

Određivanje profila masnih kiselina, udjela ukupnih polifenola i antiradikalne aktivnosti morskih organizama *Petrosia ficiformis* i *Bugula neritina*

Miličević, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:388501>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Iva Miličević

**ODREĐIVANJE PROFILA MASNIH KISELINA, UDJELA UKUPNIH
POLIFENOLA I ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI MORSKIH
ORGANIZAMA *Petrosia ficiformis* i *Bugula neritina***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za kakvoću hrane
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kontrola kakvoće hrane
Tema rada je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 28. travnja 2022.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Flanjak
Komentor: prof. dr. sc. Stela Jokić
Pomoć pri izradi: dr. sc. Ana-Marija Cikoš

Određivanje profila masnih kiselina, udjela ukupnih polifenola i antiradikalne aktivnosti morskih organizama *Petrosia ficiformis* i *Bugula neritina*
Iva Miličević, 0113141933

Sažetak:

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti profil masnih kiselina, udio ukupnih polifenola i antiradikalnu aktivnost morskih organizama Jadranskog mora, spužve *Petrosia ficiformis* (izronjena kod poluotoka Rtina kod Paškog mosta) i mahovnjaka *Bugula neritina* (izronjen u uvali Luka, Dugi otok). Za ekstrakciju lipida korištena je metoda po Folch-u, a za identifikaciju masnih kiselina korištena je plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom. Ukupni polifenoli su ekstrahirani primjenom ultrazvuka, te je određen udio polifenola spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa. DPPH metodom je određena antiradikalna aktivnost. Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da su u *P. ficiformis* najzastupljeniji *cis*- i *trans*- izomeri oleinske kiseline ($25,34 \pm 0,26$ %), a u *B. neritina* dominira palmitinska kiselina ($48,38 \pm 0,44$ %). Također je uočeno da *P. ficiformis* ($72,19 \mu\text{g GAE/mL}$) ima veći udio ukupnih polifenola, nego *B. neritina* ($59,01 \mu\text{g GAE/mL}$). Određivanjem antiradikalne aktivnosti ultrazvučnom ekstrakcijom, na 30°C su dobivene najveće vrijednosti za *P.ficiformis* ($93,57 \pm 0,70$ % DPPH) i za *B.neritina* ($93,65 \pm 0,51$ % DPPH). Povećanjem temperature smanjivala se antiradikalna aktivnost za oba uzorka.

Ključne riječi: *Petrosia ficiformis*, *Bugula neritina*, masne kiseline, ukupni polifenoli, antiradikalna aktivnost

Rad sadrži: 40 stranice
6 slika
9 tablica
38 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. doc. dr. sc. Krunoslav Aladić	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Flanjak	član-mentor
3. prof. dr. sc. Stela Jokić	član-komentor
4. dr. sc. Blanka Bilić Rajs, poslijedoktorand	zamjena člana

Datum obrane: 20. prosinac 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Food Quality
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate university studies

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Food quality control

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 28, 2022.

Mentor: Ivana Flanjak, PhD, assoc. prof.

Co-mentor: Stela Jokić, PhD, full prof.

Technical assistance: Ana-Marija Cikoš, PhD

Determination of Fatty Acid Profile, Total Polyphenol Content and Antiradical Activity of Marine Organisms *Petrosia ficiformis* and *Bugula neritina*

Iva Miličević, 0113141933

Summary:

The aim of this study was to determine the profile of fatty acids, total polyphenol content and antiradical activity in marine organisms from the Adriatic Sea *Petrosia ficiformis* and *Bugula neritina*. The sponge *P. ficiformis* was surfaced near the Rtina peninsula near the Paški bridge, and the bryozoa *B. neritina* was surfaced in the Luka cove, Dugi otok. The Folch method was used for the extraction of total lipids, and gas chromatography with flame-ionization detector was used for fatty acid identification. Total polyphenols were extracted using ultrasound, and polyphenol content was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent. The antiradical activity was determined by the DPPH method. Based on the obtained results, it was determined that *cis*- and *trans*- isomers of oleic acid (25.34 ± 0.26 %) are the most abundant in the sponge *P. ficiformis*, and palmitic acid (48.38 ± 0.44 %) dominates in bryozoan *B. neritina*. It was also observed that *P. ficiformis* ($72.19 \mu\text{g GAE/mL}$) has a higher content of total polyphenols than *B. neritina* ($59.01 \mu\text{g GAE/mL}$). By determining the antiradical activity by ultrasonic extraction, the highest values were obtained at 30°C for *P. ficiformis* (93.57 ± 0.70 % DPPH) and for *B. neritina* (93.65 ± 0.51 % DPPH). Increasing the temperature decreased the antiradical activity for both samples.

Key words: *Petrosia ficiformis*, *Bugula neritina*, fatty acids, total polyphenols, antiradical activity

Thesis contains: 40 pages
6 figures
9 tables
38 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|---------------|
| 1. Krunoslav Aladić, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Ivana Flanjak, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. Stela Jokić, PhD, full prof. | co-supervisor |
| 4. Blanka Bilić Rajs, PhD, postdoc. | stand-in |

Defense date: December 20, 2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Iskreno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak i dr. sc. Ana-Mariji Cikoš na nesebičnoj pomoći, strpljenju, pristupačnosti i ljubaznosti tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem i prof. dr. sc. Stela Jokić na pomoći oko završne ispravke rada i veselom duhu kojeg je dijelila sa nama studentima tijekom cijelog studiranja.

Veliko hvala dr. sc. Ana-Mariji Cikoš i dipl. ing. Katarini Gal na suradnji prilikom izvođenja eksperimenata i stvaranju ugodne i nasmijane radne atmosfere u laboratoriju.

Od srca hvala mojim dragim prijateljima i kolegama koji su razdoblje studiranja olakšali svojim razumijevanjem i podrškom.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima koji su imali beskonačno strpljenje i razumijevanje tijekom cijelog perioda moga studiranja, hvala Vam za ljubav i podršku koju ste mi nesebično davali. Također posebno hvala mom dečku i sestrama bez kojih život ne bi bio isti.



**BIOPROSPECTING
JADRANSKOG MORA**

Projekt sufinancira Europska unija iz
Europskog fonda za regionalni razvoj



Republika Hrvatska
Ministarstvo znanosti i
obrazovanja



Europska unija
Zajedno do fondova EU



Republika Hrvatska
Ministarstvo regionalnoga razvoja
i fondova Europske unije



**EUROPSKI STRUKTURNI
I INVESTICIJSKI FONDovi**

Operativni program
**KONKURENTNOST
I KOHEZIJA**

*Ovo istraživanje je provedeno u okviru znanstvenog Centra izvrsnosti za bioprospecting
Jadranskog mora (BioProCro) na projektu BioProspecting Jadranskog mora
(KK.01.1.1.01.0002) financiranog sredstvima Europske unije.*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Morski organizmi	4
2.1.1. Spužve	6
2.1.2. Mahovnjaci	9
2.2. Kemijski sastav morskih spužvi	12
2.3. Kemijski sastav mahovnjaka	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Zadatak rada	16
3.2. Materijali	16
3.2.1. Uzorci morskih organizama	16
3.2.2. Kemikalije	16
3.2.3. Oprema	17
3.3. Metode	17
3.3.1. Priprema uzoraka	17
3.3.2. Ekstrakcija ukupnih lipida metodom po Folch-u	18
3.3.3. Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina metodom plinske kromatografije s plameno- ionizacijskih detektorom (GC-FID)	19
3.3.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)	20
3.3.5. Određivanje ukupnih polifenola	20
3.3.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti	20
3.3.7. Izračun nutritivnih indeksa	21
4. REZULTATI	24
4.1. GC-FID analiza sastava masnih kiselina spužve <i>Petrosia ficiformis</i>	25
4.2. GC-FID analiza sastava masnih kiselina mahovnjaka <i>Bugula neritina</i>	26
4.3. Određivanje ukupnih fenola u morskim organizmima	26
4.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti u morskim organizmima	27
5. RASPRAVA	28
5.1. Sastav masnih kiselina spužve <i>Petrosia ficiformis</i>	29
5.2. Sastav masnih kiselina mahovnjaka <i>Bugula neritina</i>	31
5.3. Ukupni fenoli u <i>Petrosia ficiformis</i> i <i>Bugula neritina</i>	32
5.4. Antiradikalna aktivnost morskih organizama <i>Petrosia ficiformis</i> i <i>Bugula neritina</i>	33
6. ZAKLJUČCI	34
7. LITERATURA	36

Popis oznaka, kratica i simbola

A.	<i>Acanthella</i>
B.	<i>Bugula</i>
C.	<i>Candidatus</i>
C14:0	miristinska kiselina (engl. myristic acid)
C14:1	miristoleinska kiselina (engl. myristoleic acid)
C15:0	pentadekanska kiselina (engl. pentadecanoic acid)
C15:1	<i>cis</i> -10-pentadekanska kiselina (engl. <i>cis</i> -10-pentadecenoic acid)
C16:0	palmitinska kiselina (engl. palmitic acid)
C16:1	palmitoleinska kiselina (engl. palmitoleic acid)
C17:0	heptadekanska kiselina (engl. heptadecanoic acid)
C17:1	<i>cis</i> -10-heptadekanska kiselina (engl. <i>cis</i> -10-heptadecenoic acid)
C18:0	stearinska kiselina (engl. stearic acid)
C18:1n9c	oleinska kiselina (engl. oleic acid)
C18:1n9t	elaidična kiselina (engl. elaidic acid)
C18:2n6c	<i>cis</i> -linolna kiselina (engl. <i>cis</i> -linoleic acid)
C20:0	arahidska kiselina (engl. arachidic acid)
C20:1	<i>cis</i> -11-eikosenska kiselina (engl. <i>cis</i> -11-eicosenoic acid)
C22:0	behenska kiselina (engl. behenic acid)
C22:1n9	eručna kiselina (engl. erucic acid)
COOH	karboksilna skupina (engl. carboxyl group)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
E.	<i>Endobugula</i>
F.	<i>Flustra</i>

FA	masne kiseline (engl. fatty acid)
FAME	metilni esteri masnih kiselina (engl. fatty acid methyl esters)
G.	<i>Gongolaria</i>
GAE	ekvivalent galne kiseline (engl. gallic acid equivalent)
GC-FID	plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. gas chromatography with flame ionization detector)
HH	hipokolesterolemijski/ hiperkolesterolemijski omjer (engl. hypocholesterolemic/ hypercholesterolemic ratio)
IA	aterogeni indeks (engl. index of atherogenicity)
IT	trombogeni indeks (engl. index of thrombogenicity)
IU	indeks nezasićenosti (engl. unsaturation index)
MUFA	mononezasićene masne kiseline (enlg. monounsaturated fatty acids)
P.	<i>Petrosia</i>
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acids)
PUFA/SFA	omjer polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acid/ saturated fatty acid ratio)
SD	standardna devijacija (engl. standard deviation)
SFA	zasićene masne kiseline (engl. saturated fatty acids)
SV	srednja vrijednost (engl. average value)
UAE	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. ultrasound assisted extraction)
UFA	nezasićene masne kiseline (engl. unsaturated fatty acids)
n-3	omega-3
n-6	omega-6

1. UVOD

Voda zauzima 70,8 % Zemljine površine što čini morske i vodene organizme najrasprostranjenijim organizmima na svijetu. U zadnjem desetljeću morski organizmi su počeli privlačiti veliku pozornost te se otkrio niz vrijednih komponenata koje sadrže, a koje se mogu koristiti u proizvodnji hrane (funkcionalna hrana), kozmetike i lijekova. Spojevi izolirani iz morskih organizama pokazuju višestruku bioaktivnost, kao što je antioksidativno, antidijabetičko, antitumorsko, antivirusno, antiparazitsko, antimikrobno, antifugalno, antibakterijsko i protuupalno djelovanje. Bioaktivne molekule pojavljuju su u gotovo svim morskim organizmima, koje sintetizira sam organizam ili ga proizvodi simbiotski mikroorganizam. Koncentracija bioaktivnih spojeva ovisi o vrsti organizma, uvjetima okoliša te o vrsti ekstrakcije (Jerković i sur., 2019). Neke od najznačajnijih vrsta bioaktivnih spojeva koji se mogu ekstrahirati iz morskih organizama su fenoli, pigmenti, lipidi, proteini, polisaharidi i masne kiseline (Stengel i Connan, 2015). Zbog bogatstva komponenti koje se mogu izolirati iz morskih organizama, oni su postali izvor bioaktivnih spojeva koji se mogu primjenjivati u prehrani. Morska se hrana smatra izvorom proteina izvrsne kvalitete kao i lipida bogatih nezasićenim masnim kiselinama. Nutritivna važnost lipida je u tome što lipidi iz hrane poboljšavaju okus i teksturu, te ljudskom organizmu omogućuju normalnu funkciju. Oni također pružaju izvor vitamina topivih u mastima (A, D, E i K) i pomažu olakšati probavu i apsorpciju tih vitamina (Mishra i sur., 2015). Tehnike koje se koriste za kvantifikaciju i identifikaciju bioaktivnih komponenata su visokosofisticirane kao što je plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) koja je korištena tijekom izrade ovog rada.

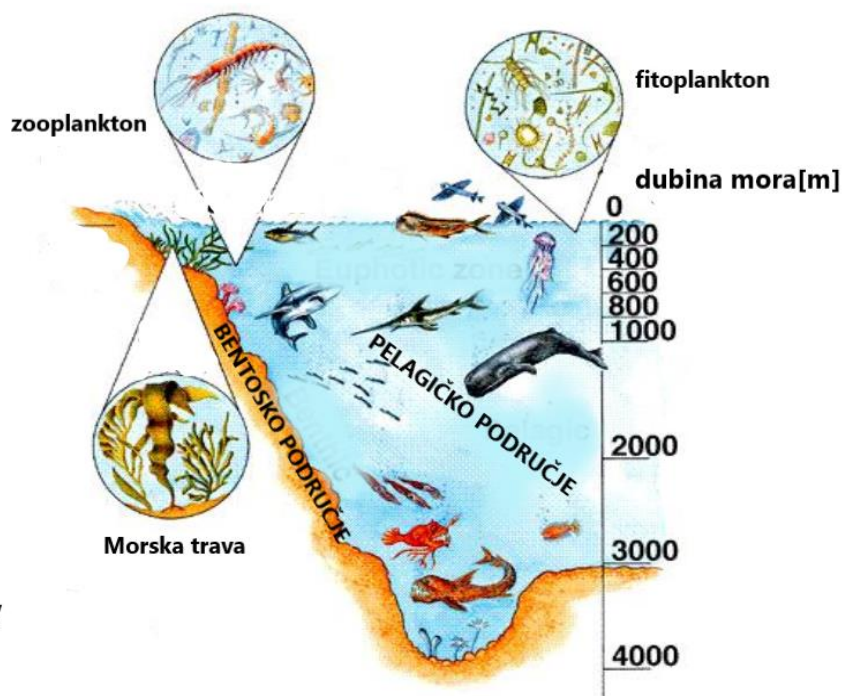
Cilj ovog rada je određivanje profila masnih kiselina, udio ukupnih polifenola i antiradikalne aktivnosti do sada neistraženih morskih organizama iz Jadranskog mora; spužve *Petrosia ficiformis* i mahovnjaka *Bugula neritina*. Na temelju sastava masnih kiselina iz odabranih morskih organizama izračunati su nutritivni indeksi omjer polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina (PUFA/SFA), aterogeni indeks (IA), trombogeni indeks (IT), hipokolesterolemijski/hiperkolesterolemijski omjer (HH) i indeks nezasićenosti (IU).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Morski organizmi

Morski ekosustav dijeli se na dvije glavne zone, zona morske pučine, odnosno slobodne vode koje nazivamo pelagičko područje i bentosko područje koje se odnosi na morsko dno. Morski organizmi nastanjuju obje zone, ovisno o vrsti morskog dna i dubini vode kako je prikazano na **Slici 1**. Unutar bentoskog i pelagičkog područja postoji široka raznolikost tipova staništa od tropskih do polarnih geografskih širina, koji sežu od otvorenih oceanskih površinskih voda do goleme ravnice muljevutih sedimenata na dnu dubokog mora. Unutar oceana, glavne varijable koje ograničavaju distribuciju organizama uključuju izloženost plimi, temperaturu, salinitet, kisik, dostupnost svjetla, produktivnost, biotičke interakcije i tlak. Ne igraju sve varijable istu ulogu u različitim okruženjima, ali ukupni zbroj njihove interakcije određuje biološki obrazac u oceanima. Život u bentoskom području vrlo je različit od pelagičkog, mnogi bentoski organizmi imaju ili ograničenu pokretljivost ili jesu potpuno sjedeći, kao npr. spužve i mahovnjaci. Velik dio procesa njihovog širenja odvija se u stadiju ličinke. Priroda morskog dna kritičan je čimbenik u određivanju vrsta koje na njemu žive. Vrste koje se vežu za kamenitu podlogu rijetko se pojavljuju u sedimentima, a vrste koje se javljaju u pijesku obično su relativno rijetke u mulju (Snelgrove, 2001).

Morski ekosustav



Slika 1. Podjela morskog ekosustava

(Web izvor 1)

Morski organizmi doprinose mnogim kritičnim procesima koji imaju izravne i neizravne učinke na zdravlje oceana i ljudi. Ono što je očito je da postoje specifične vrste i funkcionalne skupine koje igraju vrlo važnu ulogu u važnim procesima ekosustava, a gubitak tih vrsta može imati značajne posljedice za cijeli ekosustav. Oceani predstavljaju skup jedinstvenih uvjeta za razvoj života, u smislu razlika u tlaku, salinitetu, svjetlosti i temperaturi, što je omogućilo spontanu pojavu jedinstvenih vrsta biološki aktivnih spojeva. Morski ekosustavi obilježeni su neprijateljskim uvjetima za rast i razvoj mikroorganizama, biljaka i životinja. U tim okolnostima, postoji visok stupanj kompetitivnosti i antagonizma između različitih vrsta te zbog toga, spojevi izolirani iz morskih organizama pokazuju višestruku bioaktivnost. Morski okoliš je relativno neistražen izvor funkcionalnih sastojaka koji se mogu koristiti u preradi, skladištenju i obogaćivanju hrane na razne načine. Morski mikroorganizmi su izvor novih bioaktivnih spojeva s potencijalnom koristi za ljudsko zdravlje. Do sada je izolirano nekoliko mikroorganizama (gljive, bakterije i mikroalge) koji proizvode antioksidativne, antibakterijske, antitumorske i antivirusne spojeve (Stengel i Connan, 2015). Proteini izolirani iz morskih organizama imaju potencijal primjene kao funkcionalne komponente u hrani zbog svojih višestrukih i osebujnih svojstava uključujući i antibakterijsko djelovanje, sposobnost pjenjenja i sposobnost stvaranja gela. Morski organizmi imaju veliki potencijal u proizvodnji funkcionalne hrane. Funkcionalni prehrambeni proizvodi opisuju se kao oni koji služe ne samo da se zadovolji glad, nego i za prevenciju raznih kroničnih bolesti poput osteoporoze, Alzheimerove bolesti kao i za jačanje imunološkog sustava, te općenito poboljšavaju tjelesno i emocionalno blagostanje. Prirodni spojevi dobiveni iz morskih beskralježnjaka i algi dali su značajan doprinos suvremenoj medicini. Snažni antioksidansi poput karotenoida i fenolnih spojeva mogu pronaći u rakovima i morskim algama. Morske alge se istražuju kao izvrstan izvor antioksidanasa. Proizvodi dobiveni preradom ribe i morskih plodova obećavajući su izvor prvenstveno n-3 masnih kiselina, vitamina A, D i E, peptida, hitina i enzima (Bayona i sur., 2022). Jedna od skupina komponenata koje se spominju u mnogim istraživanjima su i masne kiseline. Masne kiseline (FA) su metaboliti prisutni u svim organizama, a opće je poznato da su morski organizmi (pogotovo riba) bogati raznim masnim kiselinama. Karakterizirane su prisutnošću karboksilne skupine (-COOH) na jednom kraju lanca i metilne skupine na drugom kraju. Molekule FA obično su spojene u skupinama po tri, tvoreći molekulu triglicerida. Kao važan izvor energije, FA igraju nekoliko bioloških uloga u tijelu. U odsutnosti glukoze tijelo koristi FA za

dobivanje energije u stanicama. FA su potrebne za izgradnju stanične membrane, prijenos signala, pravilan rast i razvoj organizma. FA sudjeluju u regulaciji kolesterola, biosintezi masnih kiselina, te imaju utjecaj na stanične aktivnosti i transportne procese među stanicama. Posjeduju antitumorsko, antibakterijsko, antifungalno, antidijabetičko i protuupalno djelovanje. Veliki broj derivata FA koristi se u kozmetici. Stearinska kiselina, oleinska kiselina, laurinska kiselina, palmitinska kiselina i miristinska kiselina koriste se u raznim kozmetičkim kremama, sapunima i pastama (Mishra i sur., 2015). Svi navedeni spojevi se mogu ekstrahirati raznim konvencionalnim metodama i novijim metodama koje se još nazivaju i zelene tehnike, koristi se sve više zelena otapala, ekstrakcija se provodi kraće vrijeme na nižim temperaturama i ekološki su prihvatljivije. Ove metode imaju bolju selektivnost za izolaciju željenih spojeva. Stoga, vrlo je važno i potrebno pronaći najučinkovitiju metodu ekstrakcije. Novije metode ekstrakcije koje se koriste su:

- ekstrakcija superkritičnim fluidima,
- ekstrakcija subkritičnom vodom,
- ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom,
- ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.

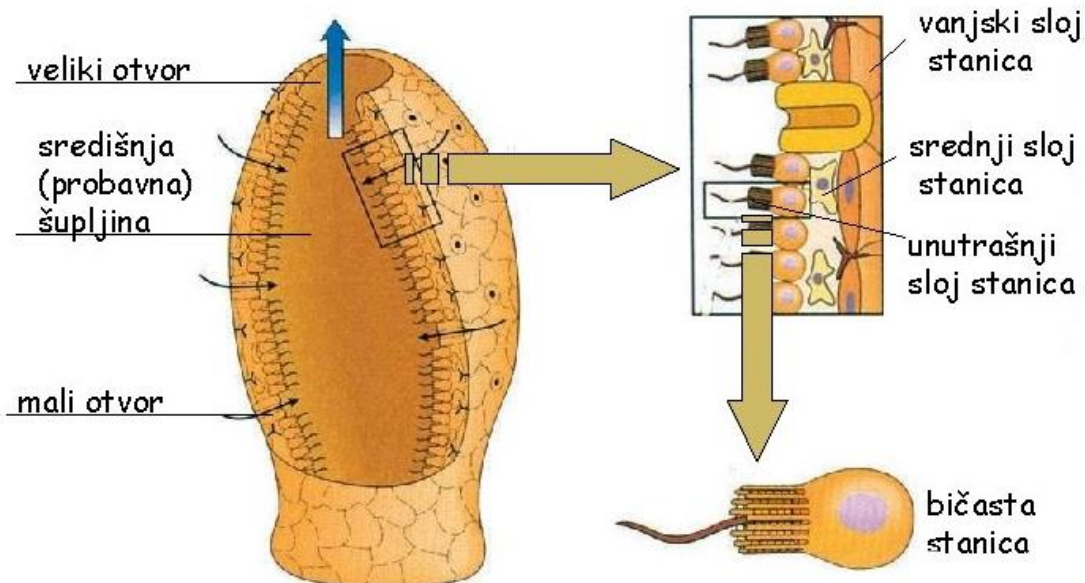
Potrebno je ispitati sve procesne parametre svakog postupka ekstrakcije kako bi se dobio pravi uvid u učinak pojedine metode na sadržaj bioaktivnih spojeva u dobivenim ekstraktima (Cikoš i sur., 2018).

2.1.1. Spužve

Morske spužve (*Porifera*) su višestanični beskralježnjaci koji su dio morskog ekosustava već milijunima godina. Građa tijela spužve je prikazana na **Slici 2.** te je vrlo jednostavna jer nemaju organe. Njihova građa tijela većinom ovisi od podloge na koju su pričvršćene, odnosno tipu morskog dna. Tijelo spužve je građeno od spikula (iglice) od kalcijevog karbonata, silicija i proteina koji se zove spongin. Identifikacija i vrsta spužvi se temelji na obliku i veličini spikula, te s obzirom na to dijele se u 3 grupe:

- Askonski tip spužve,
- Sikonski tip spužve,

- Leukonski tip spužve.



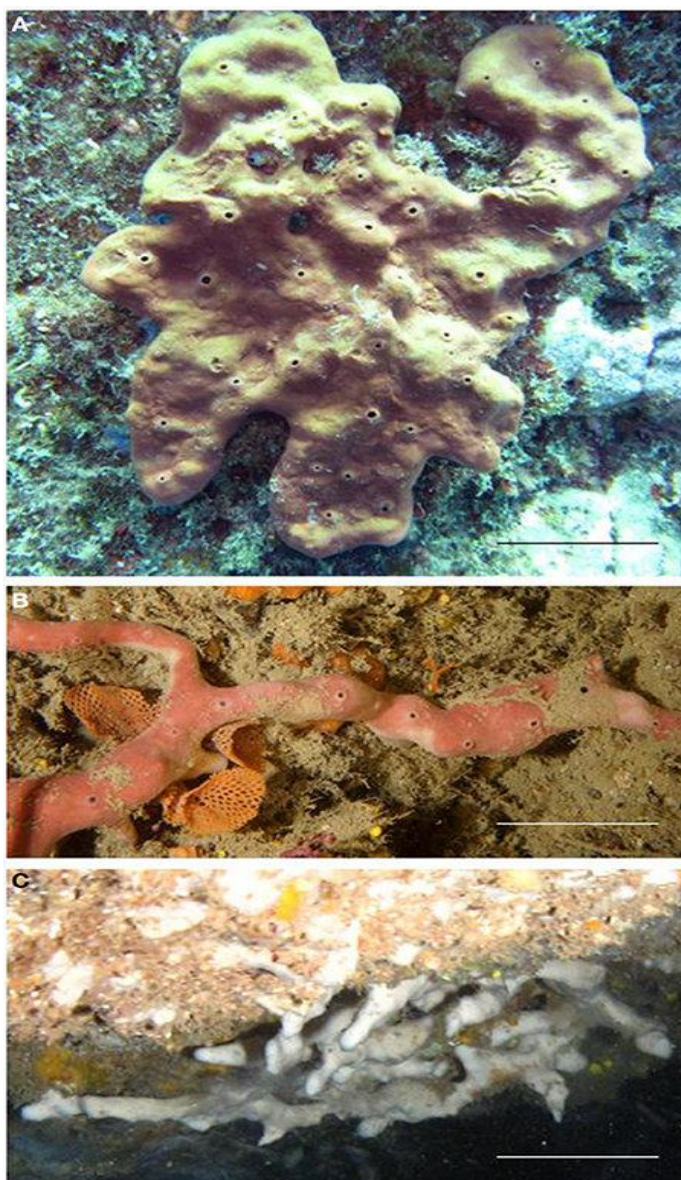
Slika 2. Građa tijela spužve

(Web izvor 2)

Rast i razvoj spužvi ovisi od morskih struja jer im one donose sve potrebne hranjive tvari, kisik i spolne stanice, te odnose sve otpadne tvari. Život morske spužve je podijeljen u dva ciklusa, u prvom ciklusu se oslobađa ličinka iz ženske spužve u vodu koja se kasnije pričvrsti za odgovarajuću podlogu i postaje nepokretna odrasla jedinka i tu započinje drugi ciklus života spužve. Spužva preko malih otvora prima vodu koja se profiltrira (probavlja) u središnjoj šupljini te kroz veliki otvor profiltrirana voda s otpadnih tvarima napušta spužvu (Varijakzhan i sur., 2021). Do danas je poznato više od 8000 vrsta spužvi koje nastanjuju bentosko područje morskog ekosustava, te se često mogu naći da žive u simbiozi s nekim drugim morskim organizmima (Anjum i sur., 2016). Spužve su nepomične i s obzirom na to da su mekani i osjetljivi organizmi te se ne mogu fizički obraniti, razvili su kemijsku obranu od opasnosti. Spužve sadrže mnoge bioaktivne sastojke kao što su aminokiseline, peptidi, alkaloidi, steroli, terpeni, masne kiseline, peroksidi itd. Svake godine se oko 5300 različitih spojeva izolira iz spužvi, te se mnogi izolirani spojevi koriste u medicini i farmaceutskoj industriji. Zbog svojih antitumorskih, protuupalnih, antivirusnih i drugih svojstava koje pogoduju ljudskom zdravlju spužve se koriste u medicini, u kliničkim istraživanjima protiv raka, raznih mikrobnih infekcija i upala (Bary i sur., 2016). Morski organizmi su veliki izvor za sintezu novih molekula koje još

treba istražiti, tako da se spužve sve više istražuju i proučavaju. Do danas je oko 11 rodova spužva otkriveno da posjeduju bioaktivne sastojke, od kojih je i rod *Petrosia* koji se koristio tijekom izrade ovog rada (Varijakzhan i sur., 2021).

Petrosia ficiformis (Poiret, 1789) je vrsta spuže koja se nastanjuje u Sredozemlju i istočnom Atlantiku. Predstavlja jednu od 15 000 vrsta spužva koje većinom žive u morskom okolišu. Ovaj tip spužve karakterizira vrlo jednostavna struktura i organizacija tkiva. Većina stanica je organizirana da tvori vanjski i unutarnji pokrovni sloj. Vanjski sloj pokrovnih stanica se sastoji od spljoštenih stanica koje se preklapaju, dok se unutarnji sloj pokrovnih stanica sastoji od bičastih stanica koje su odgovorne za strujanje vode unutar spužve. Karakteristika svih stanica u spužvi je da mogu radikalno mijenjati oblik i funkciju (Dini i sur., 2007). Veličina spužvi ovisi o količini svjetlosti kojoj su izložene, veći primjerci se mogu naći na svijetlu nego u mračnim špiljama (Frenk i sur., 2014). *P. ficiformis* dio je istraživanja Burgsdorf i sur. (2014) o kemijskom sastavu spužvi, simbiotskog života s cijanobakterijama te molekularnog mehanizma međudjelovanja između spužve kao domaćina i cijanobakterija. *P. ficiformis* pojavljuje se u dvije različite morfologije kako je prikazano na **Slici 3**. Prvi oblik je ljubičasto pigmentiran, masivan te živi u osvijetljenim staništima u simbiozi s cijanobakterijama, dok drugi oblik se pojavljuje u manje osvijetljenim staništima ružičaste boje ili u tamnim špiljama bijele boje i u manjoj koncentraciji se pojavljuju cijanobakterije kao simbionti. *P. ficiformis* mijenja svoju morfologiju ovisno o prisutnosti cijanobakterija. Prema Burgsdorf i sur. (2014) razlika je uočena i u prisutnosti inhalacijskih pora na površini spužve. *P. ficiformis* koja se nalazi na liticama velike rijetko imaju inhalacijske pore, dok one u dubinama i špiljama imaju više inhalacijskih pora koje pomažu kod prehrane spužve.

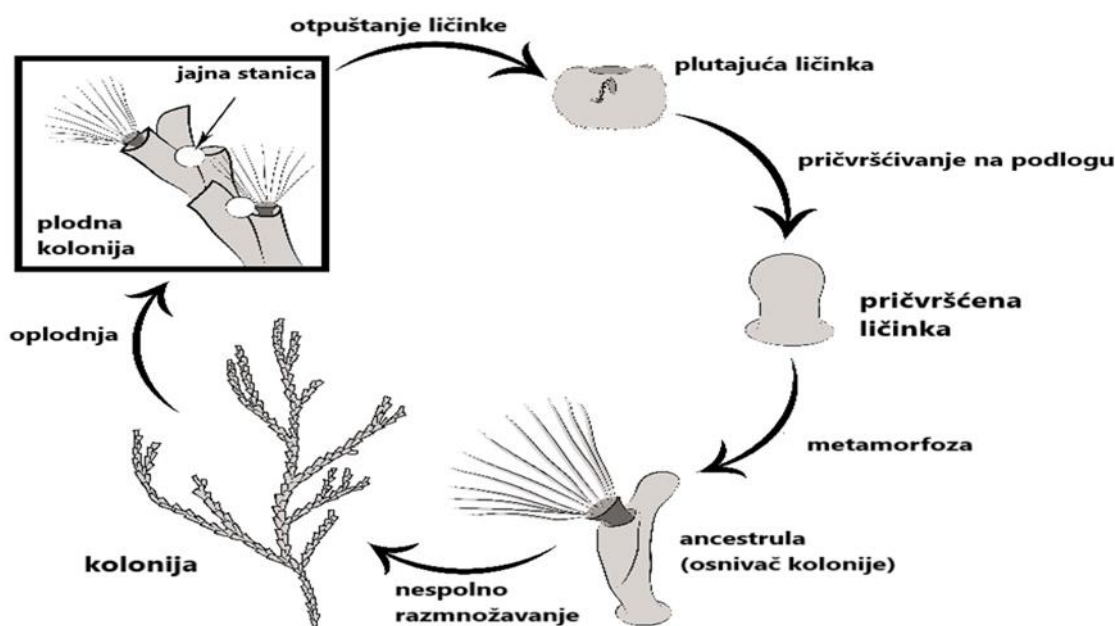


Slika 3. Primjerci *P. ficiformis* u tri oblika: (A) masivni ljubičasti tip koji živi u osvijetljenim područjima; (B, C) puzajući tip s ružičastom i bijelom bojom, životom u uvjetima slabog svjetla i tame (Burgsdorf i sur., 2014)

2.1.2. Mahovnjaci

Mahovnjaci (*Bryozoa*) su beskralježnjaci koje možemo pronaći i u morskim i slatkim vodama. Do danas je opisano više od 8000 vrsta mahovnjaka, dok je samo mali dio njih istražen, te zbog toga mahovnjaci predstavljaju veliki izvor za otkrivanje novih spojeva. Mahovnjaci rastu na svim vrstama morskih podloga, mogu se naći i na olupinama brodova na morskom dnu (Sharp i sur., 2007). Najčešće ih možemo vidjeti u obliku kolonija koje se razvijaju pupanjem zoida.

Osnovna jedinica kolonije mahovnjaka čini zooid, to je jedinka koja komunicira s ostalim jedinkama u koloniji. Svaka jedinka u koloniji obavlja neku funkciju, te zbog toga postoje različite vrste zooida. U svakoj koloniji postoje zooidi koji su odgovorni za razmnožavanje, hranjenje, čišćenje te oni koji koloniju pričvršćuju za podlogu. Mahovnjaci se razvijaju kao želatinozne, vapnenaste ili koraste prevlake, te rastu u različitim oblicima, u obliku dugih razgranatih lanaca, grmaste ili spiralne (Ciavatta i sur., 2020). Morski mahovnjaci dijele se u tri reda: *Cheilostomatida*, *Ctenostomatida* i *Cyclostomatida*. Mahovnjaci se mogu razmnožavati spolno i nespolno, te se tako i njihov životni ciklus može podijeliti na spolnu i nespolnu fazu života (Kobetić, 2009). Na **Slici 4.** je shematski prikazan životni ciklus *Bugula neritina* koji je korišten u ovom radu. Nakon oplodnje embriji leže u jajnim stanicama dok se ne oslobode kao ličinke koje plutaju po vodi. Ličinka pluta po vodi dok se ne pričvrsti na podlogu i metamorfozira u zooid osnivač kolonije (ancestrula).



Slika 4. Shematski prikaz životnog ciklusa *Bugula neritina*. (Ciavatta i sur., 2020)

Slijedni nespolna faza života kada se kreće rast kolonije, dok opet ne dođe do oplodnje jajnih stanica (Ciavatta i sur., 2020). Posljednjih nekoliko godina dokazano je da su mahovnjaci dobri indikatori zagađenja i onečišćenja mora. Najčešća staništa mahovnjaka su uski morski prolazi, zaštićeni od valova, ali s jakim strujama koje donose mnoštvo hrane. Predatori mahovnjaka su morski ježinci, mekušci i goli puževi (Kobetić, 2009).

Bugula neritina (Linnaeus, 1758) je vrsta mahovnjaka koja živi u koloniji koja se obično pojavljuje u crveno-ljubičastoj ili ljubičasto-smeđoj boji, ponekad i u tamnocrvenoj boji. Primjer kolonije u ljubičasto-smeđoj boji je prikazan na **Slici 5**.



Slika 5. Kolonija *Bugula neritina* u ljubičasto-smeđoj boji

(Web izvor 3)

Istraživanjima na *B. neritina* dokazano je da se od opasnosti brani kemijskim spojevima zvanim briostatini. Briostatini su složeni poliketidi čije je antikancerogeno djelovanje prvi puta otkriveno 1970. godine. Istraživanjem je otkriveno da zapravo organizam koji živi u simbiozi s *B. neritina* proizvodi ove spojeve. Ove nalaze je potvrdilo istraživanje Ciavatta i sur. (2020) kojim se otkrilo da proteobakterija *Candidatus Endobugla sertula* proizvodi briostatine koji su pronađeni u *B. neritina*. Kada je prvi puta izoliran pokazalo se da briostatin-1 pokazuje visoke razine citotoksične aktivnosti protiv limfocitne leukemije i melanoma. Također je poznato da briostatin simulira proizvodnju proteina kinaze koji potiče normalan rast stanica i koštane srži. *B. neritina* sadrži vrlo male količine briostatina te je prikupljanje i izolacija ovog spoja jako zahtjevna i skupa (Sharp i sur., 2007).

2.2. Kemijski sastav morskih spužvi

Morski okoliš bogat je raznolikim morskim organizmima pa su tako i razni spojevi izolirani iz tih organizama. Sve se više istražuju, ali je nemoguće znati koliko još spojeva i organizama ostaje neotkriveno i neistraženo. Prema Ebada i Proksch (2012) neki od važnijih grupa spojeva koji se pojavljuju u spužvama su alkaloidi, peptidi i terpeni, te su u ovom radu opisana njihova biološka i ljekovita svojstva. Alkaloidi su jedni od najvažniji spojeva izoliranih iz spužvi koji imaju ljekovita svojstva od davnina. Alkaloidi podrijetlom iz mora imaju posebnu važnost za otkrivanje novih lijekova, poput lijeka protiv tumora Yondelis (ET-743). Najčešće vrste alkaloida u spužvama su manzamini, brompiroli i spojevi izvedeni iz bromtirozina. Manzamin A najpoznatiji iz skupine manzamina, oroidin koji je prekursor svih brompirol alkaloida, te aeroplizinin-1, prvi alkaloidni spoj izveden iz bromtirozina. Peptidi izolirani iz morskih organizama su često ciklički ili linearni peptidi koji sadrže aminokiseline koje su rijetke ili se uopće ne mogu pronaći u kopnenim organizmima. Diskodermin A je prvi bioaktivni peptid izoliran iz morske spuže *Discodermia kiiensis* u Japanu. Daljnjim istraživanjem izolirano je više vrsta diskodermina, od A do H, te se pokazalo da imaju antibakterijsko djelovanje. Kasnije je otkriveno da su moćni inhibitori fosfolipaze i da inhibiraju aktivnost okadaične kiseline koja potiče rast tumora. Jedna od skupina spojeva koja se također mogu pronaći u spužvama su terpeni, a predstavljaju hlapljive nezasićene ugljikovodike ugodna mirisa te se sastoje od izoprenskih građevnih jedinica. Strukturna modifikacija izoprenskih jedinica dovodi do raznolikosti terpena i do raznolikosti njihovih svojstava. Steroidni terpeni su bili prvi morski izopreni koje je otkrio Bergamanna tijekom 1930-ih, 1940-ih godina. Dvije glavne klase terpena izolirane iz morskih spužvi su sesterterpenoidi (C25) i triterpenoidi (C30) (Ebada i Proksch, 2012). Spužve su predstavnici morskih organizama što se tiče raznolikosti masnih kiselina. Do sada je u spužvama pronađeno oko 400 različitih masnih kiselina koje imaju 12-32 ugljikovih atoma u svom lancu. Među njima je bilo masnih kiselina razne strukture, nerazgranati, razgranati lanci, s jednom ili više grana u sredini masne kiseline, s različitim dodatnim funkcionalnim skupinama. U spužvama postoje rijetke i neobične strukture masnih kiselina i sterola. Spužve često žive u simbiozi s drugim morskih organizmima kao što su arhabakterije, bakterije, mikroalge, gljivice, protozoe, te neke od masnih kiselina mogu pripadati podrijetlom iz simbiotskih organizama (Rod'kina, 2005). Nadalje, istraživanjem koje je proveo Carballeira (1993) otkriveno je da su fosfolipidi s bromiranim masnim kiselinama

rijetki u prirodi. U samo dva izvješća dokumentirane su fosfolipidne bromirane masne kiseline koje se pojavljuju u prirodi, oba slučaja su vezana za spužve, jedan slučaj je vezan za *P. ficiformis*. Spužve roda *Petrosia* nastanjuju različite regije i sadrže niz biološki aktivnih prirodnih spojeva kao što su poliacetileni, steroli, terpeni i alkaloidi. Lee i sur. (2021) dali su pregled kemijskih spojeva iz spužve roda *Petrosia*. Opisane su glavne skupine metabolita, te je dokazano da su poliacetileni najdominantniji metaboliti u spužvama *Petrosia* koje nastanjuju mora i oceane umjerene regije. U tropskim morima i oceanima *Petrosia* je izvor veće raznolikosti metabolita kao što su terpeni, steroli, poliacetileni i alkaloidi. Zaključak navedenog istraživanja je da geografski položaj je jedan od najutjecajnijih čimbenika povezanih s varijacijama metabolita spužve. Spužve predstavljaju jedan od najbogatijih izvora prirodnih antioksidanasa i antimikrobnih sredstava. Antioksidansi su spojevi ili sustavi koji odgađaju autooksidaciju inhibicijom stvaranja slobodnih radikala koji imaju široku primjenu u medicini, kozmetici i prehrambenoj industriji. Ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanasa potrebna je za pravilnu fiziološku funkciju tijela. Antioksidansi imaju potencijalno pozitivan učinak za ljudsko zdravlje zbog svoje sposobnosti da inhibiraju reaktivne kisikove spojeve koji su štetni za tijelo čime sprječavaju oštećenje membranskih lipida, proteina i deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Antioksidativni kapacitet spojeva povezan je s prevencijom nekoliko bolesti, uključujući rak, koronarne bolesti, upalne poremećaje i neurološku degeneraciju. Antioksidativni lijekovi štite od oštećenja tkiva izazvanog slobodnim radikalima sprječavajući njihovo stvaranje, hvatajući ih i pospješujući njihovu razgradnju (Oogarah i sur., 2020). Prema istraživanju Oogarah i sur. (2020) DPPH metodom određena je antioksidativna aktivnost 46 vrsta spužvi koje su uzorkovane iz proučavanog područja Mauricijusa koji se nalazi u jugozapadnom Indijskom oceanu. DPPH metoda se temelji na smanjenju koncentracije slobodnog stabilnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila ljubičaste boje koji se nakon redukcije antioksidansom kojeg sadrži spužva pretvara u žuti produkt.

2.3. Kemijski sastav mahovnjaka

Iako oceani i mora pokrivaju više od 70 % Zemljine površine većina bioaktivnih metabolita izolirana je iz vrsta koje obitavaju na kopnu. Dobro je poznato da većina sesilnih morskih beskralježnjaka proizvodni bioaktivne sastojke raznih uloga i svojstava. Nedavni napredak u tehnologiji uzorkovanja i nove tehnike u sintezi i izolaciji lijekova je promoviralo otkrivanje i

istraživanje morskih organizama jer su se oni pokazali kao dobri izvori spojeva za borbu protiv raka. Mahovnjaci su vodeni beskralježnjaci koji se hrane filtracijom i poznati su po rastu u kolonijama i kalcificiranim skeletom. Mahovnjaci su malo istraženi i proučeni zbog poteškoća kod njihovog uzorkovanja. Izoliranje spojeva iz mahovnjaka je ponekad otežano zbog njihovog kalcificiranog skeleta. Mahovnjaci su odličan izvor alkaloida, poliketida, sterola, sfingolipida i drugih spojeva. Podrijetlo bioaktivnih spojeva u morskim organizmima je uglavnom nepoznato, iako se često pokazalo da su podrijetlom iz prehrane, biosinteze ili iz simbiotskih organizama (Figuerola i Avila, 2019). Primjer bioaktivnog sastojka iz simbiotskog organizma je biostatin koji je prvi izoliran iz *B. neritina* koja živi u simbiozi s proteobakterijom *C. E. sertula*. Biostatini su spojevi koji su otkriveni kao antitumorsko sredstvo i daju obećavajuće rezultate. Također je dokazano i da pozitivno utječu na pamćenje i učenje, pa tako mogu pomoći i u liječenju Alzheimerera, depresije i raznih ozljeda mozga (Figuerola i Avila, 2019). Najčešći prirodni sastojci izolirani iz mahovnjaka su alkaloidi raznovrsne strukture i svojstava. Mogu se podijeliti u 4 glavne vrste:

1. β -feniletilamin alkaloidi,
2. indol alkaloidi,
3. β -feniletilamin alkaloidi,
4. pirol alkaloidi.

Alkaloidi su prirodni spojevi s dušikom, lužnati su te imaju izraziti farmakološki učinak. Najčešće su alkaloidi sekundarni metaboliti nastali u morskim organizmima. Osim toga, druge vrste alkaloida koje se nalaze u mahovnjacima supiridin, indolizin, kinolin, izokinolin, kinolinon, kinonmetid, β -karbolin i 2,6-naftiridin (Ciavatta i sur., 2020). Više od 100 masnih kiselina je izolirano iz prirodnih izvora, pa tako i iz morskih organizama. Postoje izvještaji o lipidnim komponentama nekoliko vrsta mahovnjaka. Radi se o pronalasku novih masnih aldehida, fosfolipida, masnih kiselina i njihovog sastava u mahovnjaku roda *Flustra* (Demidkova, 2010). Mahovnjaci u sebi sadrže mnoge bioaktivne spojeve kao što su makrociklički laktone, alkaloide, sfingolipide, sterole i aromatske spojeve sa sumporom. Struktura i raznolikost spojeva sekundarnih metabolita iz morskih mahovnjaka ukazalo je na mogućnost korištenja tih spojeva kao polazne točke za otkrića novih lijekova (Tian i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

- Metodom po Folch-u ekstrahirati ukupne lipide iz morskih organizama *Petrosia ficiformis* i *Bugula neritina* te odrediti sastav i udio masnih kiselina pomoću plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID);
- Ekstrahirati polifenole iz navedenih morskih organizama primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) te pomoću spektrofotometrijske metode uz pomoć Folin-Ciocalteuovog reagensa odrediti njihov udio;
- U dobivenim ekstraktima odrediti antiradikalnu aktivnost DPPH metodom;

3.2. Materijali

3.2.1. Uzorci morskih organizama

- *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758), izronjena je u uvali Luka, Dugi otok (43°58'55"N; 15°05'35"E) u studenom 2021. godine na dubini od 2 m, temperaturi mora 15 °C, temperaturi zraka 13 °C;
- *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789), izronjena je kod poluotoka Rtina kod Paškog mosta (44°19'10"N; 15°15'37"E) u svibnju 2021. godine, na dubini od 6 m, temperaturi mora 18 °C i temperaturi zraka 19 °C.

3.2.2. Kemikalije

- Za ekstrakciju ukupnih lipida korišteni su kloroform (p.a. čistoće, Carlo Erba Reagents, Francuska), metanol HPLC čistoće (J.T. Baker, Nizozemska) i 0,9 %-tna vodena otopina natrijevog klorida (Merck, Njemačka).
- Za pripremu metilnih estera masnih kiselina korišten je n-heptan čistoće 99% (Carlo Erba Reagents, Francuska) i 2 mol/L otopina kalijevog hidroksida u metanolu. Metilni esteri masnih kiselina C4-C24 korišteni za kvantifikaciju i identifikaciju masnih kiselina u morskim organizmima kupljeni su od tvrtke Supelco Co. (Bellefonte, PA, SAD).
- Za GC-FID analizu masnih kiselina korišteni su zrak, vodik i dušik čistoće 99,999% od proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).
- Za određivanje antiradikalne aktivnosti korišten je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]) (TCI, Japan), metanol visoke čistoće (J.T. Baker, Poljska).

- Za određivanje ukupnih polifenola korištena je 20 %-tna otopina Na₂CO₃ (Merck, Njemačka), Folin-Ciocalteuov reagens (Merck, Njemačka) i etanol p.a. čistoće (Gram-Mol, Hrvatska)

3.2.3. Oprema

- Laboratorijski liofilizator (Martin Christ, Alpha 2-4 LSCplus, Osterode am Harz, Njemačka);
- Laboratorijski mlin (MRC Samplemill C-SM/450-C, Holon, Izrael);
- Laboratorijska tresilica (IKA, KS 260 basic, Staufen, Njemačka);
- Laboratorijska centrifuga (model Z 206 A, Hermle, Gosheim, Njemačka);
- Rotacijski vakuum uparivač (Laborota 4010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Njemačka);
- Plinski kromatograf Shimadzu GC-2010 Plus s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) koji sadrži kapilarnu kolonu SH-Rtx-Wax (Shimadzu, Kyoto, Japan);
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Elmasonic P 70 H, 37 kHz/50 W, Singen, Njemačka);
- Spektrofotometar (Boeco S-220, Hamburg, Njemačka).

3.3. Metode

3.3.1. Priprema uzoraka

Prikupljeni uzorci morskih organizama su stavljeni u nepropusne plastične vrećice u kojima se nalazila morska voda te su uzorci odmah transportirani u laboratorij. Svježi uzorci koji su se pripremali za ekstrakciju masnih kiselina su podvrgnuti postupku liofilizacije. Prije sušenja zamrzavanjem uzorci su isprani tri puta u demineraliziranoj vodi te nakon toga su izrezani na komadiće i u takvom stanju su zamrznuti na -20 °C tijekom 24 h. Zamrznuti uzorci su na pliticama stavljeni u laboratorijski liofilizator (Martin Christ, Alpha 2-4 LSCplus, Osterode am Harz, Njemačka). Liofilizacija je provedena pod visokim vakuumom (0,5 - 1,81 hPa) s primarnom temperaturom sušenja -20 °C i sekundarnom temperaturom sušenja od 20 °C tijekom 96 h. Uzorci nakon liofilizacije su usitnjeni na laboratorijskom mlinu (MRC Samplemill C-SM/450-C, Holon, Izrael) i kao takvi korišteni za određivanje sadržaja masnih kiselina.

3.3.2. Ekstrakcija ukupnih lipida metodom po Folch-u

Iz liofiliziranih uzoraka morskih organizama provedena je ekstrakcija ukupnih lipida metodom po Folch-u (Folch i sur., 1957). Uzorak mase 1 g pomiješan je sa smjesom otapala kloroform:metanol (2:1, v/v) volumena 20 mL, te je smjesa tijekom 20 min bila podvrgnuta miješanju pri 400 rpm (IKA, KS 260 basic, Staufen, Njemačka). Kasnije su pomoću centrifuge (model Z 206 A, Hermle, Gosheim, Njemačka) uzorci podvrgnuti separaciji krute od tekuće faze tijekom 20 min pri 2000 rpm. Nakon centrifugiranja, uzorci su filtrirani kroz filter papir i pomiješani s 4 mL 0,9 %-tne otopine natrijevog klorida. Nakon odvajanja faza, gornja faza je uklonjena, a donja kloroformska faza koja sadrži lipide bila je podvrgnuta uparivanju na 60 °C na rotacijskom vakuum uparivaču prikazanom na **Slici 6** (Laborota 4010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Njemačka).



Slika 6. Rotacijski vakuum uparivač (Laborota 4010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Njemačka) (Izvor: autor)

Nadalje, uzorci su podvrgnuti sušenju na 105 °C u sušioniku do konstantne mase. Ovaj postupak je proveden u tri ponavljanja. Za GC-FID analizu bilo je potrebno pripremiti dobivene ekstrakte. Pomoću otopine kalijevog hidroksida u metanolu provedena je transesterifikacija masnih kiselina te su dobiveni metilni esteri masnih kiselina (FAME), postupak dobivanja metilnih estera je opisan u B Uredbe Komisije br. 796/2002 (EZ, 2002). Osušanim uzorcima lipida dodano je 2 mL n-heptana te su promiješani 30 sekundi, nakon toga je dodano 0,2 mL 2 mol/L otopine kalijevog hidroksida u metanolu te su ponovno promiješani 30 sekundi. Nadalje, kada su se slojevi odvojili gornji heptanski sloj koji sadrži metilne estere je profiltriran u vijalicu i kao takav je podvrgnut plinskoj kromatografiji s plameno-ionizacijskim detektorom.

3.3.3. Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskih detektorom (GC-FID)

Prema postupku koji je opisan u odlomku 3.3.2. pripremljeni metilni esteri masnih kiselina injektirani su u plinski kromatograf Shimadzu GC-2010 Plus s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) koji sadrži kapilarnu kolonu SH-Rtx-Wax (Shimadzu, Kyoto, Japan). Nakon analize na plinskom kromatografu na temelju usporedbe vremena zadržavanja s retencijskim vremenima certificiranog referentnog standarda (Supelco F.A.M.E. Mix C4-C24) analiziranog pri istim uvjetima postignuta je identifikacija odvojenih masnih kiselina u uzorcima. Identificirane masne kiseline su izražene kao srednja vrijednost tri ponavljanja s obzirom na ukupni postotak masnih kiselina (%). Dobiveni rezultati masnih kiselina izraženi su u postotcima. U **Tablici 1.** prikazani su kromatografski uvjeti.

Tablica 1. Uvjeti GC-FID analize

GC kolona	SH-FAMEWAX TM kapilarna kolona (30 m duljina; 0,32 mm unutarnji promjer; 0,25 µm debljina stacionarne faze)
Plin nositelj	dušik, protok: 1,26 mL/min

Injektor	temperatura: 240 °C, volumen injektiranog uzorka: 2 µL, omjer cijepanja: 1:100
Temperaturni program kolone	120 °C izotermno 5 min; porast od 120 °C do 220 °C brzinom 5 °C/min, 220 °C izotermno 20 min
Uvjeti rada FID detektora	Temperatura: 250 °C, protok vodika: 40 mL/min; protok zraka: 400 mL/min; protok dušika: 30 mL/min

3.3.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Suhi uzorci morskih organizama pomiješani sa 70 %-tnom vodenom otopinom etanola i omjerom tekuće:kruto 20 mL/g su podvrgnuti ultrazvučnoj ekstrakciji u ultrazvučnoj kupelji (Elma, Elmasonic P 70 H, 37 kHz/50 W, Singen, Njemačka) pri tri različite temperature (30 °C, 50 °C, 70 °C) tijekom 30 minuta. Nakon ultrazvučne ekstrakcije uzorci su profiltrirani kroz filter papir i pohranjeni na 4 °C do spektrofotometrijske analize.

3.3.5. Određivanje ukupnih polifenola

Uzorci koji su dobiveni pomoću ultrazvučne ekstrakcije podvrgnuti su spektrofotometrijskoj metodi kako bi se odredio udio ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteuovog reagensa. U ekstrakt koncentracije 50 mg/mL volumena 20 µL dodano je 300 µL otopine natrijeva karbonata koncentracije 200 g/L, 1580 µL destilirane vode i 100 µL nerazrijeđenog Folin-Ciocalteuovog reagensa. Uzorci su termostatirani na 40 °C tijekom 30 min. Nakon toga je na spektrofotometru (Boeco S-220, Hamburg, Njemačka) mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao µg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po mL ekstrakta zato što su izračunati prema kalibracijskoj krivulji konstruiranoj za različite koncentracije galne kiseline (5-500 µg/mL).

3.3.6. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalna aktivnost u dobivenim ekstraktima je određena DPPH metodom. DPPH metoda se temelji na sposobnosti antioksidanasa u ekstraktu da hvataju slobodne radikale, te na upotrebi slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila koji je stabilan, tamno ljubičaste boje.

U ekstrakt koncentracije 50 mg/mL volumena 1,2 mL dodano je 0,5 mL svježe otopine DPPH, koncentracije 0,2 mM. Pripremljeni uzorak se 30 minuta drži u tami, nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm u tri ponavljanja. Rezultati su izraženi kao % aktivnosti vezanja (% DPPH) u provedena tri ponavljanja. Prema jednadžbi (1) izračunata je moć hvatanja radikala kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka i apsorbancije otopine DPPH u kojoj nije dodana otopina uzorka.

$$\%DPPH = \frac{(ADPPH+Ab)-As}{ADPPH} \cdot 100 \quad (1)$$

U jednadžbi (1) ADPPH predstavlja kontrolu apsorbancije pripremljene otopine DPPH (umjesto otopine uzorka dodan je metanol), Ab predstavlja apsorbanciju slijepa probe (umjesto DPPH dodan je metanol), a As predstavlja apsorbanciju uzorka pomiješanog s otopinom DPPH.

3.3.7. Izračun nutritivnih indeksa

Omjer PUFA/SFA izračunao se pomoću formule (2), a koristi se za procjenu utjecaja prehrane na kardiovaskularni sustav (Chen i Liu, 2020)

$$PUFA/SFA = \frac{\sum PUFA}{\sum SFA} \quad (2)$$

Pri čemu je:

Σ PUFA = ukupni udio polinezasićenih masnih kiselina

Σ SFA = ukupni udio zasićenih masnih kiselina

IA (aterogeni indeks) označava odnos između zbroja SFA i zbroja nezasićenih masnih kiselina (UFA). Visoke razine HDL-a u krvi odrazit će se kao nizak aterogeni indeks i obrnuto (Chen i Liu, 2020). Aterogeni indeks izračunao se prema formuli (3) (Chen i Liu, 2020):

$$IA = \frac{[C12:0+(4xC14:0)+C16:0]}{\sum UFA} \quad (3)$$

Pri čemu je:

C12:0 = udio laurinske kiseline

C14:0 = udio miristinske kiseline

C16:0 = udio palmitinske kiseline

Σ UFA = ukupni udio nezasićenih masnih kiselina (UFA)

IT (trombogeni indeks) karakterizira trombogeni potencijal masnih kiselina, ukazuje na procjenu rizika od stvaranja ugrušaka u krvnim žilama koji mogu uzrokovati srčani i moždani

udar. Označava odnos između protrombogenih masnih kiselina (C12:0, C14:0 i C16:0) i antitrombogenih masnih kiselina (MUFA i n-3 i n-6). Nizak IT odražava se kao smanjen rizik za nastanak trombocita (Chen i Liu, 2020). Trombogeni indeks izračunao se pomoću formule (4) (Chen i Liu, 2020):

$$IT = \frac{(C14:0+C16:0+C18:0)}{[(0,5x \sum MUFA)+(0,5x \sum n-6PUFA)+(3x \sum n-3PUFA)+(n^{-3}/n-6)]} \quad (4)$$

Pri čemu je:

C14:0 = udio miristinske kiseline

C16:0 = udio palmitinske kiseline

C18:0 = udio stearinske kiseline

Σ MUFA = ukupni udio mononezasićenih masnih kiselina

Σn = ukupan broj identificiranih masnih kiselina

6 PUFA = udio n-6 polinezasićenih masnih kiselina

n-3/n-6 = odnos n-3 i n-6 masnih kiselina

HH je omjer između hipokolesterolemičnih masnih kiselina i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina. Veći HH omjer ukazuje na veći udio hipokolesterolemičnih masnih kiselina i samim time smanjen rizik od srčanog i moždanog udara, ateroskleroze, tromboze i zatajenja srca (Chen i Liu, 2020). HH omjer izračunao se pomoću formule (5):

$$HH = \frac{(cis-C18:1+\sum PUFA)}{(C12:0+C14:0+C16:0)} \quad (5)$$

Pri čemu je:

cis - C18:1 = udio oleinske kiseline

Σ PUFA = ukupni udio polinezasićenih masnih kiselina

C12:0 = udio laurinske kiseline

C14:0 = udio miristinske kiseline

C16:0 = udio palmitinske kiseline

IU (indeks nezasićenosti) označava stupanj nezasićenosti u lipidima i izračunava se kao zbroj postotka svake nezasićene masne kiseline pomnožen s brojem dvostrukih veza unutar te masne kiseline, a prikazan je formulom (6) (Chen i Liu, 2020).

$$UI = 1x(\% \text{ monoenskih m. k.}) + 2x(\% \text{ dienskih m. k.}) + 3x(\% \text{ trienskih m. k.}) + 4x(\% \text{ tetraenskih m. k.}) + 5x(\% \text{ pentaenskih m. k.}) + 6x(\% \text{ heksaenskih m. k.})$$

(6)

Pri čemu je:

% monoenskih m. k. = udio masnih kiselina sa jednom dvostrukom vezom

% dienskih m. k. = udio masnih kiselina sa dvije dvostruke veze

% trienskih m. k. = udio masnih kiselina sa tri dvostruke veze

% tetraenskih m. k. = udio masnih kiselina sa četiri dvostruke veze

% pentaenskih m. k. = udio masnih kiselina sa pet dvostrukih veza

% heksaenskih m. k. = udio masnih kiselina sa šest dvostrukih veza

4. REZULTATI

4.1. GC-FID analiza sastava masnih kiselina spužve *Petrosia ficiformis***Tablica 2.** Rezultati GC-FID analize sastava masnih kiselina spužve *Petrosia ficiformis*

Br.	Masna kiselina		SV ± SD (%)
1.	Miristinska kiselina	C14:0	8,66 ± 0,06
2.	Pentadekanska kiselina	C15:0	3,61 ± 0,07
3.	Palmitinska kiselina	C16:0	19,33 ± 0,55
4.	Heptadekanska kiselina	C17:0	2,19 ± 0,04
5.	Stearinska kiselina	C18:0	6,35 ± 0,33
6.	Arahidska kiselina	C20:0	1,94 ± 0,92
7.	Behenska kiselina	C22:0	1,64 ± 0,20
Zasićene masne kiseline			43,72
8.	Miristoleinska kiselina	C14:1	2,27 ± 0,04
9.	<i>Cis</i> -10-pentadekanska kiselina	C15:1	2,11 ± 0,07
10.	Palmitoleinska kiselina	C16:1	10,40 ± 0,69
11.	<i>Cis</i> -10-heptadekanska kiselina	C17:1	5,40 ± 0,16
12.	Oleinska + elaidična kiselina	C18:1n9c+t	25,34 ± 0,26
13.	<i>Cis</i> -11-eikozenska kiselina	C20:1	1,52 ± 0,14
14.	Eručna kiselina	C22:1n9	3,44 ± 0,35
Mononezasićene masne kiseline			50,46
15.	Linolna kiselina	C18:2n6c	1,29 ± 0,24
Polinezasićene masne kiseline n-6 masne kiseline			1,29
16.	α-linolenska kiselina	C18:3n3	4,53 ± 0,06
Polinezasićene masne kiseline n-3 masne kiseline			4,53

Tablica 3. Nutritivni indeksi za spužvu *Petrosia ficiformis*

Nutritivni indeks	PUFA/SFA	IA	IT	HH	UI
Vrijednost	0,13	0,96	0,80	1,11	66,63

PUFA/SFA = omjer polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina; IA = aterogeni indeks; IT = trombogeni indeks; HH = hipokolesterolemijski/hiperkolesterolemijski omjer; UI = indeks nezasićenosti

4.2. GC-FID analiza sastava masnih kiselina mahovnjaka *Bugula neritina*Tablica 4. Rezultati GC-FID analize sastava masnih kiselina mahovnjaka *Bugula neritina*

Br.	Masna kiselina		SV ± SD (%)
1.	Miristinska kiselina	C14:0	5,88 ± 0,76
2.	Palmitinska kiselina	C16:0	48,38 ± 0,44
3.	Heptadekanska kiselina	C17:0	6,91 ± 0,47
4.	Stearinska kiselina	C18:0	15,83 ± 0,62
Zasićene masne kiseline			77,00
5.	Palmitoleinska kiselina	C16:1	6,83 ± 0,36
6.	<i>Cis</i> -10-heptadekanska kiselina	C17:1	2,44 ± 0,24
7.	Oleinska + eladična kiselina	C18:1n9c+t	8,07 ± 0,93
8.	<i>Cis</i> -11-eikozenska kiselina	C20:1	5,66 ± 0,69
Mononezasićene masne kiseline			23,01

Tablica 5. Nutritivni indeksi za mahovnjak *Bugula neritina*

Nutritivni indeks	IA	HH	UI
Vrijednost	3,12	0,15	23,01

IA = aterogeni indeks; HH = hipokolesterolemijski/hiperkolesterolemijski omjer; UI = indeks nezasićenosti

4.3. Određivanje ukupnih fenola u morskim organizmima

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola u spužvi *Petrosia ficiformis*

<i>Petrosia ficiformis</i>	
Uvjeti ekstrakcije	Ukupni fenoli (µg GAE/mL)
ultrazvuk, 30 min, 30 °C, 70 % EtOH	50,02
ultrazvuk, 30 min, 50 °C, 70 % EtOH	68,00

ultrazvuk, 30 min, 70 °C, 70 % EtOH	72,19
-------------------------------------	-------

Tablica 7. Sadržaj ukupnih fenola u mahovnjaku *Bugula neritina*

<i>Bugula neritina</i>	
Uvjeti ekstrakcije	Ukupni fenoli (µg GAE/mL)
ultrazvuk, 30 min, 30 °C, 70 % EtOH	48,22
ultrazvuk, 30 min, 50 °C, 70 % EtOH	59,01
ultrazvuk, 30 min, 70 °C, 70 % EtOH	53,61

4.4. Određivanje antiradikalne aktivnosti u morskim organizmima

Tablica 8. Antiradikalna aktivnost spužve *Petrosia ficiformis*

<i>Petrosia ficiformis</i>	
Uvjeti ekstrakcije	% DPPH (SV ± SD)
ultrazvuk, 30 min, 30 °C, 70 % EtOH	93,57 ± 0,70
ultrazvuk, 30 min, 50 °C, 70 % EtOH	93,65 ± 0,51
ultrazvuk, 30 min, 70 °C, 70 % EtOH	89,73 ± 2,02

Tablica 9. Antiradikalna aktivnost mahovnjaka *Bugula neritina*

<i>Bugula neritina</i>	
Uvjeti ekstrakcije	% DPPH (SV ± SD)
ultrazvuk, 30 min, 30 °C, 70 % EtOH	93,65 ± 0,51
ultrazvuk, 30 min, 50 °C, 70 % EtOH	79,12 ± 0,59
ultrazvuk, 30 min, 70 °C, 70 % EtOH	76,00 ± 1,86

5. RASPRAVA

5.1. Sastav masnih kiselina spužve *Petrosia ficiformis*

Identifikacija masnih kiselina postignuta je na temelju usporedbe vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja masnih kiselina u certificiranom referentnom materijalu Supelco F.A.M.E. Mix C4-C24 analiziranog pri istim uvjetima. Rezultati GC-FID analize su izraženi u postotcima kao srednja vrijednost tri ponavljanja s obzirom na ukupni postotak masnih kiselina (%) i prikazani su u **Tablici 2**. GC-FID analizom masnih kiselina spužve *P. ficiformis* pronađeno je 16 različitih masnih kiselina. Analizom je utvrđeno da su u najvećem postotku *cis*- i *trans*- izomeri oleinske kiseline (C18:1n9c+t) te je njihov postotak bio $25,34 \pm 0,26$ %. Druga po zastupljenosti sa $19,33 \pm 0,55$ % bila je palmitinska kiselina (C16:0). Ostale masne kiseline se pojavljuju u manjih postotcima, palmitoleinska kiselina (C16:1) $10,40 \pm 0,69$ %, miristinska kiselina (C14:0) $8,66 \pm 0,06$ %, stearinska kiselina (C18:0) $6,35 \pm 0,33$ %, *cis*-10-penatadekanska kiselina (C17:1) $5,40 \pm 0,16$ % te ostale kiseline u postotcima manjim od 5 %. Među identificiranim masnim kiselinama, zasićene masne kiseline (SFA) činile su 43,72 % od ukupnog sadržaja masnih kiselina, dok su mononezasićene masne kiseline (MUFA) u *P. ficiformis* bile prisutne u najvećem postotku od 50,46 %, a ostatak su činile polinezasićene masne kiseline (PUFA) n-3 4,53 % i n-6 1,29 %. U *P. ficiformis* identificirana je jedna n-3 (α -linolenska kiselina) i jedna n-6 (linolna kiselina). Ove masne kiseline spadaju u esencijalne masne kiseline koje ljudski organizam ne može sam sintetizirati. Poznato je da n-3 i n-6 masne kiseline imaju blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje. Prema istraživanjima, Mishra i sur. (2015) i Pedhan i sur. (2015) u većini morskih spužvi među linearnim SFA dominiraju C16:0 i C18:0. Mishra i sur. (2015) su najveći postotak C16:0 identificirali u uzorku spužve *Spirastrella inconstans* (95,8 %) i *Hyattella cribriformis* (63,9 %), a najveće postotke C18:0 u spužvama *Acanthella elongata* (39,1 %) i *A. cavernosa* (38,57 %). Analizom spužve *P. ficiformis* potvrđene su tvrdnje navedenih istraživanja, od svih linearnih SFA C16:0 i C18:0 zauzele su najveće postotke 19,33 % i 6,35 %. Usporedbom rezultata istraživanja i najvećih dobivenih postotaka SFA, *P. ficiformis* ima nizak udio C16:0 i C18:0 u odnosu na druge spužve. U većini slučaja sadržaj MUFA kod spužvi može doseći 40-50 % (Mishra i sur. 2015) što je slučaj i za *P. ficiformis* (50,46 %). Istraživanje provedeno na spužvi *Cliona viridis* pokazalo je sličan sastav masnih kiselina kao i kod *P. ficiformis*, od linearnih SFA dominiraju C16:0 i C18:0, od n-masnih kiselina identificirane su dvije, od kojih je jedna n-6 (linolna kiselina) identificirana u obje spužve (Bary i sur., 2016). Istraživanjima Rod'kina (2005) utvrđeno je da postoji ovisnost sadržaja masnih

kiselina o geografskom položaju i ovisi o godišnjem dobu u kojem je uzorak izronjen. U istraživanjima su analizirani uzorci spužvi roda *Petrosia*. Utvrđeno je da su poliacetileni najdominantniji metaboliti u spužvama *Petrosia* u umjerenim regijama, dok su tropske vrste *Petrosia* bile veći izbor metabolita, kao što su terpenoidi, steroli, poliacetileni i alkaloidi (Lee i sur., 2021). Stoga se može zaključiti da bi rezultati provedene analize na *P. ficiformis* mogli biti viši, obzirom da je uzorak izronjen u svibnju 2021. godine kada je temperatura mora bila umjerena (18 °C).

S nutritivnog aspekta, masne kiseline su vrlo važni spojevi koji osiguravaju normalnu funkciju metabolizma. Nutritivna vrijednost masnih kiselina se ocjenjuje i izražava kao nutritivni indeksi, a najčešće korišteni su omjer PUFA/SFA, aterogeni indeks (IA), trombogeni indeks (IT), hipolesterolemijski/hiperkolesterolemijski omjer (HH) i indeks nezasićenosti (UI). IA i IT su indeksi u korelaciji s potencijalnim učinkom masnih kiselina na kardiovaskularno zdravlje, potrošnjom hrane s niskim IA i IT može se smanjiti rizik od koronarnih bolesti srca (Radman i sur., 2022). Dobivene vrijednosti nutritivnih indeksa prikazane su u **Tablici 3**. Vrijednosti IA i IT za spužvu *P. ficiformis* iznose 0,96 i 0,80 što spada u niske indekse usporedbom s drugim morskim organizmima, primjerice smeđa alga *Gongolaria barbata* ima vrijednosti IA i IT 1,11 i 1,32 (Radman i sur., 2022). PUFA/SFA omjer iznosi 0,13 i ovaj omjer izražava procjenu nutritivne kvalitete masti. Ovaj omjer ne bi trebao biti veći od 0,4 kako bi se zadovoljile zdravstvene preporuke odnosno smanjio rizik od raznih bolesti. HH omjer iznosi 1,11 i on predstavlja metabolizam kolesterola i poželjna je što veća vrijednost. U slučaju *P. ficiformis* omjer HH je vrlo nizak, što je i karakteristično za morske organizme (Chen i Liu, 2020). Prema Chen i Liu (2020) HH omjer za morske alge iznosi između 1,26 i 2,09 što je u odnosu na spužvu *P. ficiformis* nešto veći iznos. UI omjer označava stupanj nezasićenosti u lipidima. Izračunava se kao zbroj postotka svake nezasićene masne kiseline pomnožen s brojem dvostrukih veza unutar te masne kiseline. Za *P. ficiformis* on iznosi 66,63 i relativno je nizak u usporedbi s UI kod morskih algi koji se nalazi između 45 i 368,68, ovisno o vrsti alge.

5.2. Sastav masnih kiselina mahovnjaka *Bugula neritina*

GC-FID analizom mahovnjaka *B. neritina* identificirano je 8 masnih kiselina, manje nego kod spužve *P. ficiformis*. Rezultati analize su prikazani u **Tablici 4**. Među identificiranim masnim kiselinama 77,0 % su bile SFA, a 23,01 % su bile MUFA, dok se analizom PUFA nisu detektirane u ovom morskom organizmu. Najviše zastupljena masna kiselina u *B. neritina* je C16:0 u postotku od $48,38 \pm 0,44$ %, zatim C18:0 u udjelu od $15,83 \pm 0,62$ %. Od ostalih masnih kiselina identificirani su C18:1n9c+t ($8,07 \pm 0,93$ %), C17:0 ($6,91 \pm 0,47$ %), C16:1 ($6,83 \pm 0,36$ %) i druge kiseline u manjim postocima. Prema istraživanju Demidkova (2010) najveći udio masnih kiselina u mahovnjacima zauzima C16:0 i C18:0 što je također slučaj i kod *B. neritina*. Analizom *B. neritina* nisu identificirane n-3 niti n-6 masne kiseline kao što je to bio slučaj kod *P. ficiformis* i ostalih spužvi iz raznih istraživanja. Usporedbom s drugim morskim organizmima, mahovnjaci su izrazito siromašni masnim kiselinama. Primjerice analizom smeđe makroalge *G. barbata* identificirano je 20 masnih kiselina, što je skoro tri puta više nego u *B. neritina*. Također, kao i kod mahovnjaka *B. neritina*, u *G. barbata* najzastupljenije su zasićene masne kiseline i to C16:0 i C18:0 (Radman i sur., 2022). Mishra i sur. (2015) u svom istraživanju primijetili su zanimljivu činjenicu da je postotak SFA spužve varirao ovisno o dubini i uvjetima sakupljanja uzoraka. Ista spužva je prikupljena s različitih dubina i ima različiti sadržaj SFA. Uočeno je da uzorci prikupljeni u plitkoj vodi sadrže visok sadržaj SFA. Usporedbom dubine uzorkovanja spužve *P. ficiformis* i mahovnjaka *B. neritina* možemo zaključiti da *B. neritina* ima veći udio SFA (77 %) jer je uzorak izronjen na dubini od 2 m, a uzorak *P. ficiformis* na dubini od 6 m ima manji udio SFA (43,72 %). Rezultati istraživanja Berdyshev i sur. (1992) na više vrsta mahovnjaka pokazali su visok udio C17:0 u svim vrstama. Analiza se provodila i na *B. neritina*, te rezultati pokazuju gotov isti sadržaj za tri masne kiseline, C16:0, C17:0 i C18:0. Usporedbom istraživanja s dobivenim rezultatima takav odnos između udjela C16:0, C17:0 i C18:0 ne vrijedi. Analizom je dobiveno da u mahovnjaku *B. neritina* od tri masne kiseline C16:0, C17:0 i C18:0 najveći udio ima C16:0, pa C18:0 i tek na četvrtom mjestu po udjelu se nalazi C17:0. Razlika u rezultatima može se dogoditi zbog raznih faktora. Geografski položaj i dubina uzorkovanja, priprema ekstrakta, te korištenje drugih metoda su faktori koji utječu na sastav masnih kiselina u morskim organizmima.

Što se tiče nutritivnih indeksa omjer PUFA/SFA je 0 zato što u *B. neritina* nisu identificirane polinezasićene masne kiseline. IA iznosi 3,12 i viši je u odnosu na spužvu *P. ficiformis*, što znači da *B. neritina* bolje inhibira nakupljanje kolesterola i stvaranje plaka u krvnim žilama. HH omjer iznosi 0,15 i niži je u odnosu na *P. ficiformis*, što je i karakteristično za sve morske organizme. Vrijednost UI je 23,01 i niži je u odnosu na spužvu *P. ficiformis* što znači da je stupanj nezasićenosti u lipidima vrlo nizak u odnosu na druge organizme, primjerice UI za alge iznosi između 45 i 368,68 (Chen i Liu, 2020).

5.3. Ukupni fenoli u *Petrosia ficiformis* i *Bugula neritina*

Ukupan sadržaj fenola mjereno je na spektrofotometru korištenjem Folin-Ciocalteuovog reagensa, a rezultati su izraženi kao $\mu\text{g GAE po mL}$ ekstrakta. Ukupni fenoli u *P. ficiformis* i *B. neritina* ekstrahirani su pomoću ultrazvučne kupelji na tri različite temperature 30 °C, 50 °C i na 70 °C tijekom 30 minuta i kasnije su određeni na spektrofotometru. Polifenoli se određuju zato što imaju potencijalno korisna biološka svojstva koja uključuju antioksidacijska, antimikrobna, antivirusna, antikancerogena, protuupalna i antidijabetičko djelovanje (Ummat i sur., 2020). Polifenoli se ne istražuju samo zbog svojih dobrih bioloških svojstava nego i zbog njihovog potencijala za sprječavanje nekoliko kroničnih bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti, pretilosti i dijabetesa. Sve se više istražuju zbog njihove moguće upotrebe u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Ummat i sur., 2020). Dobiveni rezultati sadržaja ukupnih fenola su prikazani u **Tablicama 6 i 7**. Usporedbom dobivenih rezultata, *P. ficiformis* ima veći sadržaj ukupnih fenola od *B. neritina* na svakoj od navedenih temperatura ekstrakcije. U slučaju spužve *P. ficiformis* ukupni sadržaj fenola raste porastom temperature ekstrakcije, te je najviši na 70 °C i iznosi 72,19 $\mu\text{g GAE/mL}$, dok za *B. neritina* najviši sadržaj se dobije ekstrakcijom na 50 °C te on iznosi 59,01 $\mu\text{g GAE/mL}$. Najmanji udjeli polifenola dobiveni su ekstrakcijom na 30 °C, te se može zaključiti da se povećanjem temperature ekstrakcije povećava ukupni fenolni sadržaj za oba morska organizma. Prema istraživanju Ummat i sur. (2020) provedenih na smeđoj algi *Fucus vesiculosus*, sadržaj ukupnih polifenola je dobiven uz pomoć UAE i njihov sadržaj polifenola se kretao između $573,6 \pm 6,8$ i $704,9 \pm 9,6$ mg GAE/g . Usporedbom rezultata možemo zaključiti da su *P. ficiformis* i *B. neritina* siromašni ukupnim fenolima jer je najveća dobivena vrijednost za ove organizme znatno niža nego primjerice dobivene vrijednosti za *Fucus vesiculosus*.

5.4. Antiradikalna aktivnost morskih organizama *Petrosia ficiformis* i *Bugula neritina*

Antiradikalna aktivnost određena je DPPH metodom, upotrebom stabilnog, slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila tamno ljubičaste boje koji hvata slobodne radikale. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablicama 8 i 9**, a rezultati su izraženi kao % aktivnosti vezanja (% DPPH) koji je izračunat prema jednadžbi (1). Vrijednosti su se kretale od $76,00 \pm 1,86$ % do $93,65 \pm 0,51$ %. U slučaju *P. ficiformis* najmanja antiradikalna aktivnost izmjerena je na 50 °C i iznosila je $82,50 \pm 0,53$ % DPPH, a u slučaju *B. neritina* to je bilo na temperaturi od 70 °C i iznosila je $76,00 \pm 1,86$ % DPPH. Najmanja antiradikalna aktivnost za uzorak *B. neritina* bio je na 70 °C, a za uzorak *P. ficiformis* pri temperaturi od 50 °C, a najveća antiradikalna aktivnost za oba uzorka je bila pri temperaturi od 30 °C. Povećanjem temperature smanjuje se antiradikalna aktivnost što se jasno uočava kod uzorka mahovnjaka *B. neritina*. Usporedbom rezultata s istraživanjima Oogarah i sur. (2020) na različitim spužvama, može se zaključiti da morski organizmi *P. ficiformis* i *B. neritina* imaju visoku antiradikalna aktivnost. Rezultati dobiveni statističkom analizom pokazuju korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti na više vrsta spužvi koje su bile predmet istraživanja Oogarah i sur. (2020). Zaključak istraživanja Oogarah i sur. (2020) je da sadržaj fenola u ekstraktima značajno doprinosi njihovom antioksidacijskom potencijalu, te najviše ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Stoga može se zaključiti da spužva *P. ficiformis* ima veću antiradikalna aktivnost zbog većeg sadržaja ukupnih polifenola od mahovnjaka *B. neritina*. Na većim temperaturama ekstrakcije opada antiradikalna aktivnost zbog termalne razgradnje fenola, što je vidljivo iz dobivenih rezultata. Cilj istraživanja koje je opisao Orhan i sur. (2021) bio je ispitati ukupni sadržaj polifenola, antiradikalni potencijal morskih organizama prikupljenih s obale Sredozemnog mora, jedna vrsta koralja i 12 vrsta spužvi među njima i *P. ficiformis*. Na svim uzorcima pokazala se neka antiradikalna aktivnost, te je pronađena značajna korelacija između antioksidativnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenola kao i kod istraživanja Oogarah i sur. (2020). Rezultati analize pokazali su da je oko 35 % klasificiranih spužvi imalo srednju do visoku razinu antiradikalne aktivnosti, te se pokazalo se da *P. ficiformis* i još dvije vrste spužvi imaju slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na druge uzorke spužvi i koralja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. GC-FID analizom spužve *Petrosia ficiformis* najzastupljenije masne kiseline su *cis*- i *trans*- izomeri oleinske kiseline ($25,34 \pm 0,26$ %). Najveći udio u spužvi čine mononezasićene masne kiseline (50,46 %).
2. GC-FID analizom mahovnjaka *Bugula neritina* dokazano je da je dominantna masna kiselina palmitinska kiselina ($48,38 \pm 0,44$ %). U analiziranom mahovnjaku dominiraju zasićene masne kiseline (77,0 %), a polinezasićene masne kiseline nisu uopće prisutne.
3. Spužva *Petrosia ficiformis* ($72,19 \mu\text{g GAE/mL}$) ima veći sadržaj ukupnih fenola od mahovnjaka *Bugula neritina* ($59,01 \mu\text{g GAE/mL}$). Najveće vrijednosti sadržaja ukupnih fenola za *P. ficiformis* je dobivena ekstrakcijom na 70°C , a za *B. neritina* na 50°C primjenom ultrazvuka. Za *P.ficiformis* povećanjem temperature povećavao se sadržaj ukupnih fenola.
4. Najveća antiradikalna aktivnost dobivena je primjenom ultrazvučne ekstrakcije na 30°C , najveće dobivene vrijednosti za *P.ficiformis* iznosi $93,57 \pm 0,70$ % DPPH i za *B.neritina* $93,65 \pm 0,51$ % DPPH. Dobiveni rezultati su pokazali da se povećanjem temperature smanjuje antiradikalna sposobnost i kod spužve i kod mahovnjaka.

7. LITERATURA

- Anjum K, Abbas SQ, Ali Shah SA, Akhter N, Batool S, Shamsul Hassan S: Marine Sponges as a Drug Treasure. *Biomolecules and Therapeutics* 24(4):347-362, 2016.
- Bary K, Elamraoui B, Bamhaoud T: Chemical characterization of *Cliona viridis*: Sponge of Atlantic Moroccan Coast. *International Journal of Innovation and Scientific Research* 26(1): 14-22, 2016.
- Bayona LM, de Voogd NJ, Choi YH: Metabolomics on the Study of Marine Organisms. *Metabolomics* 18:17, 2022.
- Berdyshev EV, Getmanova OE, Svetashev VI, Kubanin AA: The Heptadecanoic Fatty Aldehyde - One of the Main Aldehydes of the Far-Eastern *Bryozoa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102B(3): 639-641, 1992.
- Carballeira NM, Shalabi F: Novel Brominated Phospholipid Fatty Acids from the Caribbean Sponge *Petrosia sp.* *Journal of Natural Products* 56(5): 739-746, 1993.
- Chen J, Liu H: Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 5695, 2020.
- Ciavatta ML, Lefranc F, M. Vieira L, Kiss R, Carbone M, A.L van Otterlo W, B. Lopanik N, Waeschenbach A: The Phylum *Bryozoa*: From Biology to Biomedical Potential. *Marine drugs*, 18: 200, 2020.
- Cikoš AM, Jokić S, Šubarić D, Jerković I: Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae. *Marine drugs* 16: 348, 2018.
- Ćorković I: Zelene tehnike ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz kore mandarine (*Citrus unshiu*): fitokemijska analiza i optimizacija procesa. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Demidkova DA: The Composition of Fatty Acids and Aldehydes of the Marine Bryozoans *Berenicea meandrina* and *Dendrobeatia flustroides* (Bryozoa: Gymnolaemata). *Russian Journal of Marine Biology* 36(4): 300–304, 2010.

- Dini L, Pagliara P, Tarantino P, Tenuzzo B: Morphology and cytochemistry of dissociated cells of *Petrosia ficiformis* (Porifera). *Italian Journal of zoology*, 74(4): 331-339, 2007.
- Ebada SS, Proksch P: The Chemistry of Marine Sponges. U *Handbook of Marine Natural Products*, Springer Science+Business Media B.V, London, 2012, str.191-270.
- EZ, Komisija Europskih zajednica: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002.
- Figueiredo MW, Macedo S, Brito da Cunha N, AraújoCarneiro J, Andrade da Costa R, Amorim de Alencar S, Cardoso MH, Franco OL, CamposDias S: Marine Organisms as a Rich Source of Biologically Active Peptides. *Marine Science*, 8, 667-764, 2021.
- Figuerola B, Avila C: The Phylum *Bryozoa* as a Promising Source of Anticancer Drugs. *Marine drugs* 17, 477, 2019.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509, 1957.
- Frenk S, Steindler L: Biogeography rather than association with cyanobacteria structures symbiotic microbial communities in the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 529, 2014.
- Jerković I, Kranjac M, Marijanović Z, Šarkanj B, Cikoš AM, Aladić K, Pedisić S, Jokić S: Chemical Diversity of *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh Head space Compounds, Volatiles, Fatty Acids and Insight in to Its Antifungal Activity. *Molecules* 24(5):842, 2019.
- Kobetić M: Fauna na kolonijama mahovnjaka (*Bryozoa*) vrste *Pentapora fascialis* (Pallas, 1766). Diplomski rad. Prirodoslovno–matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, 2009.
- Lee YJ, Cho Y, Khanh Tran HN: Secondary Metabolites from the Marine Sponges of the Genus *Petrosia*: A Literature Review of 43 Years of Research. *Marine drugs*, 19, 122, 2021.
- Mishra PM, Sree A, Panda PK: Fatty Acids of Marine Sponges. U *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2015, str. 851-863.

- Oogarah PN, Ramanjooloo A, Doorga JRS, Meyepa C, van Soest RWM, Marie DEP. Assessing Antioxidant Activity and Phenolic Content of Marine Sponges from Mauritius Waters. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 12(3):123-131, 2020.
- Orhan DD, Orhan N, Demir O, Konuklugil B: Phenolic Content, Antioxidant and in vitro Antidiabetic Effects of Thirteed Marine Organisms form Mediterranean Sea. *Farmacica* 69(1): 68-74, 2021.
- Padhan SK, Mishra PM, Baliarsingh S, Sree A, Panigrahi M: Fatty Acid Profile and Sterol Composition of the Marine Sponge *Petrosia testudinaria*. *Chemistry of Natural Compounds* 51(2): 323-325, 2015.
- Radman S, Zekić M, Flanjak I, Cikoš AM, Jokić S, Jerković I: Contribution to the chemodiversity of ex *Cystoseira* sp. – *Gongolaria barbata* and *Ericaria crinita* from the Adriatic Sea: Volatiles, fatty acids and major pigments. *Algal Research* 63, 102653, 2022.
- Rod'kina SA: Fatty Acids and Other Lipids of Marine Sponges. *Russian Journal of Marine Biology* 31(1): 49–60, 2005.
- Sharp JH, Winson MK, Porter JS: Bryozoan metabolites: an ecological perspective. *Natural Product Reports* 24:659–673, 2007.
- Smoljo M: Antioksidacijski potencijal različitih estrakata jadranskih algi. *Završni rad*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.
- Snelgrove PVR: Diversity of Marine Species. U *Encyclopedia of Ocean Sciences, 3rd Edition*, Memorial University of Newfoundland, Newfoundland, Canada, 2001, str. 694-701.
- Spiteller D: Defense Strategies of Marine and Aquatic Organisms. U *Chemical Ecology*, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany, 2008, str. 844-852.
- Stengel DB, Connan S: *Natural products from marine algae, methods and protocols*. Humana Press Inc., New York, 2015.

Tian XR, Gao YQ, Tian XL, Li J, Tang HF, Li YS, Lin HW, Ma ZQ: New Cytotoxic Secondary Metabolites from Marine Bryozoan *Cryptosula pallasiana*. *Marine drugs*, 15, 120, 2017.

Tian XR, Tang HF, Tian XL, Hu JJ, Huang LL, Gustafson KR: Review of bioactive secondary metabolites from marine bryozoans in the progress of new drugs discovery. *Future Medicinal Chemistry*, 10(12), 1497–1514, 2018.

Ummat V, Tiwari BK, Jaiswal AK, Condon K, Garcia-Vaquero M, O'Doherty J, O'Donnell C, Rajauria G: Optimisation of Ultrasound Frequency, Extraction Time and Solvent for the Recovery of Polyphenols, Phlorotannins and Associated Antioxidant Activity from Brown Seaweeds. *Marine drugs* 18:250, 2020.

Varijakzhan D, Loh JY, Yap WS, Yusoff K, Seboussi R, Erin Lim SH, Lai KS, Chong CM: Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine drugs*, 19, 246, 2021.

Web1: <https://docplayer.rs/docs-images/88/116353926/images/26-0.jpg> [02.08.2022.]

Web2: <https://slidetodoc.com/spuve-o-spuve-su-mnogostanine-ivotinje-o-odrasle/>
[31.07.2022.]

Web3: <https://irlspecies.org/imagelib/imgdetails.php?imgid=2239> [16.08.2022.]