijama, uz povećanu svijest o značaju metala na zdravlje, objavljuje se sve veći broj izveštaja o ulozi ovih metala u biljkama. Mineralni sadržaj je važan podatak za

prehrambenu vrijednost svake biljke pa i koprive. Optimalni unos elemenata kao što su magnezijum, kalcijum, bakar i cink može smanjiti pojedinačne faktore rizika koji se odnose na neke bolesti (Jabeen i sar., 2010).

Koncentracija metala (Ca, Mg, Cu i Zn) u koprivi ubranoj u jesen (novembar) i proljeće (jun) sa tri pomenuta lokaliteta (L1-L3) je prikazna na grafikonu 1. Analizom je određen i % vlage za sve uzorke (tabela P1). Rezultati su preračunati na kg suvog uzorka.



Grafikon 1. Grafički prikaz koncentracije metala (Ca i Mg, Cu i Zn) u listu koprive uzorkovane u sezoni jesen/proljeće

Sa grafikona 1 i iz tabele P1 (date u Prilogu) može se uočiti da je distribucija biometala u listu koprive sa lokaliteta (L1-L3) u sledećem trendu: $Ca > Mg > Zn > Cu$ što je u skladu sa literaturnim navodima (Pliszka i sar, 2011).

Sa grafikona 1 može se uočiti da je skoro duplo veća koncentracija Ca u uzorcima koji su ubrani u jesen u odnosu na uzorke koji su ubrani u proljeće (osim na lokaciji L3) dok je koncentracija Mg veća u proljećnim uzorcima (od ~1,3 do ~6,6 puta od L1 do L3). Koncentracija Ca je najveća na L1 i opada ka L3 što je najvjerovatnije uzrokovano različitim sastavom zemljišta. Koncentracija Mg je najveća na L3 i opada ka L1. Ovo se može objasniti različitom klimom tj. sa većom osunčanošću na L3 nego L1. Koncentracija Cu je veća u proljećnim uzorcima nego jesenjim (na svim lokacijama L1-L3). Takođe, posmatrano po lokacijama veći je sadržaj Cu u

uzorcima južnih lokaliteta u odnosu na sjeverne. Koncentracija Zn znatno manje varira od ostala tri elementa i sa sezonom i sa lokacijom.

Iz tabele P1, koja je data u Prilogu ovog rada, vidi se da je sadržaj Ca (za prolječne uzorke L1 i L2) i Mg (za jesenje uzorke L1 i L2) blizak onim nađenim u literaturi (Darya Kara, 2009; Đurović i sar., 2017) dok je sadržaj Ca (za jesenje uzorke L1 i L2) i Mg (za prolječne uzorke L1 i L2) značajno iznad navedenih literaturnih podataka. U istraživanju Darya Kara, 2009. pokazano je da je u analiziranom biljnom čaju koprive iz marketa u Turskoj odnos Ca i Mg oko 5 (Ca-38410 mg/kg a Mg-7324 mg/kg).

Listovi koprive analizirani u Srbiji (Đurović i sar., 2017) kao i listovi koprive iz Makedonije (Rafajlovska i sar., 2013) sadrže veću količinu Ca od Mg oko 3 puta a manje Cu od Zn 2-3 puta. Rezultati ovog master rada su pokazali da u listovima koprive, sa lokaliteta (L1-L3) u obje sezone, količina Ca znatno veća od Mg (2-8 puta) dok je koncentracija Cu manja od Zn (2-4 puta).

Maksimalne i minimalne količine makro i mikroelemenata u brojnim ispitivanjima su prikazane u tabeli 6. Količine nađenih biometala (Mg, Cu, Zn) u listovima koprive sa različitih lokaliteta Crne Gore se nalaze u opsegu brojnih ispitivanja (datih u tabeli 6), dok za Ca nađeni sadržaj je blizak maksimalnim literaturnim vrijednostima ili je iznad literaturnih podataka, posebno jesenji uzorci sa lokaliteta L1 (Žabljak).

Tabela 6. Sadržaj minerala i elemenata u tragovima mg/100 g suve koprive (Ait Haj Said i sar., 2015)

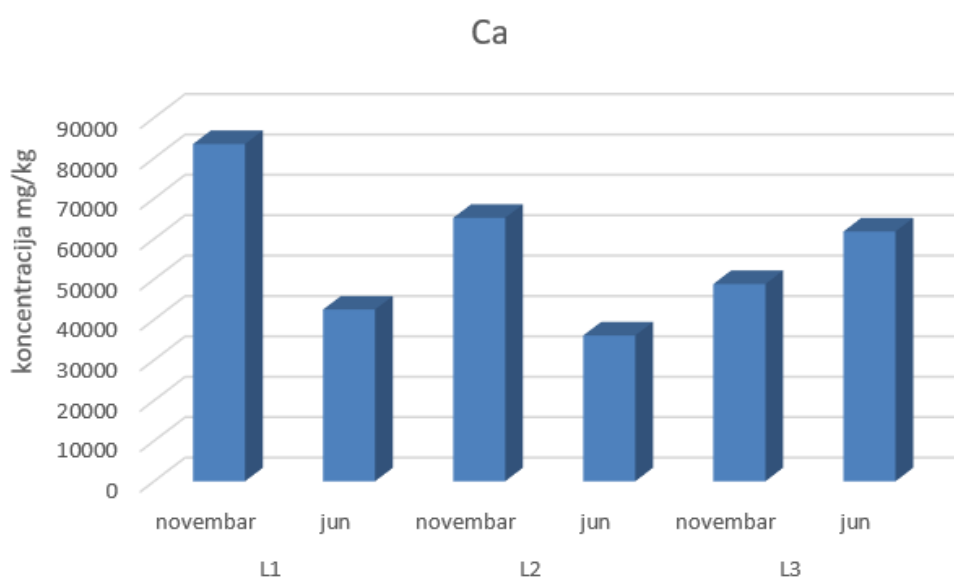
Element	Min	Max
Kalcijum	113,2	5090
Magnezijum	0,22	3560
Bakar	0,52	1,747
Cink	0,9	3,033

Biljke metale uglavnom crpe iz zemljišta na kojem se uzgajaju ili su samonikle na njemu. A preko biljke metali dospjevaju u ljudsko tijelo. S obzirom da se dobijaju znatne koncentracije kako makroelemenata (Ca, Mg) tako i mikroelemenata (Cu, Zn) u biljci to se može pretpostaviti da je njihova koncentracija i u zemljištu značajna (Petrović i sar., 2015). Takođe je neophodna i ravnoteža između koncentracije pojedinih elemenata u biljci jer previsoka koncentracija jednog može smanjiti sadržaj drugog elementa. Kao npr. prevelika koncentracija Ca u zemljištu može dovesti do potpunog gubitka Mg (Sun i sar., 2013). U ispitivanoj koprivi sa različitih

lokaliteta u Crnoj Gori se uočava i značajna koncentracija Ca i Mg tako da je obezbjeđena potrebna ravnoteža ovih elemenata.

Ishrana biljke zavisi od dostupnosti i usvajanja makro i mikro elemenata koji su prisutni u zemljištu. Među glavnim hranljivim sastojcima koprive izdvaja se kalcijum (El Sayed i Faten, 2015). Pregledom literature utvrđeno je da od svih organa biljke, listovi su ti koji sadrže najveću koncentraciju ovog elementa. Kalcijum dospjeva u list koprive kao posljedica formiranja kalcijum-pektata u srednjoj lameli ćelija (El Sayed i Faten, 2015).

Sadržaj kalcijuma u listu koprive sakupljene sa tri različita područja Crne Gore (L1 - L3) u jesen i proljeće prikazan je na grafikonu 2.

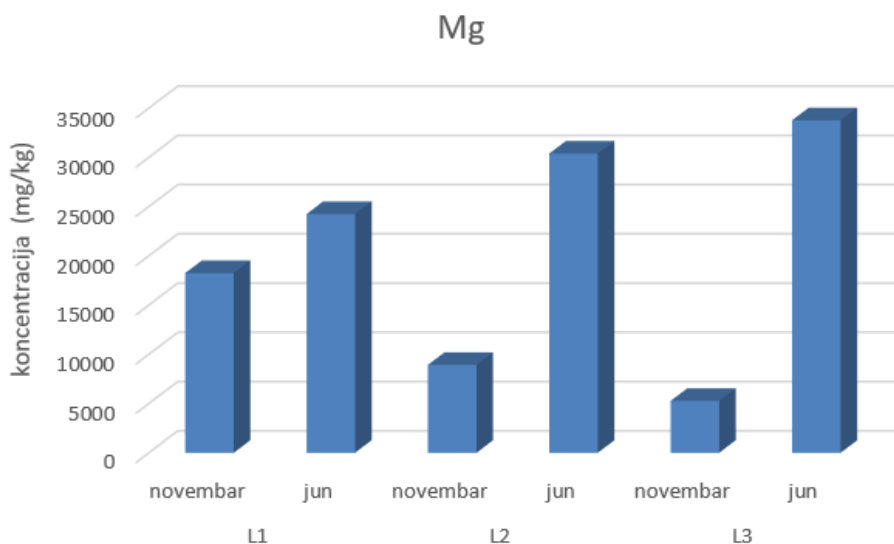


Grafikon 2. Sadržaj kalcijuma (mg/kg) u listu koprive sa lokaliteta L1 - L3 sakupljene u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Sa grafikona 2 (tabela P1) se primjećuje da je najveća koncentracija kalcijuma nađena u jesenjim uzorcima i to u listu koprive sa lokaliteta L1 (83497 mg/kg) a zatim slijede L2 i L3 (redom 65206 mg/kg, 48849 mg/kg). Za proljeće, odnosno list koprive koja je uzorkovana u junu najveća koncentracija kalcijuma je nađena redom u L3 (61853 mg/kg), L1 (42526 mg/kg) i L2 (36105 mg/kg). Koncentracija kalcijuma je u jesenjim uzorcima na L1 i L2 skoro duplo veća nego u proljećnim uzorcima dok uzorak L3 ima veću količinu Ca u proljećnom uzorku nego u jesenjem, taj odnos Ca u jesen i proljeće u L1 je 1,83 u L2 1,80 dok u L3 je 0,79. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je sadržaj Ca veći kod starije biljke nego kod mlađe (tj. u jesenjiim uzorcima u odnosu na proljećne uzorke). Dobijene vrijednosti za proljećne uzorke (L1-L3), kao i za jesenje sa lokacija L2 i L3 su u skladu sa literaturnim podacima (Kara

i sar. 2009; Rafajlovska i sar, 2013; Đurović i sar. 2017). Jesenji uzorak L1 ima izuzetno visok sadržaj Ca što može biti izazvano sastavom zemljišta kao i klimatskim uslovima koji utiču na rast i sastav biljke. Zahvaljujući izuzetno visokom sadržaju kalcijuma list koprive može imati remineralizujuće dejstvo što je korisno kod osteoporoze.

Sadržaj magnezijuma u listu koprive sakupljene sa tri različita područja Crne Gore (L1- L3) u jesen i proljeće je prikazan na grafikonu 3.

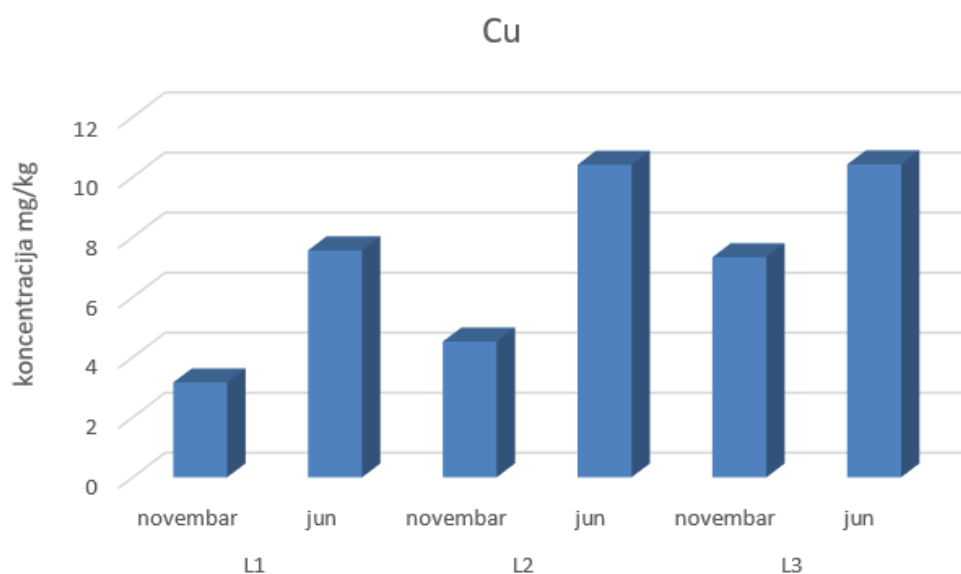


Grafikon 3. Sadržaj magnezijuma (mg/kg) u listu koprive sa lokaliteta L1 - L3 ubrane u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Sadržaj bioelemenata u biljci varira u zavisnosti od klimatskih i ekoloških uslova. Na osnovu ekoloških faktora (toplota, voda, svjetlost, zemljište, nadmorska visina itd.) se može pretpostaviti da će biljke sa juga Crne Gore imati nešto veći sadržaj magnezijuma u biljnom tkivu zahvaljujući većoj izloženosti sunčevoj svjetlosti. Očekuje se da sa porastom osunčanosti biljke raste i koncentracija Mg (Cvrtila, 2015). Ovakva tvrdnja je i potvrđena za list koprive ubran u proljeće (jun). U tom periodu najveća koncentracija magnezijuma je nađena u listu koprive ubranom na lokaciji L3 (33767 mg/kg), potom slijede L2 (30390 mg/kg) pa L1 (24251 mg/kg) (grafikon 3). Međutim ova istraživanja za jesenju sezonu (novembar) pokazuju nešto drugačiji trend. U listu koprive ubrane u novembru na lokaciji L3 sadržaj magnezijuma je mnogo manji u odnosu na uzorke sa lokacija L2 i L1 (5273 mg/kg, 8925 mg/kg, 18245 mg/kg, respektivno) (grafikon 3). Ovakvo ponašanje može se pripisati manjoj osunčanosti koprive iz južnog regiona koja je uzorkovana sa sjenovitog mjesta do kojeg su slabije dopirali sunčevi zraci. Odnos Mg u proljećnim i jesenjim uzorcima se kretao od 1,3 (za L1); preko 3,4 (za L2)

do 6,4 (za L3). Dobijeni rezultati pokazuju da je list koprive odličan izvor Mg i to najbolji u proljećnom periodu. Upotrebom lista koprive (kao dodatak ishrani) u ljetnjim mjesecima u ishranu unosi se značajna količina Mg. To može pozitivno uticati na smanjenje učestalosti svih oblika stresa a takođe ima bitnu ulogu u velikom broju biohemijskih i fizioloških procesa u organizmu.

Sadržaj bakra u listu koprive sakupljene sa tri različita područja Crne Gore (L1- L3) u jesenjoj i proljećnoj sezoni je prikazan na grafikonu 4.



Grafikon 4. Sadržaj bakra (mg/kg) u listu koprive sa lokaliteta L1 - L3 ubrane u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

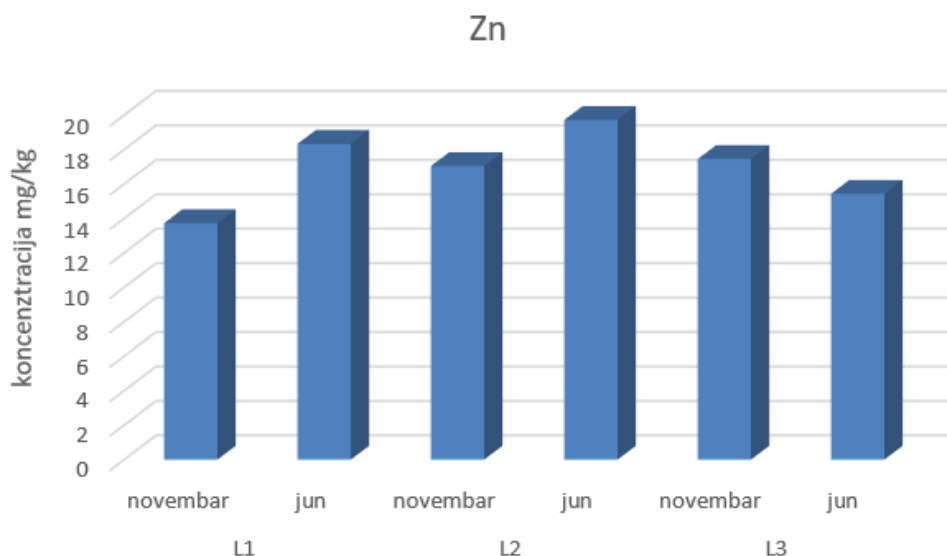
Prosječna količina bakra u listu koprive se kreće oko $5-20 \mu\text{g g}^{-1}$ suvog uzorka (Baker i Senef, 1995). Na osnovu podataka iz grafikona 4 očuva se da je sadržaj Cu je veći u proljećnim uzorcima za sve tri lokacije od 1,4 do 2,4 puta u odnosu na jesenje uzorke.

Sa grafikona 4 i iz tabele P1 se može uočiti da je za jesenje i proljećne uzorke najveći sadržaj bakra primjećen u listu koprive uzorkovanom na lokaciji L3 (7,33 mg/kg i 10,42 mg/kg), zatim slijede L2 (4,52 mg/kg i 10,41 mg/kg) pa L1 (3,16 mg/kg i 7,56 mg/kg). Dakle sadržaj bakra opada sa povećanjem nadmorske visine.

Prema literaturnim navodima, 30 uzoraka ljekovitih biljaka u Turskoj (Tokalioğlu, 2012) i sedam vrsta ljekovitih biljaka iz Poljske (Pytlakowska i sar., 2012) su sadržavali Cu, redom, u količini od $3,3-30,2 \mu\text{g g}^{-1}$ i $1,1-3,2 \mu\text{g g}^{-1}$. Nivo Cu u ispitivanoj koprivi u Crnoj Gori se kreće od 3,16 do 7,33 mg/kg za jesenje uzorke i od 7,56 do 10,42 mg/kg za proljećne uzorke.

Tako da list koprive u sezoni proljeće/ljeto predstavlja dobar izvor Cu koji ima značajnu ulogu u procesu prenosa elektrona u oksidazama (Roat-Malone, 2007).

Sadržaj cinka u listu koprive sakupljene sa tri različita područja Crne Gore (L1- L3) u jesenjoj i proljećnoj sezoni je prikazan na grafikonu 5. Na osnovu podataka koji su prikazani na grafikonu 5 može se ustanoviti da sadržaj cinka zadovoljava potrebe biljke za adekvatan razvoj. Takođe je uočeno da nema značajnih varijacija u sadržaju Zn sa promjenom lokaliteta i sezone.



Grafikon 5. Sadržaj cinka (mg/kg) u listu koprive sa lokaliteta L1 - L3 ubrane u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Iako nije ustanovljena velika razlika u vrijednostima koncentracije cinka ipak se može uočiti da je u uzorcima lista koprive uzorkovanim u novembru najveća količina cinka nađena na lokalitetu L3 (17,45 mg/kg), odmah zatim slijedi lokalitet L2 (17,04 mg/kg) (tabela P1).

Nešto manje vrijednosti cinka su nađene u listu koprive sa lokaliteta L1 (13,73 mg/kg).

U junu je najveća koncentracija cinka određena u koprivi sa L2 (19,72 mg/kg) a zatim redom slijede L1 i L3 (18,33 mg/kg i 15,43 mg/kg).

Dakle, male su varijacije primjećene u količini cinka u listu koprive sa tri pomenute lokacije ali i pored toga uzorci lista koprive sa lokaliteta L1 i L2 imaju veći sadržaj Zn u proljeće nego u jesen (za oko 33% odnosno 15%) dok uzorci lista koprive sa lokaliteta L3 imaju manje cinka u proljećnom periodu za oko 12%.

Cink je esencijalni element, cink čini suštinski dio nekoliko tipova enzima kao što su hidrolaze, peptidaze i oksidaze. Osim toga, cink ima i protivupalno dejstvo i značajnu ulogu u ekspresiji gena (Roat-Malone, 2007).

Američki institut za medicinu je izvršio procjenu količine elemenata koje treba unositi kako bi se zadovoljile dnevne potrebe za ispitivanim biometalima. Ta količina za kalcijum i magnezijum iznosi 1,0 - 1,3 g/d, 240- 420 mg/d, redom. S druge strane, procjenjene količine za cink i bakar su 8 - 11 mg/d, 0,7- 1,0 mg/d, respektivno. Procjenjeni iznosi zavise od pola i starosti (Popov i sar., 2020). Prema ovim podacima, za dnevne potrebe Ca potrebno je 20-30 g suvog lista koprive, za Mg 20-50 g, za Cu ~100 g a za Zn ~500 g suvog lista koprive analizirane u ovom radu, što ukazuje da su listovi koprive analizirani u ovom radu značajan izvor određivanih biometala.

Prema tome list koprive može se smatrati bogatim izvorom Ca i Mg, dobrim izvorom Cu i izvorom Zn, te može biti korišten kao jeftin prirodni izvor navedenih bioelemenata.

4.3. SADRŽAJ METALA U EKSTRAKTIMA LISTA KOPRIVE SA RAZLIČITIH PODRUČJA CRNE GORE

Ljudi često unose minerale iz biljaka upotrebom napitka zvanog - čaj (vodeni ekstrakti ili infuzi). Biljni čaj je veoma popularan napitak koji se često koristi zbog svog terapijskog dejstva. Blagotvorno dejstvo čajeve je posljedica raznovrsnih biološki aktivnih jedinjenja koja se nalaze u sastavu ljekovitog bilja (Pytlakowska i sar., 2012; Sliburska i Kaczmarek, 2012; Popescu i sar., 2021).

Upravo zbog toga se danas u brojnim studijama naučnici fokusiraju na određivanje sadržaja bioaktivnih materija i metala u čajevima. Shodno tome, prvi korak je utvrđivanje sadržaja bioelemenata u ljekovitom bilju, a potom u vodenim ekstraktima ovih biljaka. Čaj je piće koje se priprema od osušenih listova biljke u kombinaciji sa vrelom ili ključalom vodom (Derun i sar., 2010). S obzirom na sve veću potrošnju čajeve važno je odrediti njihov mineralni sastav kako bi se procjenili mogući zdravstveni efekti čaja na potrošača (Olivier i sar., 2012).

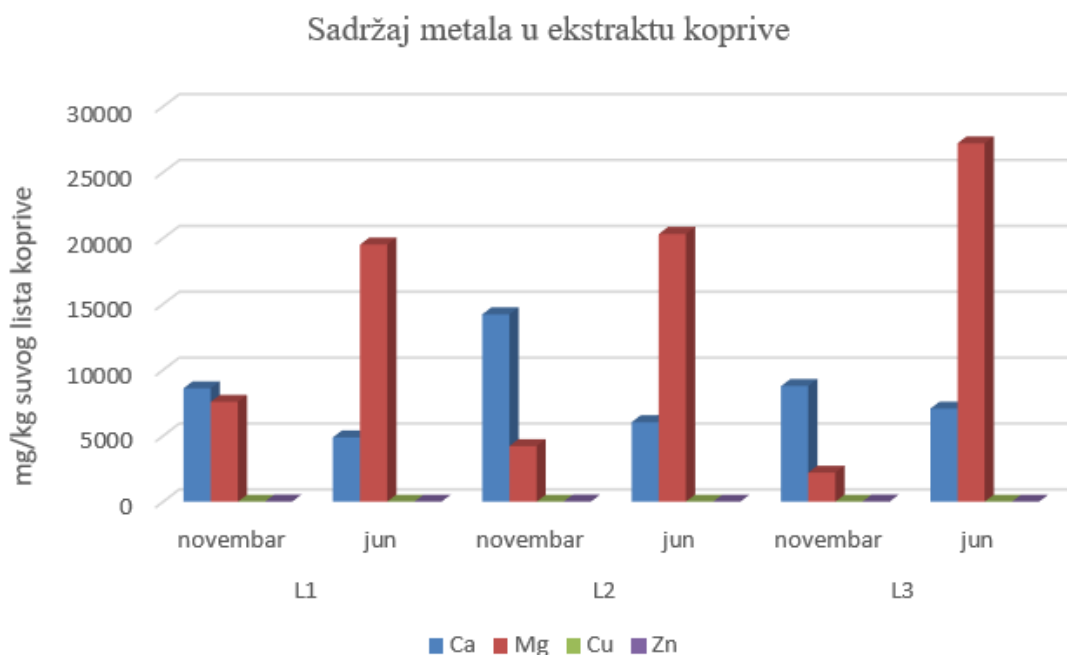
Studije uglavnom imaju za cilj određivanje mineralnog sastava ljekovitog bilja za procjenu pokrivenosti preporučenog dnevnog unosa mineralnih elemenata upotrebom raznih napitaka. Koncentracije bioelemenata u raznim ljekovitim biljkama pokazuju značajne varijacije određene prirodom i vrstom biljke i ispitivanih bioelemenata (Popescu i sar., 2021).

Arceusz i sar., 2011. su proučavali metale u vodenim ekstraktima i bavili su se određivanjem sadržaja makro i mikroelemenata koji se nalaze u različitim vodenim ekstraktima.

De Aragao Tannus i sar., 2021. su dokazali da ljekovito bilje, biološki aktivna jedinjenja, minerali, itd. doprinose razvoju alternativnih terapijskih strategija. Ove strategije se zasnivaju

na identifikaciji i izolaciji različitih sekundarnih metabolita kao i makro i mikroelemenata, koji imaju direktno ili indirektno djelovanje kroz različite molekularne i ćelijske mehanizme. Čaj sadrži minerale i elemente u tragovima kao što su Ca, Mg, Cu i Zn koji su neophodni za ljudsko zdravlje (Kazi i sar., 2020).

Na grafikonu 6 je dat grafički prikaz koncentracije metala u vodenom ekstraktu lista koprive sa lokacija L1, L2 i L3 iz jesenje i prolječne sezone.



Grafikon 6. Grafički prikaz koncentracije metala (Ca i Mg, Cu i Zn) u vodenom ekstraktu lista koprive uzorkovane u sezoni jesen/proljeće, rezultati su dati u mg/kg suvog lista koprive

Ispitivani ekstrakti lista koprive iz novembra sadrže metale u sledećem redosledu: Ca > Mg > Zn > Cu što je u skladu sa literaturnim podacima. Uzorci koji su uzorkovani u junu pokazuju nešto drugačiji trend pa je Mg > Ca > Zn > Cu.

Pregledom literature utvrđeno je da su do sada istraživanja na ovu temu uglavnom pokazivala veliki koeficijent ekstrakcije mineralnih materija vrelom vodom (Leggett i Westerman, 1973).

U tabeli 7 je prikazan sadržaj metala izražen u procentima koji se estrahovao iz lista koprive u vodeni ekstrakt.

Tabela 7. Sadržaj metala (Ca, Mg, Cu i Zn) u %, koji se ekstrahovao iz lista koprive u vodeni ekstrakt. Rezultati su prikazani za sva tri ispitivana lokaliteta u novembru i junu.

Lokacija	Mjesec	Ca (%)	Mg (%)	Cu (%)	Zn (%)
L1	novembar	10	42	82,28	62,64
	jun	1	79	31,00	16,60
L2	novembar	22	47	70,80	65,73
	jun	17	67	35,93	19,98
L3	novembar	18	42	29,19	30,94
	jun	11	81	17,47	14,65

Iz jesenjih uzoraka je najviše ekstrahovano Ca (10-22%), Cu (29-82%) i Zn (30-65%). Dok je iz prolječnih uzoraka najviše ekstrahovano Mg (67-81%) (tabela 7).

U tabeli 8 je prikazana preporučena dnevna količina (RDA) bioelemenata za odrasle a u tabeli 9 procenat zadovoljenja dnevnih potreba konzumiranjem 5 g suvog lista koprive kao dodatka ishrani i konzumiranjem šoljice napitka poznatog kao čaj od lista koprive.

% zadovoljenja dnevnih potreba prema RDA se može izračunati po obrascu 6:

$$(\%)_{RDA} = \frac{m(M) \frac{mg}{kg} * 5g}{m(M)RDA [mg] * 1000} * 100 \quad (\%)_{RDA} = \frac{m(M) \frac{mg}{kg} * 1g}{m(M)RDA [mg] * 1000} * 100 \quad (6)$$

Tabela 8. Preporučena dnevna količina (RDA) bioelemenata za odrasle (Regulation (EU) no 1169, 2011).

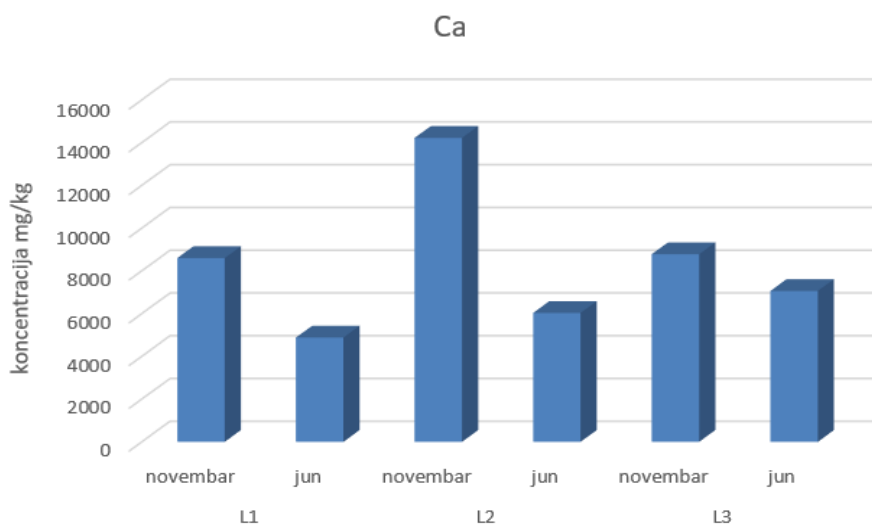
Bioelement	Ca	Mg	Cu	Zn
RDA za odrasle (mg)	800	375	1	10

Tabela 9. Procenat zadovoljenja dnevnih potreba konzumiranjem 5 g suvog lista koprive kao dodatka ishrani i konzumiranjem jedne šoljice čaja od lista koprive

Bioelement	Ca	Mg	Cu	Zn
% ispunjenja RDA za odrasle konzumiranjem 5 g suvog lista koprive za sve tri lokacije (L1- L3)	30-52	7-24	1,6-3,6	0,7-0,9
% ispunjenja RDA za odrasle konzumiranjem šolje čaja za sve tri lokacije (L1- L3)	1,1-1,8	0,6-2	0,2- 0,3	<0,1

Na osnovu rezultata dobijenih istraživanjem u ovom master radu, konzumiranjem 5 g suvih listova koprive kao dodatka ishrani postiže se najveća ispunjenost dnevnih potreba za Ca i Mg (do 52% i 24%). Šoljica čaja od 1 g suve koprive takođe sadrži određenu količinu Ca i Mg (1,8% i 2%).

Na grafikonu 7 je prikazan sadržaj kalcijuma u mg/kg u vodenom ekstraktu lista koprive sakupljene sa tri različita lokaliteta Crne Gore (L1- L3) u sezoni jesen i proljeće.

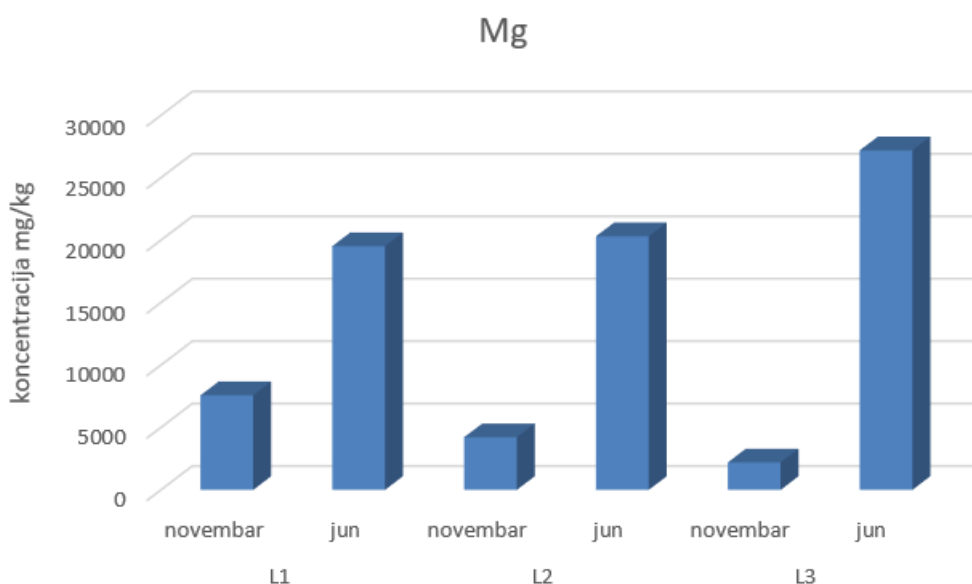


Grafikon 7. Sadržaj kalcijuma u mg/kg u vodenom ekstraktu lista koprive sa lokaliteta L1 - L3 sakupljene u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Čaj od lista koprive obično sadrži više od 0,5 % Ca (Kazi i sar., 2020). Prosječna koncentracija Ca u čajevima od lista koprive u dosadašnjim istraživanjima iznosi 1141 $\mu\text{g g}^{-1}$ (4,74) (Pereira i Dantas, 2016).

Sa grafikona 7 i iz tabele P2, koja je data u prilogu ovog rada, se primjećuje da je znatno veća koncentracija kalcijuma nađena u ekstraktu od lista koprive ubrane u jesen na lokalitetu L2 (14220 mg/kg) u odnosu na druge dvije ispitivane lokacije (redom L3 8780 mg/kg i L1 8600 mg/kg). U ekstraktu lista koprive iz proljećne sezone najveća koncentracija Ca je nađena od uzorka sa lokaliteta L3 (7060 mg/kg), zatim slijede (L2 6032 mg/kg) pa (L1 4880 mg/kg).

Na grafikonu 8 je prikazan sadržaj magnezijuma u vodenom ekstraktu lista koprive sakupljene sa tri različita lokaliteta Crne Gore (L1- L3) u jesenjoj i proljećnoj sezoni.



Grafikon 8. Sadržaj magnezijuma dat u mg/kg u vodenom ekstraktu lista koprive, sa lokaliteta L1 - L3 sakupljene u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Prema Pohl i sar., 2016. koncentracija Mg u različitim biljnim čajevima (menta, kamilica, eukaliptus, matičnjak itd) se kreće u rasponu od 1320 do 2280 mg/kg.

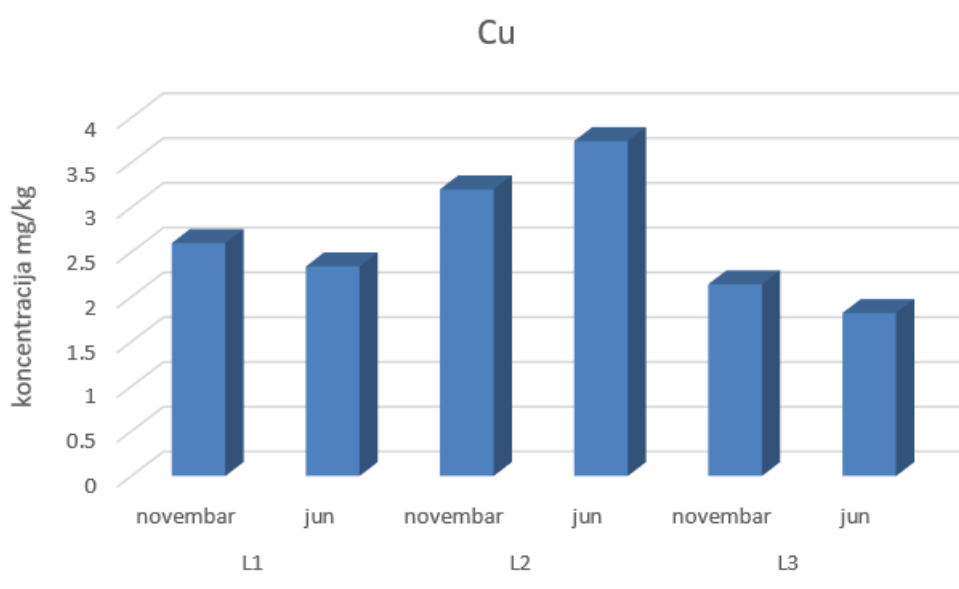
U ispitivanom ekstraktu dobijenom od lista koprive koncentracija Mg je vrlo visoka (mg/kg suvog lista): novembar L1 (7580), L2 (4220), L3 (2200); jun L1 (19520), L2 (20320) i L3 (27200) (grafikon 8).

Znatno veća koncentracija je primjećena u ekstraktu od lista koprive ubranom u proljeće u odnosu na listove ubrane u jesen. To je i očekivano jer je i list u proljeće bogatiji magnezijumom.

Pregledom dostupne literature je nađeno da je procenat ekstrakcije Mg iz suvog biljnog materijala 38% (Pereira i Dantas, 2016).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je procenat ekstrakcije magnezijuma iz jesenjeg uzorka lista koprive ubrane na lokalitetu L2 (47%) potom slijede L3 (42%) i L1 (42%). Iz proljećnog uzorka lista koprive procenat ekstrahovanog Mg je na lokaciji L3 (81%), potom na L1 (79%) i na L2 (67%). Dakle, može se reći da je visok procenat magnezijuma ekstrahovan pomoću vrele dejonizovane vode iz suvog lista koprive sa sva tri lokaliteta.

Na grafikonu 9 je prikazan sadržaj bakra u ekstraktu lista koprive sakupljene sa tri različita lokaliteta Crne Gore (L1- L3) u jesenjoj i proljećnoj sezoni.



Grafikon 9. Sadržaj bakra u mg/kg u ekstraktu lista koprive sa lokaliteta L1 - L3 sakupljene u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Sa grafikona 9 (tabela P2 koja je data u prilogu ovog rada) se vidi da je najveća koncentracija bakra nađena u ekstraktu lista koprive ubrane na području L2 (novembar 3,2 mg/kg i jun 3,74 mg/kg). Zatim slijedi L1 sa sadržajem bakra za obje sezone (novembar 2,6 mg/kg i jun 2,34 mg/kg). Najmanji sadržaj bakra je nađen u ekstraktu lista koprive ubrane na lokalitetu L3 (novembar 2,14 mg/kg i jun 1,82 mg/kg).

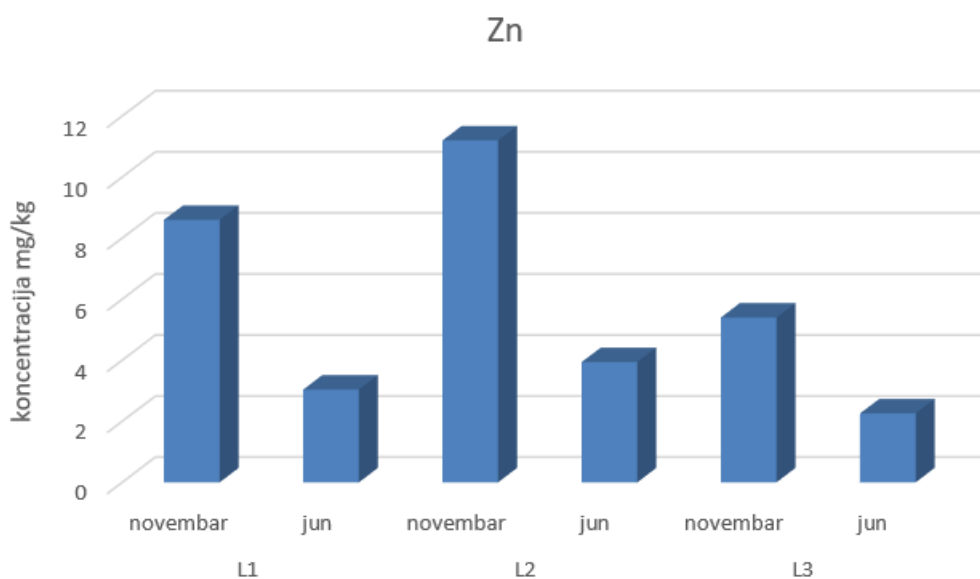
Dakle, nađeno je da je procenat bakra, ekstrahovan iz suvog lista koprive, u vodenom ekstraktu najveći od lista ubranog u novembru sa lokaliteta L1 (82%) a u junu sa lokaliteta L2 (36%). U ekstraktima lista koprive uzorkovanim u novembru nađen je i znatan procenat bakra na L2 (71%), dok je u ekstraktu lista koprive sa lokacije L3 taj procenat znatno manji (30%). U

ekstraktima lista koprive uzorkovanim u junu nađeno je znatno manje bakra. Redom na L2 (36%), L1 (31%) a potom na L3 (17%).

U literaturnim podacima je poznata srednja koncentracija Cu u čajevima i iznosi $1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ (24%) (Pereira i Dantas, 2016). Srednja koncentracija Cu u ispitivanim ekstraktima od lista koprive sa područja Crne Gore (L1-L3) iznosi $2,64 \text{ mg/kg}$.

Koncentracija bakra u ispitivanim ekstraktima od lista koprive se kreće u opsegu $1,82\text{--}3,74 \text{ mg/kg}$. Dobijene vrijednosti su u poređenju sa literaturnim podacima za 18 različitih biljnih čajeva iz Poljske (Kara, 2009), gdje je određena koncentracija bakra $2,2\text{--}17,7 \mu\text{g g}^{-1}$, znatno niže. Vrijednosti za koncentraciju bakra u ispitivanim ekstraktima u ovom radu mogu se porediti sa vrijednostima koncentracije bakra u čajevima iz Srbije gdje se koncentracija Cu kreće u opsegu od $0,48\text{--}24,2 \text{ mg/kg}$ (Ražić i Kuntic, 2011).

Na grafikonu 10 je prikazan sadržaj cinka u ekstraktu lista koprive sakupljene sa tri različita lokaliteta Crne Gore (L1- L3) u jesenjoj i proljećnoj sezoni.



Grafikon 10. Sadržaj cinka u mg/kg u ekstraktu lista koprive sa lokaliteta L1 - L3 sakupljene u jesen 2022. godine i proljeće 2023. godine

Pregledom literature nađeno je da je prosječna koncentracija Zn u čaju od biljke tzv. mačije kandže (*U. guianensis*) $4,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (40%) (Pereira i Dantas, 2016). Prosječna koncentracija Zn u 12 uzoraka crnog čaja iz Poljske koje su proučavali Dambiec i sar., 2013 bila je $21,8 \mu\text{g g}^{-1}$. U Srbiji je ispitivana koncentracija Zn u različitim biljnim napitcima (zelenom, crnom čaju itd.) i ona se kreće u opsegu od $0,07\text{--}66,4 \text{ mg/kg}$ (Ražić i Kuntic, 2011). U ispitivanim ekstraktima lista koprive u ovom master radu prosječna koncentracija Zn sa tri različita

lokaliteta Crne Gore iznosi 8,4 mg/kg što je znatno manje u odnosu na ispitivane čajeve iz Srbije.

Sa grafikona 10 (tabela P2 koja je data u prilogu ovog rada) se vidi da je najveća koncentracija cinka određena u ekstraktu lista koprive uzorkovanom sa lokaliteta L2 (novembar 11,2 mg/kg, jun 3,94 mg/kg), zatim slijede L1 (novembar 8,6 mg/kg, jun 3,04 mg/kg), i L3 (novembar 5,4 mg/kg, jun 2,26 mg/kg).

Najveći procenat cinka je ekstrahovan iz lista koprive sa lokaliteta L2 (novembar 66%, jun 20%); potom slijedi L1 (novembar 63%, jun 17%) dok je najmanji procenat nađen u ekstraktu od lista koprive ubrane na L3 (novembar 31%, jun 15%).

4.3.1. Korelaciona analiza

Metoda korelacione analize je korišćena kao statistička procedura u ovom radu. Koeficijenti korelacije mogu imati pozitivne i negativne vrijednosti. Negativni koeficijenti korelacije pokazuju negativnu korelaciju dok pozitivni koeficijenti korelacije pokazuju pozitivnu korelaciju između dvije varijable. Što je ovaj koeficijent bliži 1, to je veza između dvije varijable veća. Ako je ovaj koeficijent blizu 0, to znači da postoji veoma slaba ili možda čak nikakva veza između dvije varijable (Kara, 2009).

Za uzorke suvog lista koprive uzorkovane u jesen (novembar) je izvršena korelaciona analiza odnosno određeni su korelacioni faktori između metala. Rezultati su prikazani u tabeli 10. Dobijen je visok pozitivan korelacioni faktor za Ca i Mg, što je u skladu sa literaturnim podacima (Kara, 2009).

Isto tako je urađena korelaciona analiza i za uzorke suvog lista koprive uzorkovanih u proljeće (jun). Rezultati su prikazani u tabeli 11. Uočava se visok korelacioni faktor za Cu i Mg. Međutim ovi visoki korelacioni faktori nemaju statističku značajnost ($p > 0,05$)

Tabela 10. Korelacioni faktori između određenih metala (Ca, Mg, Cu i Zn) u suvom listu koprive uzorkovane u jesen 2022. godine.

Elementi	Ca	Mg	Cu	Zn
Ca		0,997 (0,137)	-0,974 (0,147)	-0,925 (0,249)
Mg	0,997 (0,137)		-0,903 (0,283)	-0,985 (0,112)
Cu	-0,974 (0,147)	-0,903 (0,283)		0,813 (0,395)
Zn	-0,925 (0,249)	-0,985 (0,112)	0,813 (0,395)	

Tabela 11. Korelacioni faktori između određenih metala (Ca, Mg, Cu i Zn) u suvom listu koprive uzorkovane u proljeće 2023. godine.

Elementi	Ca	Mg	Cu	Zn
Ca		0,597 (0,593)	0,281 (0,819)	-0,997 (0,052)
Mg	0,597 (0,593)		0,938 (0,226)	-0,530 (0,645)
Cu	0,281 (0,819)	0,938 (0,226)		-0,202 (0,870)
Zn	-0,997 (0,052)	-0,530 (0,645)	-0,202 (0,870)	

U tabeli 12 je prikazana zbirna korelacija nezavisna od sezone i lokaliteta. S obzirom da su korelacioni odnosi između elemenata složeni i teško objašnjivi pojedinačno vrši se zbirna korelacija između elemenata. U korelacionoj analizi se koriste vrijednosti koeficijenata korelacije veće od 0,5 (Kara, 2009).

Tabela 12. Zbirna korelacija između elemenata (Ca, Mg, Cu i Zn) nezavisna od sezone i lokaliteta.

Elementi	Ca	Mg	Cu	Zn
Ca		-0,230 (0,661)	-0,723 (0,104)	-0,945 (0,004)
Mg	-0,230 (0,661)		0,668 (0,147)	0,090 (0,865)
Cu	-0,723 (0,104)	0,668 (0,147)		0,549 (0,260)
Zn	-0,945 (0,004)	0,090 (0,865)	0,549 (0,260)	

Iz tabele 12 se vidi da statističku značajnost ima samo korelacioni faktor između Zn i Ca ($p=0,004<0,05$). Između ovih elemenata postoji statistički značajna jaka negativna korelacija (Pearsonov koeficijent korelacije iznosi $-0,945$).

U analiziranoj koprivi iz Turske dobijen je visok korelacioni faktor između Ca i Mg (0,84) dok je korelacioni faktor Mg sa Zn 0,27 a sa Cu 0,18 (Kara, 2009). U ispitivanom listu koprive sa lokaliteta (L1-L3), u ovom radu, korelacioni faktor između Mg i Zn je takođe nizak (0,09). Između Ca i Mg je niska negativna korelacija (-0,230) dok je između Mg i Cu ta korelacija nešto veća i pozitivna (0,668) ali ne pokazuje statističku značajnost ($p=0,147>0,05$).

4.4. SADRŽAJ HLOROFILA U LISTU KOPRIVE SA RAZLIČITIH LOKALITETA CRNE GORE

Sadržaj hlorofilnih pigmenata varira u zavisnosti od vrste biljke. Najveći sadržaj hlorofila u biljkama se javlja na početku faze cvjetanja. Obično sadržaj hlorofila u listu biljke iznosi oko 4-5 mg (Morna, 2015).

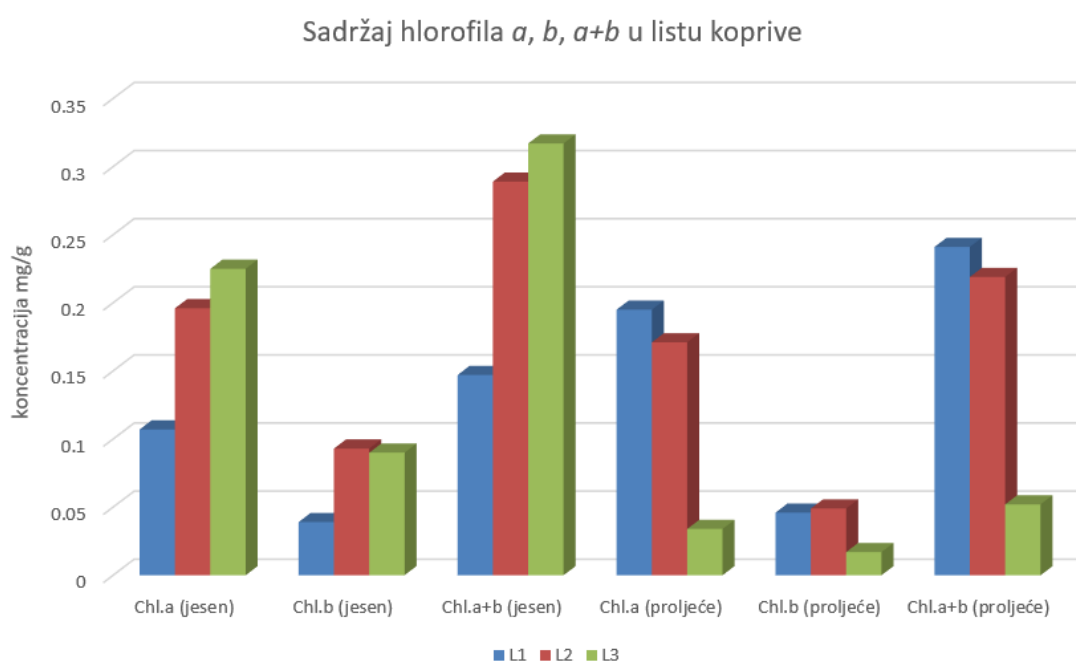
Sa promijenom spoljašnjeg okruženja mijenja se i sadržaj hlorofila kao i fotosintetski kapacitet. Dakle, sadržaj hlorofila bi se mogao koristiti kao indikator za proučavanje rasta biljaka, stresogenih uslova. Varijacija boje i sadržaja hlorofila su djelimično pod genetskom kontrolom.

Ove varijacije je potrebno smanjiti kako bi se osigurala kvalitetna i stabilna boja listova (Li i sar., 2019).

Procjena sadržaja hlorofila se zasniva na ekstrakciji hlorofila iz biljnih listova pogodnim rastvaračima. Kao najbolji rastvarač za ekstrakciju hlorofila se uzima aceton, zbog pružanja veoma oštih apsorpcionih pikova hlorofila (Li i sar., 2019).

Spektrofotometrija je najčešće korišćena analitička tehnika za određivanje hlorofila u listovima biljnih uzoraka.

Koncentracija hlorofila (a , b i $a+b$) data u mg hlorofila/g suvog lista koprive za tri različita lokaliteta u Crnoj Gori je prikazana grafički (grafikon 11).



Grafikon 11. Grafički prikaz sadržaja hlorofila a , b i $a+b$ u listovima koprive uzorkovanim na različitim lokalitetima Crne Gore (L1 - L3) u različitim sezonama rasta jesen/proljeće

Efikasnost ekstrakcije hlorofila se razlikuje u zavisnosti od biljnog materijala (Sun i sar., 2021). Različiti faktori (temperatura, salinitet, suša, prisutnost ozona u troposferi, promjena godišnjih doba itd.) mogu uticati na sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka. To objašnjava različit sadržaj hlorofila za istu biljnu vrstu kao što je kopriva koja je ubrana sa različitih krajeva Crne Gore (sjeverni, centralni i južni region). Svjetlost je najznačajniji faktor koji utiče na fotosintetske pigmente (Cvrtila, 2015).

Koncentracija hlorofila zavisi od intenziteta sunčevog zračenja koje apsorbuje list (Blackburn, 2007).

Kopriva koja je više osunčana, odnosno veći dio dana boravila na mjestu gdje su dopirali intenzivnije sunčevi zraci je bogatija hlorofilom *a* i ima ga oko tri puta više od hlorofila *b*. Za ispitivane uzorke lista koprive koji su ubrani u jesen najosunčanija je kopriva sa juga (L3) potom slijedi L2 pa L1.

Sa grafikona 11 (tabela P3 koja je data u prilogu ovog rada) se vidi da se koncentracija hlorofila *a* u listovima ispitivane koprive se kreće od 0,107 mg/kg (L1) do 0,225 mg/kg (L3). Takvo ponašanje je i očekivano s obzirom da su listovi koprive koji su uzorkovani na jugu bili više izloženi djelovanju sunčevih zraka i višoj temperaturi nego listovi koprive koji su uzorkovani na sjeveru gdje je planinska klima.

Kod koprive ubrane u proljeće je obrnuta situacija, veća je koncentracija hlorofila u listovima koprive koji su uzorkovani na lokalitetu L1 (0,195) u odnosu na koncentraciju hlorofila u listovima koprive koji su uzorkovani na lokalitetu L3 (0,034). Dakle, sadržaj hlorofila varira u zavisnosti od godišnjeg doba.

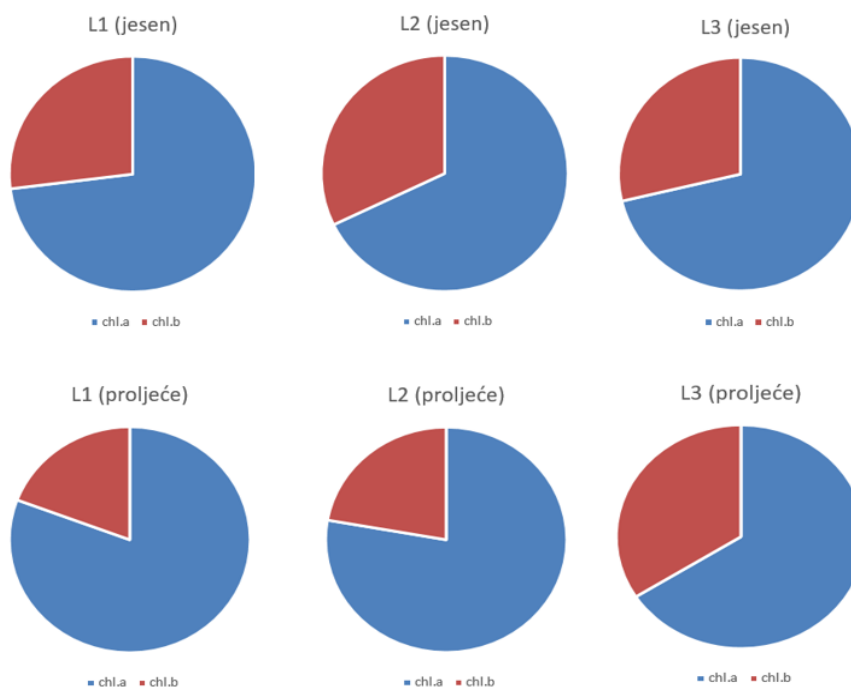
Međutim, postoje istraživanja u kojima je nađeno da više hlorofila i karotena ima u biljkama koje su ubrane sa sjenovitih mjesta nego sa osunčanih mjesta (Kregiel i sar., 2018). Zabilježeno je da postoje razlike u sadržaju hlorofila i karotena u listovima različite starosti. Takođe koncentracija hlorofila u listu raste tokom njihovog rasta, a opada tokom starenja biljke (Kukrić i sar., 2012).

Količina hlorofila se smanjuje pod uticajem stresa (npr. niska i visoka temperatura, hladnoća, suša itd.) (Fang i sar., 1998).

Jako je bitno određivanje ukupnog hlorofila kao i hlorofila *a* i *b* jer se na taj način dobijaju podaci o interakciji same biljke sa spoljašnjom sredinom (Richardson i sar., 2002).

S obzirom da se usled promjene određenih abiotičkih faktora (intenzitet svjetlosti) mijenja odnos hlorofila *a* i *b* (Fang i sar., 1998) u ovom master radu je određivan i taj odnos.

Odnos hlorofila *a* i *b* za ispitivane uzorke lista koprive sa različitih lokaliteta (L1 - L3) je prikazan na grafikonu 12.



Grafikon 12. Grafički prikaz odnosa hlorofila *a* i hlorofila *b* u listovima koprive sa svih ispitivanih lokacija L1- L3 u sezonama jesen/proljeće

S obzirom da dobro osvijetljene biljke imaju tri puta veću koncentraciju hlorofila *a* od hlorofila *b*, to se za većinu uzoraka može primjetiti da je zadovoljen taj odnos.

Odnos hlorofila *a/b* se kreće se od 1,94 mg/g (L3) do 4,2 mg/g (L1) za listove koprive uzorkovane u proljeće. Za jesenje uzorke taj je odnos u opsegu od 2,11 mg/g (L2) do 2,7 mg/g (L1) (tabela P3). Manja vrijednost odnosa hlorofila *a* i *b* govori o većem sadržaju hlorofila *b* koji apsorbuje u plavoj oblasti.

Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da je na sva tri lokaliteta kopriva bila dovoljno izložena sunčevoj svjetlosti, jer bi u suprotnom koncentracija hlorofila *b* bila veća od koncentracije hlorofila *a*. Takav je slučaj sa biljnim vrstama koje žive u sijenci, zaklonjene od sunčevog zračenja.

4.4.1. Korelaciona analiza između određivanih metala i ukupnog hlorofila

Urađena je i korelacija pojedinih elemenata sa ukupnim hlorofilom. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Korelacioni faktori između koncentracije određenih metala (Ca, Mg, Cu i Zn) u listu koprive i sadržaja ukupnog hlorofila ($a+b$).

	Ca	Mg	Cu	Zn
Hlorofil (a+b) jesen	-0,944	-0,993	0,843	0,999
Hlorofil (a+b) proljeće	-0,940	-0,835	-0,592	0,909
zbirno	Ca	Mg	Cu	Zn
Hlorofil (a+b) zbirno	-0,389 (0,039)	-0,766 (0,106)	-0,284 (0,563)	0,552 (0,003)

Dobijeni korelacioni faktori ukazuju jaku vezu između hlorofila u jesenjem uzorku lista koprive i sva četiri analizirana metala s tim da Ca i Mg imaju negativnu korelaciju dok Cu i Zn imaju pozitivnu vrijednost korelacionog faktora. Za proljećne uzorke lista koprive nađena je visoka negativna korelacija Mg i Ca sa ukupnim hlorofilom dok Zn ima visoku pozitivnu korelaciju sa ukupnim hlorofilom.

Iz tabele 13 se uočava statistička značajnost ($p < 0,05$) samo između korelacije zbirne vrijednosti hlorofila sa Ca ($p = 0,039$) i Zn ($p = 0,003$). U istraživanjima [Sumalan i sar., 2023](#) je određen koeficijent korelacije između hlorofila ($a+b$) u listu biljke *S. perfoliatum* i nekih bioelemenata. Dobijeni korelacioni faktori pokazuju slabu pozitivnu korelaciju između ukupnog hlorofila i bakra (0,044) dok je za cink dobijena slaba negativna korelacija (-0,272). Za ispitivanu koprivu sa lokacija (L1-L3) je dobijen znatno drugačiji odnos između ukupnog hlorofila i ispitivanih metala (bakra i cinka).

5. ZAKLJUČAK

Ovim radom su dati opširni podaci o sadržaju četiri bioelementa (Ca, Mg, Cu i Zn) u listu koprive i vodenom ekstraktu lista koprive sa različitih lokaliteta Crne Gore. Iz rezultata dobijenih određivanjem dva makroelementa (Ca, Mg) i dva mikroelementa (Cu i Zn) u koprivi i njenom ekstraktu korišćenjem ICP-OES tehnike i određivanjem hlorofila UV-VIS spektrofotometrijom mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Nađena je značajna količina i makro (Ca, Mg) i mikro (Cu, Zn) elemenata u uzorcima suvog lista koprive sa svih ispitivanih lokaliteta. Utvrđeno je da uzorci koprive sa različitih geografskih područja i iz različitih vegetacionih perioda (sezona) sadrže različitu količinu navedenih biometala. Najveća koncentracija makroelemenata Ca je nađena u jesenjem uzorku (novembar) lista koprive i to sa L1 (83497 mg/kg) a u proljetnjem periodu (jun) na L3 (61853 mg/kg). Sadržaj Mg je najveći u proljećnom uzorku i to na L3 (33767 mg/kg) dok je u jesenjem uzorku najveći sadržaj Mg bio na L1 (18245 mg/kg). Najveća koncentracija Cu je kako u jesen tako i u proljeće nađena u listu koprive ubranom na L3 (jesen - 7,33 mg/kg i proljeće - 10,42 mg/kg). Najviše cinka je nađeno u jesenjem uzorku sa L3 (17,45 mg/kg) a u proljećnom sa L2 (19,72 mg/kg). List koprive je jeftin i bogat izvor Ca (posebno u jesen) i Mg (posebno u proljeće) a dobar izvor Cu i Zn.
- Nađena je značajna količina i makro (Ca, Mg) i mikro (Cu, Zn) elemenata u vodenim ekstraktima lista koprive sa tri ispitivana lokaliteta u Crnoj Gori. Najviše Ca je dobijeno u ekstraktu koprive sa L2 iz jesenjeg uzorka (14220 mg/kg) a iz proljećnog uzorka sa L3 (7060 mg/kg). Najviše Mg je nađeno u ekstraktu koprive uzorkovane u novembru sa L1 (7580 mg/kg) a u junu sa L3 (27200 mg/kg). Najveća koncentracija mikroelemenata (Cu, Zn) u ispitivanim sezonama jesen/proljeće je nađena u ekstraktima lista koprive sa L2 (novembar- 3,2 i 11,2 mg/kg, jun- 3,74 i 3,94 mg/kg).
- Dobijeni podaci pokazuju da je i značajan udio metala ekstrahovan iz suvog lista koprive u čaj (u novembru je taj procenat značajno veći za mikroelemente (Cu, Zn), dok je u junu Mg značajno više ekstrahovan u odnosu na druge ispitivane elemente). Ovi podaci važe za sva tri ispitivana lokaliteta.

- Utvrđeno je da različiti faktori utiču na sadržaj hlorofila u listovima biljaka. Za list koprive ubran sa različitih lokaliteta Crne Gore (sjeverni, centralni i južni region) nađen je različit sadržaj hlorofila a , b i ukupnog hlorofila ($a+b$). Za jesenje uzorke najveća koncentracija hlorofila je nađena u listu koprive sa L3 (0,225 mg/kg chl. a), a za prolječne u listu koprive sa L1 (0,195 mg/kg chl. a). Dakle, sadržaj hlorofila varira u zavisnosti od godišnjeg doba. Što je biljka izložena više sunčevoj svjetlosti to joj je i veća koncentracija hlorofila pa je u jesen najosunčanija kopriva ubrana na lokalitetu L3 a u proljeće sa lokaliteta L1.
- Dobro osvijetljene biljke imaju tri puta veću koncentraciju hlorofila a od hlorofila b . Za sve ispitivane uzorke je približno dobijen taj odnos i u svakom slučaju je koncentracija hlor. a bila veća od koncentracije hlor. b pa se može zaključiti da su uzorci lista koprive korišćeni u ovom radu bili dovoljno izloženi sunčevoj svjetlosti.
- Korelaciona analiza je pokazala visoke korelacione faktore između ispitivanih metala u različitim sezonama i lokalitetima, međutim zbirna analiza, nezavisno od sezone i lokaliteta, je pokazala da je statistički značajan samo visok negativni faktor za Ca i Zn. Takođe, zbirna analiza korelacije ispitivanih metala i ukupnog hlorofila je pokazala da je statistički značajan odnos Ca i Zn sa ukupnim sadržajem hlorofila.
- Prema literaturnim podacima dodatkom samljevenog suvog lista koprive u pšeničnom brašnu i primjenom vodenog ekstrakta za miješanje tijesta statistički se značajno povećava sadržaj svih esencijalnih minerala, među kojima kalcijum zauzima najveći udio. U slučaju mikroelemenata, značajno se povećava koncentracija gvožđa i bakra. Ova činjenica usmjerava dalja istraživanja na ispitivanje uticaja zamjene dijela brašna sa samljevenim suvim listom koprive, kao i upotrebe ekstrakta lista koprive u tijestu, na povećanje sadržaja minerala u njemu.

6. LITERATURA

1. **Agarwal, P.; Gupta, R. & Agarwal, N. (2016).** A review on enzymatic treatment of phenols in wastewater, *Journal of biotechnology and biometaterials*, 6(4), 249.
2. **Ahmed KK, M. & Parasuraman, S. (2016).** *Urtica dioica* L., (*Urticaceae*): A Stinging nettle, *Systematic reviews in pharmacy*, 5, 6-8.
3. **Ait Haj Said, A.; Otmani, I. S. E.; Derfoufi, S. & Benmoussa, A. (2015).** Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica*), *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 7, 8-14.
4. **Arceusz, A.; Wesolowski, M. & Radecka, I. (2011).** Macro- and micro- elements in some herbal drug raw materials and their water extracts consumed in Poland, *Central european journal of chemistry*, 9, 917-924.
5. **Asgarpanah, J. & Mohajerani, R. (2012).** Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L., *Journal of medicinal plants research*, 6, 5714-5719.
6. **Baker, D. E. & Senef, J. P. (1995).** Copper, In 'Heavy metals in soils', (Alloway B.J., ed), Blackie academic and professional, London, 179-205.
7. **Bakshi, A., & Gilroy, S. (2022).** Moving magnesium, *Molecular plant*, 15(5), 796-798.
8. **Barak, P. & Helmke, P. A. (1993).** The chemistry of zinc, In: *Zinc in soils and plants* (Robson, A.D.), *Developments in plant and soil sciences*, 55, 1-13.
9. **Başgel, S. & Erdemoğlu, SB. (2006).** Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey, *Science of the total environment*, 359, 82-89.
10. **Beghi, S.; Furmanik, M.; Jaminon, A.; Veltrop, R.; Rapp, N.; Wichapong, K.; Bidar, E.; Buschini, A. & Schurgers, LJ. (2022).** Calcium signalling in heart and vessels: role of calmodulin and downstream calmodulin-dependent protein kinases, *International journal of molecular sciences*, 23(24), 16139.
11. **Blackburn, G. A. (2007).** Hypercentral remote sensing og plant pigments, *Journal of experimental botany*, 58(4), 855-867.
12. **Boss, C. B. & Fredeen, K. J. (1997).** *Concept, Instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, 2nd edition, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, 125.
13. **Broadley, M. R.; White, P. J.; Hammond, J. P.; Zelko, I. & Lux, A. (2007).** Zinc in plants, *The new phytologist*, 173(4), 677-702.

14. **Burić, D.; Milenković, M. & Dučić, V. (2019).** The specificities of the climate of Danilovgrad (Montenegro), *Glasnik srpskog geografskog drustva*, 99, 19-28.
15. **Burström, H.G. (1968).** Calcium and plant growth, *Biological reviews*, 1, 43, 287-316.
16. **Chaudhry, A. H.; Nayab, S.; Hussain, S. B.; Ali, M. & Pan, Z. (2021).** Current understandings on magnesium deficiency and future outlooks for sustainable agriculture, *International journal of molecular sciences*, 22, 1819.
17. **Chirinos, J. R.; Kahen, K.; O'Brien, S. E. & Montaser, A. (2002).** Mixed-gas inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using a direct injection high efficiency nebulizer, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 372(1), 128–135.
18. **Cosimo, D. C. & Haller, C. (2015).** UV/VIS Spectrophotometry - fundamentals and applications, Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, 51.
19. **Crichton, R. R. (2007).** Biological inorganic chemistry an introduction, Elsevier, Amsterdam, 381.
20. **Cvrtila, A. (2015).** - Fotosintetski pigmenti u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) *Delile*) zadarskog akvatorija, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska, 59.
21. **Dajić - Stevanović, Z.; Stešević, D. & Pljevljakušić, D. (2013).** Regionalni priručnik za sakupljače ljekovitog bilja, Opština Plužine (Crna Gora), Opština Ljubovija (Srbija), 88.
22. **Dambiec, M.; Polechónska, L. & Klink, A. (2013).** Levels of essential and nonessential elements in black teas commercialized in Poland and their transfer to tea infusion, *Journal of food composition and analysis*, 31, 62-66.
23. **De Aragão Tannus, C.; De Souza Dias, F.; Santana, F. B.; Dos Santos, D. C. M. B.; Magalhães, H. I. F.; De Souza Dias, F. & De Freitas Santos Júnior, A. (2021).** Multielement Determination in medicinal plants and herbal medicines containing *Cynara scolymus* L., *Harpagophytum procumbens* D.C., and *Maytenus ilifolia* (Mart.) ex Reiss from Brazil using ICP OES, *Biological trace element research*, 199(6), 2330-2341.
24. **Derun, E.; Kıpçak, A. S. & Dere, O. O. (2010).** The determination of the boron amounts of teas that are sold in Turkey by using the ICP-OES technique, *Lecture notes in engineering and computer science*, 3, 2277-2279.
25. **Devkota, H. P.; Paudel, K. R.; Khanal, S.; Baral, A.; Panth, N.; Adhikari-Devkota, A.; Jha, N. K.; Das, N.; Singh, S. K.; Chellappan, D. K.; Dua, K. & Hansbro, P. M. (2022).** Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): Nutritional composition, bioactive compounds, and food functional properties, *Molecules*, 27(16), 5219.

26. **Đurović, S.; Zeković, Z.; Šorgić, S.; Popov, S.; Vujanović, M. & Radojković, M. (2018).** Fatty acid profile of stinging nettle leaves: Application of modern analytical procedures for sample preparation and analysis, *Analytical methods*, 10, 1080-1087.
27. **Đurović, S.; Pavlič, B.; Šorgić, S.; Popov, S.; Savić, S.; Pertonijević, M.; Radojković, M.; Cvetanović, A. & Zeković, Z. (2017).** Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches, *Journal of functional foods*, 32, 18–26
28. **Đurović, S.; Vujanović, M.; Radojković, M.; Filipović, J.; Filipović, V.; Gašić, U.; Tešić, Ž.; Mašković, P. & Zeković, Z. (2020).** The functional food production: Application of stinging nettle leaves and its extracts in the baking of a bread, *Food chemistry*, 312, 126091.
29. **El Sayed, E. H. & Faten, I. (2015).** Calcium: Physiological function, deficiency and absorption, 8, 196-202.
30. **European Commission (2017).** Directorate-general for health and food safety; Final review report for the basic substance *Urtica* spp.; European Commission: Brussels, Belgium
31. **Fan, X.; Zhou, X.; Chen, H.; Tang, M. and Xie, X. (2021).** Cross-talks between macro- and micronutrient uptake and signaling in plants, *Frontiers in plant science*, 12, 663477.
32. **Fang, Z.; Bouwkamp, J. & Solomos, T. (1998).** Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L., *Journal of experimental botany*, 49, 503-510.
33. **Fiorentini, D.; Cappadone, C.; Farruggia, G. & Prata, C. (2021).** Magnesium: Biochemistry, nutrition, detection, and social impact of diseases linked to its deficiency, *Nutrients*, 13(4), 1136.
34. **Fisher, A. & Hill, S. J. (2007).** Alternative and mixed gas plasmas in inductively coupled plasma spectrometry and its applications, (S.J. Hill, eds.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 226-250.
35. **Fong, J. & Khan, A. (2012).** Hypocalcemia: updates in diagnosis and management for primary care, *Canadian family physician*, 58(2), 158-162.
36. **Ghimire, S.; Thapa, R.; Kurunju, K. & KC, S. (2022).** *Urtica Dioica*: A ostracized neglected plant in agriculture serving as abest medicinal and insecticidal property tropical agrobiodiversity (TRAB), Zibeline international publishing, 3, 8-11.
37. **Gozum, S.; Arikan, D. & Buyukavci, M. (2007).** Complementary and alternative medicine use in pediatric oncology patients in eastern Turkey, *Cancer nursing*, 30, 38-44.
38. **Greger, M. (2004).** Uptake of nuclides by plants, (SKB-TR-04-14), Department of botany, Stockholm University, Sweden, 35, 66.

39. **Grgurić - Šipka, S. (2014).** Hemija bioelemeanta, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija, 172.
40. **Guo, W.; Hussain, N.; Liang, Z. & Yang D. (2016).** Magnesium deficiency in plants: An urgent realistic problem, *The crop journal*, 4, 83-91.
41. **Hafeez, B.; Khanif, Y. M. & Saleem, M. (2013).** Role of zinc in plant nutrition- A review, *American journal of experimental agriculture*, 3(2), 374-391.
42. **Hariri, M. & Avşar, E. (2022).** Tipburn disorder detection in strawberry leaves using convolutional neural networks and particle swarm optimization, *Multimedia tools and applications*, 81 (8), 11795-11822.
43. **Havlin, J. L.; Beaton, J. D.; Tisdale, S. L. & Nelson, W. L. (2014).** Soil fertility and fertilizers, An introduction to nutrient management, 6th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New York, 499.
44. **He, C.; Chen, J.; Wang, H.; Wan, Y.; Zhou, J.; Dan, Z.; Zeng, Y.; Xu, W.; Zhu, Y.; Huang, W., & Yin, L. (2019).** Crystal structures of rice hexokinase 6 with a series of substrates shed light on its enzymatic mechanism, *Biochemical and biophysical research communications*, 515(4), 614–620.
45. **Hermans, C.; Vuylsteke, M.; Coppens, F.; Craciun, A.; Inzé, D. & Verbruggen, N. (2010).** Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in *Arabidopsis thaliana* reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes, *The new phytologist*, 187(1), 119-131.
46. **Holm, G. (1954).** Chlorophyll mutations in barley, *Acta agriculturae scandinavica*, 4, 457-471.
47. **Horn, N.; Møller, L. B.; Nurchi, V. M. & Aaseth, J. (2019).** Chelating principles in menkes and wilson diseases: Choosing the right compounds in the right combinations at the right time, *Journal of inorganic biochemistry*, 190, 98-112.
48. **Hou, X. & Jones, B. T. (2000).** Inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Encyclopedia of analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 9468-9485.
49. **Ishfaq, M.; Wang, Y., Yan, M.; Wang, Z.; Wu, L.; Li, C. & Li, X. (2022).** Physiological essence of magnesium in plants and its widespread deficiency in the farming system of China, *Frontiers in plant science*, 13, 802274.
50. **Ismail, A. A. A.; Ismail, Y. & Ismail, A. A. (2018).** Chronic magnesium deficiency and human disease; time for reappraisal, *QJM: monthly journal of the association of physicians*, 111(11), 759-763.

51. **Jabeen, S.; Shah, M. T.; Khan, S. & Hayat, M. Q. (2010).** Determination of major and trace elements in ten important folk therapeutic plants of haripur basin, Pakistan, *Journal of medicinal plants research*, 4, 559-566.
52. **Jacobs, A.; Renaudin, G.; Forestier, C.; Nedelec, J. M. & Descamps, S. (2020).** Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: A review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects, *Acta biomaterialia*, 117, 21-39.
53. **Jahnen - Dechent, W. & Ketteler, M. (2012).** Magnesium basics, *Clinical kidney journal*, 5 (1), i3-i14.
54. **Jomova, K.; Makova, M.; Alomar, S. Y.; Alwasel, S. H.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Rhodes, C. J. & Valko, M. (2022).** Essential metals in health and disease, *Chemico-biological interactions*, 367, 110173.
55. **Jomova, K., & Valko, M. (2011).** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
56. **Joshi, B.; Mukhija, M. & Kalia, A. (2014).** Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L., *International journal of green pharmacy*, 8, 201-209.
57. **Jovanović, S.; Jakovljević, K.; Djordjević, V. & Vukojičić, S. (2013).** Ruderal flora and vegetation of the town of Žabljak (Montenegro)- an overview for the period 1990-1998, *Botanica serbica*, 37, 55-69.
58. **Kara, D. (2009).** Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis, *Food chemistry*, 114, 347-354.
59. **Kazi, M. A., Huda, M. & Chowdhury, M. (2020).** Comparative evaluation for minerals and nutritional elements in seventeen marketed brands of black tea of Bangladesh, *Food science and technology*, 8(1), 10-22.
60. **Kirtikar, KR. & Basu, BD. (2008).** *Indian medicinal plants*, 2nd ed. International book distributors, Dehradun, 2340.
61. **Koch, W.; Kukula-Koch, W.; Czop, M.; Baj, T., Kocki, J., Bawiec, P.; Casasnovas, R. O.; Glowniak-Lipa, A. & Glowniak, K. (2021).** Analytical assessment of bioelements in various types of black teas from different geographical origins in view of chemometric approach, *Molecules*, 26, 6017.
62. **Kramer, D. A. (2013).** Magnesium, its alloys and compounds, U.S. Geological survey open-file report 01-341, BiblioGov, 34.
63. **Kregiel, D.; Pawlikowska, E. & Antolak, H. (2018).** *Urtica spp.*: Ordinary plants with extraordinary properties, *Molecules*, 23(7), 1664.

64. **Krezel, A., & Maret, W. (2006).** Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn, *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 11(8), 1049-1062.
65. **Kukrić, Z. Z.; Topalić - Trivunović, Lj.; Kukavica, B.; Matoš, S. B.; Pavičić, S. S.; Boroja, M. M. & Savić, A.V. (2012).** Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.), *Acta periodica technologica*, 43, 257-272.
66. **Lakshmi, V. (2018).** UV-Visible spectroscopy, *Analytical chemistry*, P. R. Govt. College (A), Kakinada, 13.
67. **La Torre, A.; Iovino, V. & Caradonia, F. (2018).** Copper in plant protection: current situation and prospects, *Phytopathologia mediterranea*, 57(2), 201-236.
68. **Leggett, G. E. & Westerman, D. T. (1973).** Determination of mineral elements in plant tissues using trichloroacetic acid extraction, *Journal of agricultural and food chemistry*, 21, 65.
69. **Linse, S. & Forsen, S. (1995).** Determinants that govern high-affinity calcium binding, *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, 30, 89-151.
70. **Lippard, S. J. & Berg, J. M. (1994).** Principles of bioinorganic chemistry, University science books, Mill Valley, California, 411.
71. **Li, Y.; Sun, Y.; Jiang, J. & Liu, J. (2019).** Spectroscopic determination of leaf chlorophyll content and color for genetic selection on *Sassafras tzumu*, *Plant methods*, 15, 73.
72. **Lukić, A. & Lukić, M. (2020).** Geoprostorna evaluacija opštine Herceg Novi za potrebe određivanja pogodnih lokacija za izgradnju SFN postrojenja, *Zbornik radova mladih istraživača, Lokalna samouprava u planiranju i uređenju prostora i naselja*, Beograd, 113-119.
73. **Maguire, M. E. (2006).** Magnesium transporters: properties, regulation and structure, *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 11, 3149–3163.
74. **Malik, J.; Szakova, J.; Drabek, O.; Balik, J. & Kokoska, L. (2008).** Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions, *Food chemistry*, 111, 520-525.
75. **Marschner, H. (1995).** Functions of mineral nutrients: Micronutrients, In: *Mineral nutrition of higher plants (2nd Edition)*, Academic press, London, 313-404.
76. **Maud, F.; Katell, R. & Michel D. W. (2009).** Gene regulation by voltage-dependent calcium channels, *Biochimica et biophysica acta*, 1793, 1096-1104.
77. **Mc Laughlin, S. B. & Wimmer, R. (1999).** Tansley review No.104, *Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes*, *New phytologist*, 142, 373-417.

78. **Mermet, J. M. & Poussel, E. (1995).** ICP emission spectrometers: 1995 analytical figures of merit, *Applied spectroscopy*, 49(10), 12A-18A.
79. **Miotto, A.; Ceretta, C. A.; Brunetto, G.; Nicoloso, F. T.; Girotto, E.; Farias, J. G.; Tiecher, T. L.; De Conti, L. & Trentin, G. (2014).** Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil, *Plant soil*, 374, 593-610.
80. **Moreira, L.; Pavesi, A.; Raphael & Leonel, F.; Machado, H.; Teixeira, A.; Santos, F.; Santos, V. & Lyon, J. (2016).** The biological roles of calcium: nutrition, diseases and analysis, 21-29.
81. **Morna, A. (2015).** Chlorophyll and carotenoid content in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and nettle leaves (*Urtica dioica* L.), *Analele universității din oradea, fascicula: Ecotoxicologie, zootehnie și tehnologii de industrie alimentară*, 14, 243-248.
82. **Nahata, A. & Dixit, V. (2012).** Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats, *Andrologia*, 44, 396-409.
83. **Olivier, J.; Symington, E.; Jonker, N.; Rampedi, I. & Eeden, T. S. (2012).** Comparison of the mineral composition of leaves and infusions of traditional and herbal teas, *South african journal of science*, 108, 7.
84. **Palermo, G.; Spinello, A.; Saha, A. & Magistrato, A. (2021).** Frontiers of metal-coordinating drug design, *Expert opinion, on drug discovery*, 16, 497-511.
85. **Palka S. E.; Drag-Kozak, E.; Migdal, L. & Kmiecik, M. (2022).** Effect of a diet supplemented with nettle (*Urtica dioica* L.) or fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on the content of selected heavy metals in liver and rabbit meat, *Animals*, 12, 827.
86. **Pereira, J. B. Jr. & Dantas, K. G. (2016).** Evaluation of inorganic elements in cat's claw teas using ICP OES and GF AAS, *Food chemistry*, 196, 331-337.
87. **Perrone, D. & Monteiro, M. (2016).** The chemistry of calcium, *Food and nutritional components in focus*, 67, 74.
88. **Petrović, S. M.; Savić, S. R.; Dimitrijević, M. Lj. & Petronijević, Ž. B. (2015).** The determination of micro and macroelements in chamomile teas (*Matricaria chamomilia* L.), *Advanced technologies*, 4, 37-42.
89. **Petrovska, B. B. (2012).** Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacognosy review*, 6(11), 1-5.
90. **Pierre, J. L. (2000).** One electron at a time oxidations and enzymatic paradigms: from metallic to non-metallic redox centers, *Chemical society reviews*, 29, 251–257.

91. **Pliszka, B.; Huszcza-Ciolkowska, G.; Mielezko, E.; Wrblewska-Wierzbicka, B. & Januszewicz, E. (2011).** Using two methods for plant material preparation in order to determine the content of bioelements in red cabbage (*brassica oleracea l. var. capitata l. f. rubra*), Journal of elementology, 10, 455-465.
92. **Pohl, P.; Dzimitrowicz, A.; Jedryczko, D.; Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M. & Jamroz, P. (2016).** The Determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 130, 326-335.
93. **Popescu, G. S.; Velcirov, A. B.; Ienciu, A.; Nebancea, N.; Radu, F.; Rotariu, L. S. & Manea, D. (2021).** The Evaluation of some bioelements in different types of herbal teas, Research journal of agricultural science, 53, 180-186.
94. **Popović, M. (2005).** Biohemija biljaka drugo izdanje, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija, 565.
95. **Popov, S.; Skeledžija, S.; Šorgić, S.; Zeković, Z., Micić, D., Radulović, A. & Đurović S. (2020).** Application of contemporary extraction techniques for elements and minerals recovery from stinging nettle leaves, Applied sciences, 10, 793.
96. **Powell, S. R. (2000).** The antioxidant properties of zinc, The journal of nutrition, 130(5), 1447-1454
97. **Pytlakowska, K.; Kita, A.; Janovska, P.; Polowiniak, M. & Kozik, V. (2012).** Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions, Food chemistry, 135(2), 494-501.
98. **Rafajlovska, V.; Kavrakovski, Z.; Simonovska, J. & Srbinoska, M. (2013).** Determination of protein and mineral contents in stinging nettle, Quality of life research, 4, 26-30.
99. **Rakhit, R., & Chakrabarty, A. (2006).** Structure, folding, and misfolding of Cu, Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis, Biochimica et biophysica acta, 1762(11-12), 1025–1037.
100. **Ražić, S. & Kuntić, V. (2011).** Diverse elements in herbal tea products consumed in Serbia using inductively coupled plasma mass spectrometry, International journal of food properties, 16, 1094-2912.
101. **Richardson, A. D.; Duigan, S. P. & Berlyn, G. P. (2002).** An evaluation of non-invasive methods to estimate foliar chlorophyll content, New phytologist, 153, 185-194.
102. **Rink, L. & Gabriel, P. (2000).** Zinc and the immune system, The proceedings of the nutrition society, 59(4), 541–552.

103. **Roat - Malone, R. M. (2007).** Bioinorganic chemistry: A short course (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 501.
104. **Rudani, K.; Prajapati, K. & Patel, V. (2018).** The importance of zinc in plant growth - a review, International research journal of natural and applied sciences, 5, 2349-4077.
105. **Rude, R. K. & Gruber, H. E. (2004).** Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations, The journal of nutritional biochemistry, 15(12), 710-716.
106. **Saad, A.; El-Sikaily, A. & Kassem, H. (2016).** Essential, non-essential metals and human health, Pollution status, environmental protection and renewable energy production in marine systems, 87, 135.
107. **Schmid, F. X. (2001).** Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry, Encyclopedia of life sciences, 1-4.
108. **Shekh, A. Y.; Krishnamurthi, K.; Mudliar, S. N.; Yadav, R. R.; Fulke, A. B.; Devi, S. S. & Chakrabarti T. (2012).** Recent advancements in carbonic anhydrase-driven processes for CO₂ sequestration: minireview, Critical reviews in environmental science and technology, 42(14), 1419-1440.
109. **Sigel, A.; Sigel, H. & Sigel, R. K. O. (2013).** Interrelation between essential metal ions and human diseases, Metal ions in life sciences, 13, 1-573.
110. **Sliburska, J. & Kaczmarek, K. (2012).** Herbal infusions as a source of calcium, magnesium, iron, zinc and copper in human nutrition, International journal of food sciences and nutrition, 63(2), 194-198.
111. **Smiljić, M.; Stankov-Jovanović, V.; Ćirić, S.; Stamenković, N.; Ilić, M.; Jakšić, T.; Živić, N.; Stamenković, S. & Marković, M. (2018).** Sadržaj pigmenata hloroplasta u ljekovitoj biljci *Teucrium chamaedrys* sa sanirane deponije rudarsko metalurško hemijskog kombinata „Trepča”, Zbornik radova, XXIII savjetovanje o biotehnologiji, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Čačak, 358-363.
112. **Spasić, M. (2016).** Geografski prikaz nacionalnog parka Durmitor, Master rad, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija, 70.
113. **Stanton, C.; Sanders, D.; Krämer, U. & Podar, D. (2022).** Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification, Molecular plant, 15(1), 65-85.
114. **Sumalan, R.L.; Nescu, V.; Berbecea, A.; Sumalan, R.M.; Crisan, M.; Negrea, P. & Ciulca, S. (2023).** The impact of heavy metal accumulation on some physiological parameters in silphium perfoliatum L. plants grown in hydroponic systems, Plants, 12, 1718.

115. **Sun, H.; Liu, S.; Chen, K. & Li, G. (2021).** Spectrophotometric determination of chlorophylls in different solvents related to the leaf traits of the main tree species in Northeast China, IOP conference series: earth and environmental science, 836, 10.
116. **Sun, X.; Kay, A.D.; Kang, H.; Small, G.E.; Liu, G.; Zhou, X.; Yin, S. & Liu, C. (2013).** Correlated biogeographic variation of Mg across trophic levels in a terrestrial food chain, Plos one, 8, e78444.
117. **Swaminathan, R. (2003).** Magnesium metabolism and its disorders, The clinical biochemist, reviews, 24(2), 47-66.
118. **Tabasum, F.; Bazila, N. & Syed Zameer, H. (2018).** Stinging nettle: A herb with tremendous pharmacological potential, International journal of unani and integrative medicine, 2(2), 24-28.
119. **Taiz, L. & Zeiger, E. (2010).** Plant Physiology. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
120. **Theophanides, T. & Anastassopoulou, J. (2002).** Copper and carcinogenesis, Critical reviews in oncology/hematology, 42(1), 57–64.
121. **Thompson, M. & Barnes, R. M. (1992).** Analytical performance of inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, In Inductively coupled plasma in analytical atomic spectrometry, 2nd edition, eds A. Montaser, D.W. Golightly, Wiley-VHC, New York, 249–297.
122. **Tokaliođlu, S. (2012).** Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis, Food chemistry, 134, 2504-2508.
123. **Tsonev, T. & Lidon, F. (2012).** Zinc in plants - An overview, Emirates journal of food and agriculture, 24, 322-333.
124. **Tuteja, N. & Mahajan, S. (2007).** Calcium signaling network in plants: an overview, Plant signaling & behavior, 2(2), 79-85.
125. **Upton, R. (2013).** Stinging nettles leaf (*Urticadioica* L.): Extraordinary vegetable medicine, Journal of herbal medicine, 3(1), 9-38.
126. **Van Niekerk, G.; Mitchell, M. & Engelbrecht, A. M. (2018).** Bone resorption: supporting immunometabolism, Biology letters, 14(2), 20170783.
127. **Vasák, M. & Hasler, D. W. (2000).** Metallothioneins: new functional and structural insights, Current opinion in chemical biology, 4(2), 177-183.
128. **Von Wettstein, D.; Gough, S. & Kannangara, C. (1995).** Chlorophyll biosynthesis, The plant cell, 7, 1039–1057.

129. **Wang, P.; Yuan, Y.; Xu, K.; Zhong, H.; Yang, Y.; Jin, S.; Yang, K. & Qi, X. (2020).** Biological applications of copper-containing materials, *Bioactive materials*, 6(4), 916-927.
130. **Wettstein, D. (1957).** Chlorophyll letale und der submicroscopische formwechsel der plastiden, *Experimental cell research*, 12, 427-434.
131. **White, P. J. & Broadley, M. R. (2009).** Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine, *New phytologist*, 82, 49-84.
132. **White, P. J., & Broadley, M. R. (2003).** Calcium in plants, *Annals of botany*, 92(4), 487-511.
133. **Witkowski, M.; Hubert, J. & Mazur, A. (2011).** Methods of assessment of magnesium status in humans: A systematic review, *Magnesium research*, 24, 163-180.
134. **Xiong, Z. T. & Wang, H. (2005).** Copper toxicity and bioaccumulation in chinese cabbage (*Brassica pekinensis Rupr.*), *Environmental toxicology*, 20, 188-194.
135. **Yan, B. & Hou, Y. (2018).** Effect of soil magnesium on plants: a review, *IOP conference series: earth and environmental science*, 170, 8.
136. **Younus, H. (2018).** Therapeutic potentials of superoxide dismutase, *International journal of health sciences*, 12(3), 88-93.
137. **Yruela, I. (2009).** Copper in plants: acquisition, transport and interactions, *Functional plant biology: FPB*, 36(5), 409-430.
138. **Yruela I. (2005).** Copper in plants, *Brazilian journal of plant physiology*, 17, 145-156.
139. **Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi G.; Medici, S.; Peana, M. & Nurchi, V. M. (2019).** The essential metals for humans: a brief overview, *Journal of inorganic biochemistry*, 195, 120–129.

PRILOG

Tabela P1. Sadržaj metala (Ca i Mg, Cu i Zn) u listovima koprive uzorkovanim u sezoni jesen/proljeće. Rezultati su dati u mg/kg suvog lista koprive

Lokalitet koprive	Mjesec	Ca mg/kg	Mg mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	% Vlage
L1	Novembar	83494	18245	3,16	13,73	14,00
	Jun	42526	24251	7,56	18,33	13,20
L2	Novembar	65206	8925	4,52	17,04	12,00
	Jun	36105	30390	10,41	19,72	13,30
L3	Novembar	48849	5273	7,33	17,45	10,60
	Jun	61853	33767	10,42	15,43	13,10

Tabela P2. Sadržaj metala (Ca i Mg, Cu i Zn) u vodenom ekstraktu lista koprive uzorkovane u jesenjoj i proljećnoj sezoni. Rezultati su dati u mg/kg ekstrakta.

Lokalitet ekstrakta koprive	Mjesec	Ca mg/kg	Mg mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg
L1	Novembar	8600	7580	2,6	8,6
	Jun	4880	19520	2,34	3,04
L2	Novembar	14220	4220	3,2	11,2
	Jun	6032	20320	3,74	3,94
L3	Novembar	8780	2200	2,14	5,4
	Jun	7060	27200	1,82	2,26

Tabela P3. Sadržaj hlorofila *a*, *b* i *a+b* (mg/g) u listovima koprive uzorkovane na različitim lokalitetima Crne Gore (L1- L3) u različitim sezonama rasta jesen/proljeće

Hlorofil Lokalitet	<i>a</i> (jesen)	<i>b</i> (jesen)	<i>a+b</i> (jesen)	<i>a/b</i> (jesen)	<i>a</i> (proljeće)	<i>b</i> (proljeće)	<i>a+b</i> (proljeće)	<i>a/b</i> (proljeće)
L1	0,107	0,039	0,147	2,7	0,195	0,046	0,241	4,2
L2	0,196	0,093	0,289	2,11	0,171	0,049	0,219	3,5
L3	0,225	0,09	0,317	2,48	0,034	0,017	0,052	1,94

