

Antioksidacijski kapacitet tkiva češljače *Aequipecten opercularis*

Prgić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:918021>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anamarija Prgić

Antioksidacijski kapacitet tkiva češljače
Aequipecten opercularis

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u ustanovi Aquarium Pula i Centru za istraživanje materijala Istarske županije METRIS pod vodstvom doc. dr. sc. Ines Kovačić i suvoditeljstvom izv.prof. dr. sc. Petra Kružića. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre Ekologije i zaštite prirode.

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ines Kovačić na stručnoj pomoći i savjetima pri izradi i pisanju ovog rada, te izv. prof. dr. sc. Petru Kružiću na pristupačnosti i ukazanoj pomoći tijekom cjelokupnog procesa.

Hvala Aquariumu Pula na ustupljenim prostorijama, te mag. oecol. et prot. nat. Anti Žunecu na pomoći i asistiranju pri analizama i mjerenjima uzoraka.

Zahvalila bih se stručnoj savjetnici Josipi Bilić kojoj sam iznimno zahvalna za sav uloženi trud, nesebičnu pomoć, predan rad, strpljenje koje je ukazala za moje upite, te savjete prilikom izrade rada i korištenja laboratorijske opreme u Centru za istraživanje materijala METRIS.

Također se želim zahvaliti mojim prijateljima i kolegama, posebice Jeleni, Leani i Petri na motivaciji i ohrabivanju koji su sve ovo vrijeme bili uz mene.

Naposljetku od srca najveće hvala upućujem svojoj obitelji; majci Marti, ocu Vladi i sestri Valentini koji su zajedno samnom prošli sve teškoće i pružali mi neizmjernu i bezuvjetnu podršku tijekom svih godina studija. Bez vas nebih bila to što jesam i ovdje gdje jesam.

Za kraj zahvalila bih se dečku Nikoli koji je zajedno sa mnom pretrpio sav stres i neprospavane noći tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Antioksidacijski kapacitet tkiva češljače *Aequipecten opercularis*

Anamarija Prgić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Antioksidansi su važne molekule koje inhibiraju djelovanje nestabilnih slobodnih radikala u stanici donirajući im jedan svoj elektron. U novije vrijeme sve je veća potreba za prirodnijim antioksidansima odnosno bioaktivnim tvarima. Jedni od spojeva koji su pokazali najveći potencijal za antioksidacijsku zaštitu organizma od slobodnih radikala su fenolni spojevi. Istraživanja fenolnih spojeva se baziraju uglavnom na biljkama. Istraživanja za prirodnijim antioksidansima iz morskih organizama su u porastu, no i dalje je vrlo mali broj dostupnih podataka o antioksidacijskom potencijalu morskih školjkaša. Stoga se ovaj diplomski rad bavi određivanjem antioksidativne sposobnosti češljače *Aequipecten opercularis* pomoću triju spektrofotometrijskih metoda (ABTS, FRAP, DPPH). Za ekstrakciju fenolnih spojeva su korištena tri različita otapala deionizirana voda (dH₂O), 70 % etanol (EtOH), te 90 % metanol (MeOH). Jedinke su uzorkovane na području Medulinskog zaljeva u rano proljeće. Kako bi se prikupili podaci za morfometrijska mjerenja i određivanje indeksa kondicije nad jedinkama su provedena morfometrijska mjerenja i vaganja. Na temelju dobivenih podataka je određen antioksidacijski kapacitet tkiva češljače. Antioksidacijski kapacitet bio je najvećih vrijednosti kod vodenog ekstrakta u sve tri korištene metode. Metoda ABTS je pokazala najbolje rezultate antioksidacijskog kapaciteta, zatim slijedi DPPH metoda i na kraju FRAP metoda. Fenolni spojevi u tkivu češljače *Aequipecten opercularis* pokazuju antioksidacijski potencijal, te bi se u budućnosti mogli koristiti za prehranu čovjeka, a u svrhu obrane organizma od slobodnih radikala i sprečavanja ili ublažavanja bolesti koje oni izazivaju.

Ključne riječi: slobodni radikali, antioksidacijski kapacitet, fenoli, školjkaši
(50 stranica, 29 slika, 2 tablice, 77 literaturnih navoda. Jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Komentor: izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Petar Kružić
Prof.dr.sc. Sven Jelaksa
Prof.dr.sc. Jasna Lajtner
Rad prihvaćen: 8. rujna. 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Antioxidant capacity of the queen scallop *Aequipecten opercularis* tissue

Anamarija Prgić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Antioxidants are important molecules that inhibit the action of unstable free radicals in the cell by donating one of its electrons. In recent times, there is an increasing need for natural antioxidants, ie bioactive substances. One of the compounds that showed the greatest potential for antioxidant protection of the body against free radicals are phenolic compounds. Research on phenolic compounds is mainly based on plants. Research on natural antioxidants from marine organisms is on the rise, but there is still very little available data on the antioxidant potential of marine shellfish. Therefore, this thesis deals with the determination of the antioxidant abilities of the comb *Aequipecten opercularis* using three spectrophotometric methods (ABTS, FRAP, DPPH). For the extraction of phenolic compounds, three different solvents were used: deionized water (dH₂O), 70% ethanol (EtOH), and 90% methanol (MeOH). Individuals were sampled in the Medulin Bay area in early spring. In order to collect data for morphometric measurements and determination of the condition index, morphometric measurements and weighing were performed on the individuals. Based on the obtained data, the antioxidant capacity of comb tissue was determined. The antioxidant capacity was the highest in the aqueous extract in all three methods used. The ABTS method showed the best results of antioxidant capacity, followed by the DPPH method and finally the FRAP method. Phenolic compounds in the tissue of the comb *Aequipecten opercularis* show antioxidant potential, and in the future could be used for human use in order to defend the body against free radicals and prevent or alleviate the diseases they cause.

Keywords: free radicals, antioxidant potential, phenols, bivalves
(50 pages, 23 figures, 2 tables, 77 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assist. Prof. Ines Kovačić, PhD, Juraj Dobrila University of Pula
Co-mentor: Assoc. Prof. Petar Kružić, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Petar Kružić, PhD
Prof. Sven Jelaska, PhD
Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Thesis accepted: 8.9.2022.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres	2
1.2. Antioksidansi.....	3
1.3. Fenolni spojevi.....	4
1.4. Antioksidacijski potencijal	8
1.5. Češljače.....	9
1.6. <i>Aequipecten opercularis</i> (Linnaeus, 1758)	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Uzorkovanje školjkaša.....	16
3.2. Morfometrijsko mjerenje i indeks kondicije	18
3.3. Homogenizacija tkiva	20
3.4. Određivanje ukupne količine fenola, flavonoida i ne-flavonoida.....	22
3.4.1. Ukupni fenoli	22
3.3.2. Ukupni ne-flavonoidi	24
3.3.3. Ukupni flavonoidi.....	24
3.4. Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama	25
3.4.1. ABTS	25
3.4.2. FRAP	26
3.4.3. DPPH.....	27
3.5. Suha tvar.....	28
3.6. Oprema	28
3.7. Kemikalije	29
3.8. Standardi.....	29
4. REZULTATI	30
4.1. Morfometrija	30
4.2. Bioaktivne tvari.....	30
4.3. Antioksidacijski kapacitet	34
5. RASPRAVA	37
6. ZAKLJUČAK.....	41
7. LITERATURA	42
8. ŽIVOTOPIS.....	50

1. UVOD

Razvoj tehnologije i interneta omogućio je lakši pristup informacijama, a to je dovelo do povećanja svjesnosti potrošača o zdravijim izborima hrane (Angiolillo i sur., 2015.). Zbog štetnih i kancerogenih učinaka sintetičkih antioksidansa koji se koriste kao konzervansi u hrani, sve je veća potreba za prirodnijim antioksidansima, odnosno bioaktivnim tvarima (Azizkhani i Zandi, 2009.; Cartea i sur., 2011.). Upotreba antioksidansa nije ograničena samo na konzervanse u hrani. Antioksidansi se koriste i u ostalim industrijama kao što su farmaceutska i kozmetička (Mikucka i sur., 2022.), te na svim tržištima gdje se upotrebljavaju spojevi podložni oksidaciji. Ukoliko dođe do oksidacije, slobodni radikali uzrokuju oštećenja molekula kao što su DNA, proteini, ugljikohidrati i dovode do razvoja bolesti poput raka, dijabetesa, Alzheimerove bolesti itd. (Gupta, 2015.; Krishnamoorthy i sur., 2019.). Antioksidansi su tvari koje djeluju protiv slobodnih radikala i sprječavaju oksidacijske procese (Skrovankova i sur., 2015.). Osim što su bioktivne tvari manje štetne za ljudski organizam, također je i sam proces dobivanja istih jeftiniji (Anbudhasan i sur., 2014.).

Bioaktivne tvari mogu se definirati kao prirodni fiziološki aktivni sastojci hrane koji nemaju nutritivnu vrijednost, a čiji utjecaj ima koristan učinak na zdravlje (Kris-Etherton i sur., 2004.). Drugim riječima ovi spojevi nisu nužni za održavanje stanične funkcije i primarnog metabolizma stanica, te nastaju kao sekundarni metaboliti (Mosunova i sur., 2021.; Mikucka i sur., 2022.).

Glavni izvor bioaktivnih tvari u prošlosti su uglavnom bili kopneni organizmi, no u novije vrijeme fokus se sve više usmjerava prema morskim organizmima (Ameen i sur., 2021.). Morski ekosustavi zbog velike raznolikosti organizama koji su u njima prisutni, predstavljaju veliki rezervoar i imaju obećavajući potencijal za pronalaženje novih bioaktivnih spojeva (Carson i Clarke, 2018.; Chakraborty i Joy, 2020.). Raznolikost morskih staništa predstavlja priličan izazov organizmima koji u njima žive. Širok raspon temperature, saliniteta, količine kisika i hranjivih tvari, razina svjetlosti, utjecaj tlaka te ovisno o samom staništu ekstremne promjene tih uvjeta, su neki od izazova s kojima se morski organizmi susreću. Kako bi se mogli nositi s tim uvjetima organizmi su morali razviti različite mehanizme prilagodbe (Carson i Clarke, 2018.; Ameen i sur., 2021.). Proizvodnja bioaktivnih tvari je mogući mehanizam obrane protiv oksidacijskog stresa, grabežljivaca, parazita i infekcija ili organizama obraštaja, te ima bitnu ekološku ulogu (Minh Van i sur., 2005.; Sinko i sur.,

2012.). Fenoli pod koje spadaju flavonoidi i ne-flavonoidi jedna su od najvažnijih skupina prirodnih antioksidansa (Huyut i sur., 2017.; Kumar i Goel, 2019.). Ovi spojevi su pronađeni i u morskim organizmima u manjim količinama, no vrijedno je istražiti njihov potencijal (Mateos i sur., 2020.).

1.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres

Za život mnogih organizama na Zemlji je potreban kisik, no on može biti i potencijalno vrlo štetan (Sansone i Brunet, 2019.). Prilikom razgradnje molekula kisika može doći do nastanka slobodnih radikala ili reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Slobodni radikali su vrlo nestabilne i reaktivne molekule ili dijelovi molekule koje se sastoje od atoma kojima u vanjskoj ljusci nedostaje jedan ili više elektrona (Krishnamoorthy i sur., 2019.). Izvori nastanka slobodnih radikala mogu biti egzogeni kao na primjer: tjelovježba, razni lijekovi, pušenje, ultraljubičasto zračenje, niska ili previsoka koncentracija kisika, promjene u temperaturi, razni toksini i ksenobiotici (Valko i sur., 2006.; Lobo i sur., 2010.). Slobodni radikali se također svakodnevno nakupljaju u stanici tijekom normalnih biokemijskih procesa staničnog metabolizma (San Miguel-Chávez i sur., 2017.)

Slobodni radikali mogu imati i korisnu ulogu kao signalna molekula u stanici, te su korisni u imunološkom odgovoru organizma na način da štite stanice od patoloških i infektivnih uzročnika te ih inaktiviraju (Huyut i sur., 2017.). Pod reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species* - ROS), spadaju radikali kisika (superoksidni radikal - O_2^- , perhidroksilni radikal - HOO^- , hidroksilni radikal - OH^-) i kisikove reaktivne neradikalne vrste (vodikov peroksid - H_2O_2 , klorovodična kiselina - HCl , ozon - O_3 , singlet kisik - O_2) (Huyut i sur., 2017.; San Miguel-Chávez i sur., 2017.). Slobodni radikali osim reaktivnih kisikovih vrsta ubrajaju i reaktivne oblike dušika (engl. *reactive nitrogen species* - RNS).

U potrazi za elektronom koji im nedostaje i postizanjem stabilnosti molekule, slobodni radikali napadaju najbližu dostupnu stabilnu molekulu (Maduzio i sur., 2005.; Biskup i sur., 2013.). Samim time aktivirane molekule sada i same postaju nestabilne zbog gubitka elektrona te aktiviraju druge molekule iz svog okruženja i time se započinju lančane reakcije u organizmu koje dovode do raznih oštećenja (Parčetić-Kostelac i sur., 2016.). Pri tome najčešće bivaju oštećene glavne stanične komponente kao što su lipidi, proteini, nukleinske

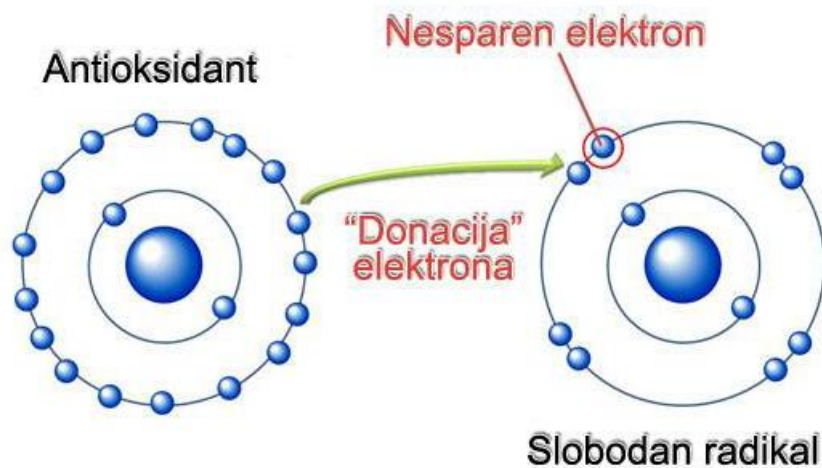
kiseline (Sansone i Brunet, 2019.). Posljedica tih oštećenja je razvoj raznih bolesti poput, dijabetesa, neuroloških bolesti (Alzheimerove i Parkinsonove bolesti), raka, artritisa, bolesti krvožilnog sustava i druge (Valko i sur., 2006.). Ujedno osim razvoja ovih bolesti, nakupljanje slobodnih radikala uzrokuje i ubrzano starenje organizma. Primjerice koža nakon određene godine života počinje postupno prirodno stariti, no utjecajem slobodnih radikala dolazi do iznimno ubrzanog smanjenja proizvodnje lipida, smanjenja razine kolagena, dolazi do sporije izmjene stanica. Što se očituje kožom koja nije elastična, gubi volumen i debljinu, te to može dovesti do poremećaja u obavljanju njezinih funkcija kao primjerice sposobnosti samozacjeljivanja. Kako bi šteta u organizmu bila što manja, stanice su razvile mehanizme koji reguliraju produkciju i utjecaj slobodnih radikala kao što je proizvodnja antioksidansa (Manduzio i sur., 2005.). Metabolički poremećaj ravnoteže u organizmu koji nastaje ukoliko je povećana produkcija reaktivnih kisikovih molekula, a u isto vrijeme smanjena antioksidativna zaštita organizma od slobodnih radikala, naziva se oksidacijski stres (Halliwell, 2007.; Huyut i sur., 2017.).

1.2. Antioksidansi

Antioksidansi su stabilne prirodne ili sintetski stvorene molekule koje imaju mogućnost inhibicije ili uklanjanja slobodnih radikala i samim time sprječavaju štetu koju oni izazivaju. Ukoliko izostane neprestano obnavljanje antioksidansa i u stanici opadne količina istih, dolazi do narušavanja ravnoteže i nastanka oksidacijskog stresa. Ove molekule se mogu podijeliti na nekoliko načina: 1) prema izvoru spoja, 2) prema načinu prisutnosti u organizmu, te 3) prema načinu djelovanja. Dakle, prema izvoru spoja se dijele na prirodne antioksidanse pronađene u biljkama i organizmima, te na one sintetski stvorene. Antioksidansi mogu biti endogeni ili egzogeni. Endogeni su oni koji se normalno formiraju u stanici kao mehanizam obrane, no ponekad oni nisu dovoljni, stoga je potrebno u organizam unijeti dodatne antioksidanse hranom ili pićem koji se onda nazivaju egzogenima (Krishnamoorthy i sur., 2019.). Dokazano je brojnim studijama kako prirodni antioksidansi iz voća i povrća poput fenolnih spojeva, mogu znatno doprinijeti smanjenju oksidacijskog stresa (Lobo i sur., 2010.; Huyut i sur., 2017.). Što se tiče podjele prema načinu djelovanja, antioksidansi se dijele na neenzimske i enzimске (Huyut i sur., 2017.). U enzimске antioksidanse spadaju superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT), glutation reduktaza, dok neenzimski antioksidansi uključuju fenolne spojeve, flavonoide, vitamin C, vitamin E, karotenoide,

vitamin A. Neenzimski antioksidansi su uglavnom egzogenog podrijetla. U literaturi se ponegdje može pronaći i podjela na primarne i sekundarne antioksidanse (Shahidi i sur., 2007.; Shao i sur., 2008.; Schreiber i sur., 2013.). No, to je uglavnom samo drugi termin za endogene i egzogene antioksidanse.

Način na koji antioksidansi djeluju u osnovi je prilično jednostavan, temelji se na doniranju jednog ili više njihovih elektrona slobodnim radikalima pri čemu ih stabiliziraju i neutraliziraju njihovu reaktivnost (Slika 1.) (Shahidi i sur., 2007.). U novije vrijeme se sve više pridaje pozornosti upravo egzogenim antioksidansima.

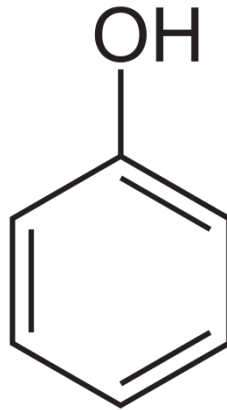


Slika 1. Antioksidant donira elektron slobodnom radikal (Izvor: <https://www.e-zdravlje.ba/zdravlje/slobodni-radikali/>)

1.3. Fenolni spojevi

Najveći potencijal pri zaštiti organizma su pokazali upravo fenolni spojevi i flavonoidi. Fenolni spojevi su aromatski organski spojevi koji su građeni od benzenskog prstena i hidroksilne skupine ili više njih (Slika 2.). To su sekundarni metaboliti pronađeni u najvećoj mjeri u biljkama, te nešto manje u životinjama (Cartea i sur., 2011.). Fenoli se uglavnom nalaze u voću, povrću, lišću, sjemenkama, te u napitcima poput kave, čaja i vina. Neke od mogućih uloga fenola kod biljaka su da im daju pigmente za crvenu, plavu i ljubičastu boju.

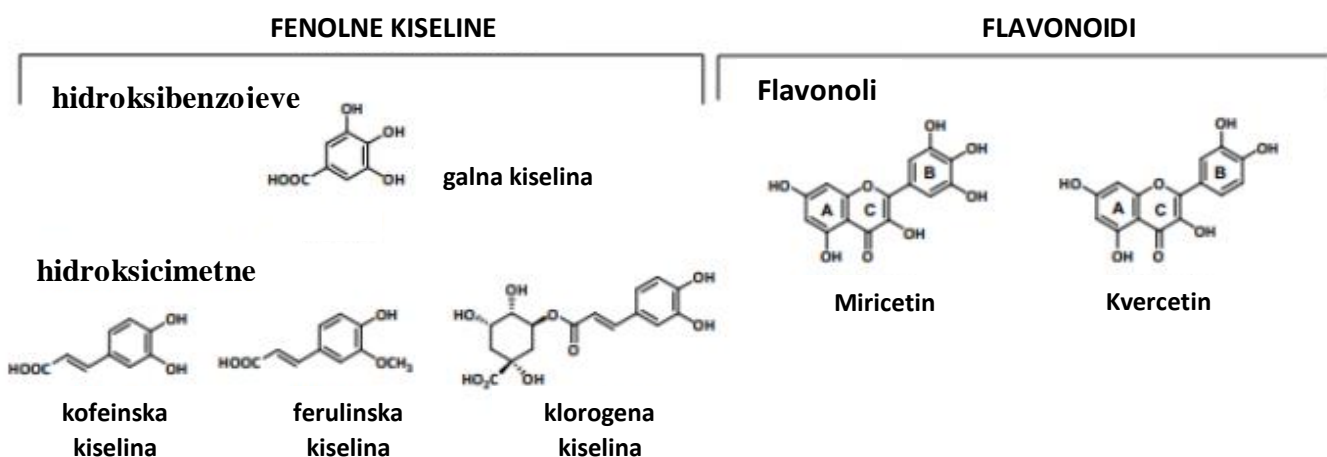
Osim toga neke od drugih uloga koje imaju su zaštita biljke od prejake svjetlosti, pomažu biljkama da privuku oprašivače, imaju snažna antioksidacijska svojstva i drugo. Upravo zbog jakih antioksidacijskih svojstava fenoli imaju veliki potencijal u sprječavanju raznih bolesti poput raka, bolesti krvožilnog sustava ili neuroloških bolesti (Cartea i sur., 2011.). S obzirom da organizam sam ne proizvodi ove spojeve, svakodnevno uzimanje istih hranom, pićem ili putem suplemenata moglo bi imati iznimno povoljan učinak na zdravlje (Rajauria i sur., 2013.; Biskup i sur., 2013.). Fenoli se osim kao antioksidansi koriste još i u kemijskoj industriji, prehrambenoj industriji, dodaju se plastici i gumi, koriste se u kozmetici i drugo (San Miguel-Chávez i sur., 2017.).



Slika 2. Najjednostavniji oblik fenola (Izvor: San Miguel-Chávez i sur., 2017.)

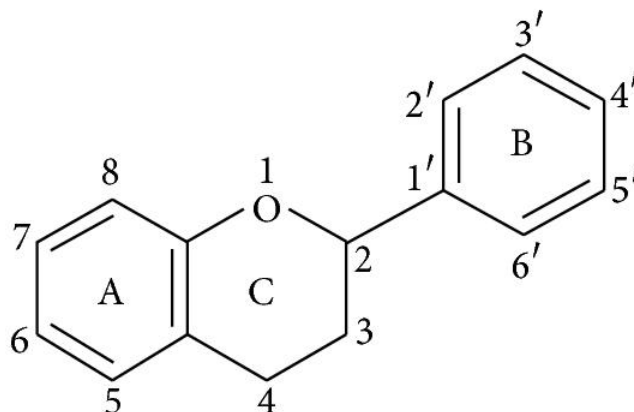
Određeni oblici fenola su pronađeni i u kopnenim i u morskim organizmima, dok su neki pronađeni isključivo u morskim organizmima (Slika 3.). Uloga fenolnih spojeva u morskim organizmima još nije dovoljno istražena. Pretpostavlja se kako je proizvodnja fenola kod morskih organizama izazvana vanjskim stresorima poput promjene saliniteta ili temperature u svrhu borbe protiv slobodnih radikala (Mateos i sur., 2020.). Do danas je identificirano oko 8000 vrsta fenola (Gonçalves i Romano, 2017.). Ovisno o broju fenolnih prstenova i strukturi fenoli se dijele na: flavonoide i ne-flavonoide (Andrés-Lacueva i sur., 2010.; Cartea i sur., 2011.). Veliki postotak fenola zapravo otpada na flavonoide koji se dijele na: flavone, flavanone, flavane, flavonole, izoflavone i antocijanidine.

U ne-flavonoide ubrajaju se fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline)(Slika 3.), stilbeni i lignani, tanini.

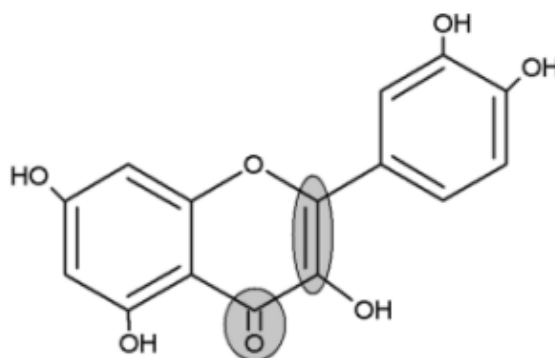


Slika 3. Prikaz struktura najčešćih fenola (fenolnih kiselina i flavonola) pronađenih u morskim organizmima (Izvor: Mateos i sur., 2020.)

Fenoli djeluju na način da se sparuju sa slobodnim elektronima reaktivnih kisikovih i dušikovih molekula i time ih uklanjaju iz stanice. Također imaju sposobnost aktiviranja antioksidacijskih enzima, kelatnog vezanja metala i prekidanja lančanih reakcija slobodnih radikala (Zaragozá i sur., 2008.; Rajauria i sur., 2013.; Mikucka i sur., 2022.). Koliko će biti jaka antioksidativna sposobnost fenolnih spojeva ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi (Biskup i sur., 2013.). Specifično ovisi o broju i položajima hidroksilnih skupina (-OH) na prstenima A, B i C (Slika 4.), te prisutnošću konjugiranih dvostrukih veza. Antioksidativnu sposobnost može pojačati slobodna hidroksilna skupina u položaju C3 (Burda i Oleszek, 2001.). Dvostruka veza na benzenskom prstenu između C2 - C3 položaja i prisutnost dvostruke veze karbonilne skupine na C4 (C = O) atomu povećavaju antioksidacijsku sposobnost kvercetina (Minatel i sur., 2017.) (Slika 5.).



Slika 4. Prikaz osnovne strukture flavonoida (Izvor: Kumar i Pandey, 2013.)



Kvercetin

Slika 5. Prikaz pojačane antioksidacijske sposobnosti kvercetina zbog postojanja dvostrukih veza na benzenskom prstenu i kod karbonilne skupine (Izvor: Minatel i sur., 2017.)

Budući da je more iznimno bogato prirodnim antioksidansima, potrebno je više pozornosti posvetiti morskim organizmima kao što su na primjer školjkaši (Sansone, C. i Brunet, C., 2019.; Chakraborty i Joy, 2020.).

1.4. Antioksidacijski potencijal

Antioksidacijski potencijal definira se kao sposobnost neutraliziranja i uklanjanja slobodnih radikala kisika (ROS) ili reaktivnih oblika dušika (RNS) koji se u prekomjernoj količini stvaraju kao nusprodukti u organizmima zbog endogenih ili egzogenih utjecaja.

Antioksidansi djeluju kroz dva mehanizma: prijenos atoma vodika (eng. *hydrogen atom transfer* - HAT) i prijenos jednog elektrona (eng. *single electron transfer* - SET). HAT mehanizam je kada antioksidans reagira sa slobodnim radikalom na način da mu donira jedan ili više atoma vodika. SET mehanizam funkcionira na način da antioksidansi kao stabilne molekule u međusobnoj interakciji daju nestabilnim slobodnim radikalima jedan svoj elektron (Moharram i Youssef, 2014.). Na temelju toga funkcioniraju i metode koje se koriste za određivanje antioksidacijskog potencijala nekog uzorka ili organizma. Od svih u tablici (Tablica 1.) navedenih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta najučestalije se pri istraživanjima koriste ABTS, DPPH, FRAP i ORAC metode (Moharram i Youssef, 2014.).

Tablica 1. Metode za određivanje antioksidacijskog potencijala koje se koriste u literaturi nabrojane prema mehanizmu djelovanja (Izvor: Moharram i Youssef, 2014.)

Metoda	Kratika	Mehanizam djelovanja
Ferric-reducing antioxidant power	FRAP	SET
2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay	DPPH	SET
Cupric ion reducing antioxidant capacity	CUPRAC	SET
Trolox equivalent antioxidant capacity	TEAC	SET
2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)	ABTS	HAT
Total reactive antioxidant potential	TRAP	HAT
Lipid peroxidation inhibition capacity	LPIC	HAT
Oxygen radical absorbing capacity	ORAC	HAT
Inhibited oxygen uptake	IOC	HAT

Do sada je u literaturi antioksidacijski kapacitet najviše istraživan u vinu (Villano i sur., 2005.), voću (Iturri i sur., 2021.), povrću (Aydin, 2020.), biljkama (Jing i sur., 2015.) i morskim algama (Ling i sur., 2013.). Osim kopnenih biljaka, morske alge su pokazale veliki antioksidacijski potencijal posebice u pogledu fenolnih spojeva. No, u novije vrijeme se fokus usmjerio i prema morskim organizmima, iako još uvijek nedovoljno. Tako se u literaturi mogu pronaći radovi o antioksidacijskom kapacitetu koralja (Griffin i Bhagooli, 2004.),

školjkaša kao što je primjerice *Mytilus galloprovincialis* (Lima i sur., 2004.) ili *Perna viridis* (Krishnamoorthy i sur., 2019.), puževa (Paul i sur., 2020.) i trpova (Mamelona i sur., 2007.).

1.5. Češljače

Školjkaši se hrane filtrirajući vodu čime se nakupljaju razna zagađivala i toksini u njihovu tkivu koji uzrokuju razvoj slobodnih radikala (Vidal i sur., 2002.; Labieniec i sur., 2007.). Unatoč tome one napreduju i razvijaju se što ih čini iznimno dobrim organizmom za proučavanje antioksidacijskog potencijala (Canesi, L., 2014.).

Cešljače su vrlo raznolika skupina školjkaša koji spadaju u porodicu Pectinidae. Ovoj porodici pripada oko 400 poznatih vrsta školjkaša (Brand, 2006.). Razlog velike raznolikosti ove porodice leži u njihovoj jako dugoj povijesti od oko 245 milijuna godina, kroz koju su razvile razne adaptacije. Sa tolikom raznolikošću vrsta dolazi i velika raznolikost staništa, te široka geografska distribucija (Brand, 2006.). Rasprostranjenje su u svim morima od polarnih područja do tropskih krajeva. Puno je čimbenika koji utječu na rasprostranjenost kao na primjer: dostupnost hrane, vrsta podloge, prisutnost predatora, temperatura, salinitet, dubina, dostupnost slobodnog životnog prostora (Román-Cabello i sur., 1999.). Lokalno gledajući ukoliko su navedeni uvjeti povoljni na određenom području češljače mogu razviti guste populacije (Laming i sur., 2013.). Neke vrste se pojavljuju u obalnim vodama sublitorala, od površine do 100 metara dubine, dok su se druge adaptirale da nastanjuju i područja do 7000 metara dubine (Brand, 2006.).

Vrsta podloga koju preferiraju odrasle jedinke je raznolika. Neke češljače žive zacementirane na stjenovitu podlogu, dok druge barem dio svog života provedu pričvršćene bisusnim nitima na nepokretne objekte. No glavnina vrsta ove porodice zapravo slobodno leže na sedimentu. Ova porodica predstavlja jedine mekušce koji imaju razvijenu sposobnost plivanja kao odgovor na bijeg od predatora (Schmidt i sur., 2008.). U Europi se vrste ove porodice izlovljavaju već preko 100 godina i od iznimne su važnosti za ribarsku industriju (Outeiro i sur., 2021.).

1.6. *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758)

koljeno: Mollusca

razred: Bivalvia

red: Pectinida

porodica: Pectinidae

vrsta: *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758)



Slika 6. *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) (izvor: <https://bim.ie/fisheries/species-directory/queen-scallop/>)

Iz porodice Pectinidae u ovome radu korištena je vrsta *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758). Ovo je vrlo uobičajena vrsta koja ima široku rasprostranjenost na europskom kontinentalnom šelfu i može se pronaći na istočnoj obali Atlantika, preko Mediterana do Jadranskog mora (Outeiro i sur., 2021.; Schmidt i sur., 2008.). U Jadranskom moru ona preferira podloge kao što je tvrdi pjeskoviti šljunak ili pjeskoviti mulj (Román-Cabello i sur., 1999.). Jedinke ove vrste pokrivaju širok raspon dubina i mogu se pronaći u površinskim vodama, pa sve do 180 metara dubine (Johnson i sur., 2000.). Strahl i sur. (2010.) ustanovili su da *A. opercularis* podnosi temperature od minimum 6 °C do maksimum 24 °C, dok je

Brand (2006.) utvrdio kako za formiranje bisusnih niti kod ovih školjkaša maksimum temperature koju mogu tolerirati je do 18 °C. Općenito je proizvodnja bisusnih niti kod ove vrste vrlo osjetljiva na promjene uvjeta u okolišu (Outeiro i sur., 2021.). Također, mlade jedinke bolje podnose više temperature od onih starijih (Brand, 2006.).

Love se mrežama potegačama, a komercijalno prihvatljive veličine postaje kada dosegne 50 milimetara (Román-Cabello i sur., 1999.). Uzgoj ovih vrsta u Hrvatskoj nije uspostavljen, unatoč provedenim eksperimentalnim uzgojima i komercijalnoj vrijednosti koju imaju. Neuspješan pokušaj uzgoja češljača u Hrvatskoj je bio za jakobovu kapicu *Pecten jacobaeus* (Linnaeus, 1758) i za malu kapicu *Chlamys varia* (Linnaeus, 1758) osamdesetih godina. Umjesto uzgoja u Hrvatskoj se upravo ove dvije vrste izlovljavaju iz prirodnih staništa (Marguš i Teskeredtić, 2005.). Što se tiče uzgoja izvan Hrvatske najčešće se uzgajaju slijedeće vrste češljača: *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819.), *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), *A. opercularis*, *Chlamys islandica* (Müller, 1776), *Chlamys varia*.

Najveći uzgajivači češljača su Kina i Japan, a zatim slijede Ujedinjeno Kraljevstvo, Francuska, Norveška, Italija, Španjolska, Rusija, Kanada, Sjedinjene Američke Države (Shumway i Parsons, 2016). Uzgoj češljača je razvijen u Japanu 1960. godine, te su takav princip uzgoja kasnije preuzele i ostale navedene države.

Brzo je rastuća vrsta koja u dvije godine rasta dosegne veličinu prihvatljivu za izlov, odnosno naraste do oko 50 milimetara (Johnson i sur., 2000.; Outeiro i sur., 2021.). Ljuštura su joj lepezastog oblika s oko 20 nabora, kao što je vidljivo na slici (Slika 6.). Lijeva i desna ljuštura se pomalo razlikuju. Lijeva ili anteriorna ljuštura je ravna i pokazuje jače boje sa svjetlijim i tamnijim šarama od lijeve ljuštura (Slika 7.). Desna je više konkavnog oblika, te se obično ona nalazi malo ukopana u sedimentu kako bi školjkaš bio što manje vidljiv predatorima. Također je i svjetlija od desne (Slika 8.). Na dnu ljuštura se nalaze dvije strukture s obje strane ljuštura nalik na krila. Posteriorno „krilo“ je uvijek manje od anteriornog i naziva se *auricle* (Slika 7. i 8.). Struktura specifična za ovu vrstu je *ctenolium* odnosno linija „zubića“ koja se nalazi na desnoj ljušturi kod bisusnog usjeka. Kao i većina školjkaša one se hrane filtrirajući vodu iz koje izdvajaju fitoplankton, zooplankton i detritus (Rahman, 2020.).



Slika 7. Prikaz lijeve ljuštore češljače *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) (izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Queen_scallop)

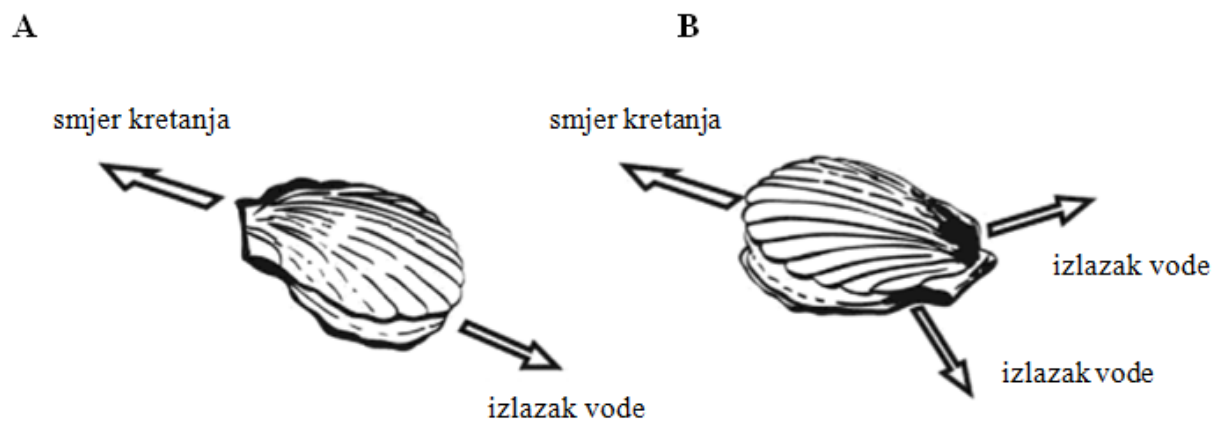


Slika 8. Prikaz desne ljuštore češljače *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) (izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Queen_scallop)

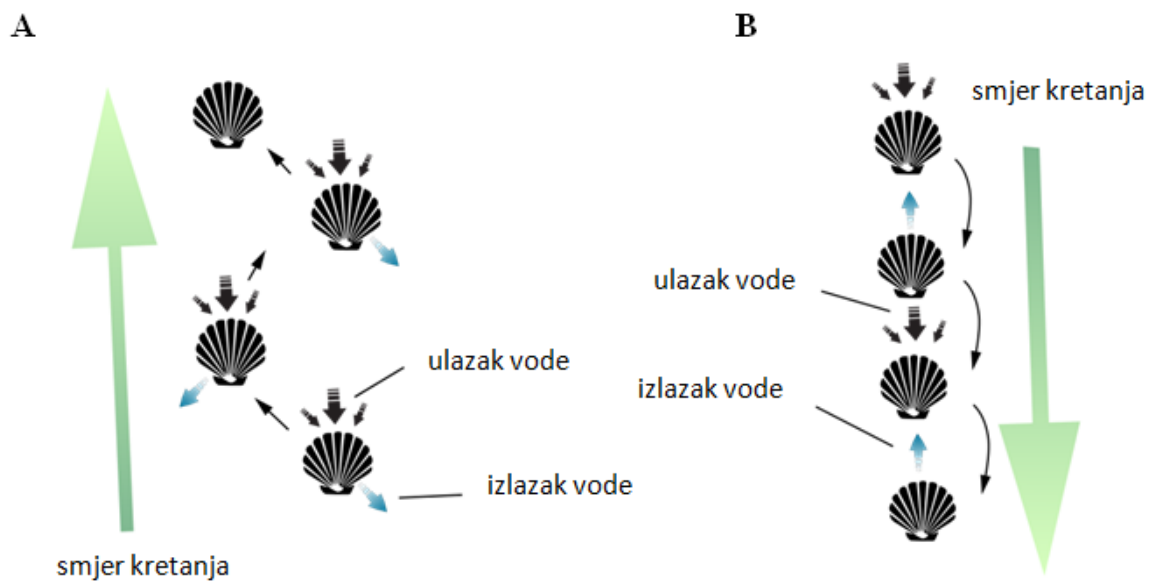
Ova vrsta ima prilično kratak životni vijek, a podaci u literaturi variraju. Schmidt i sur. (2008.) su u svome radu naveli kako vrsta doživi 8 do 10 godina starosti, dok Johnson i sur. (2000.) smatraju kako je vrlo rijetko da vrsta nadživi 6 godina starosti.

Opasnost im ne predstavljaju samo ribari, nego i predatori među kojima su glavni ribe, rakovi i morske zvjezdače (Kamenos i sur., 2004.). Upravo iz tog razloga su češljače *A. opercularis* razvile jednu vrlo neobičnu sposobnost, a to je mogućnost plivanja. Ovu sposobnost koriste uglavnom kako bi izbjegle predatore i ronioce, no uglavnom ih se može pronaći kako slobodno leže na sedimentu (Jenkins i sur., 2003.; Shumway i Parsons, 2016). Plivanje se odvija u tri faze: 1) najprije se jedinke uzdignu od tla u vodeni stupac pod ostrim kutom, 2) zatim dolazi faza kratkog horizontalnog plivanja pri kojemu školjkaš naglo izbacuje vodu kroz svoj dorzalni dio i mišićnim aduktorom uzrokuje niz brzih zatvaranja ljuštura, čime stvara mlazni pogon, 3) zadnja faza je pasivno tonjenje na dno (Stephens i Boyle, 1978.; Schmidt i sur., 2008.).

Jedinke opasnost mogu osjetiti na vrlo velikim udaljenostima. Reakcija plivanja se aktivira na čak i do 1,5 metar udaljenosti od predatora (Jenkins i sur., 2003.; Schmidt i sur., 2008.). Također osim plivanja pokazuju i sposobnost „skakutanja“ po morskom dnu. Do „skakutanja“ dolazi kada školjkaš kroz svoj ventralni dio naglo izbacuje vodu, što ga uglavnom odbacuje unazad. Razlika između plivanja i „skakutanja“ je što se školjkaš odmah vraća na dno nakon svakog uzdizanja (Slika 9. i 10.). Obraštaj koji se može stvoriti na površini ljuštura školjkaša nema nikakav utjecaj na ove procese (Brand, 2006.).



Slika 9. Prikaz mehanizma A) „skakutanja“, B) plivanja *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) (Preuzeto i prilagođeno prema: Shumway i Parsons, 2016.)



Slika 10. Smjer kretanja jedinke pri A) plivanju i B) „skakanju“ po morskom dnu (Preuzeto i prilagođeno prema: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scallop_jump.svg)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je:

1. procijeniti antioksidacijski kapacitet u homogenatu tkiva češljače *A.opercularis* u odraslim jedinkama s područja Medulinskog zaljeva.
2. odrediti količinu ukupnih fenola (TP), flavonoida (TF) i ne-flavonoida (TNF) u uzorku tkiva češljače *A.opercularis* koristeći spektrofotometrijske metode.
3. usporedit dobivene rezultate ukupne količine polifenola i antioksidacijski kapacitet u različito pripremljenim homogenatima (vodenom – dH₂O, 90 % metanolnom – 90 % MeOH i 70 % etanolnom – 70 % EtOH homogenatu) ukupnog tkiva češljače.

3. MATERIJALI I METODE

Sve kemikalije koje su korištene u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada, nabavljene su od komercijalnih dobavljača i korištene su u sklopu laboratorija Metris u Puli u kojemu su odrađena sva potrebna mjerenja.

3.1. Uzorkovanje školjkaša

Uzorkovanje češljače *A. opercularis* provedeno je tokom listopada 2020. godine od strane ribara pomoću hidrauličke kočice, 2 milje izvan mjesta Albanež u Medulinskom zaljevu, unutar zone E2 (Slika 11.).



Slika 11. Mjesto uzorkovanja češljače *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) 2 milje izvan mjesta Albanež u Medulinskom zaljevu (izvor: www.google.hr/maps).

Pritome je prikupljeno 161 jedinki od kojih je za istraživanje u ovome radu korišteno 30 jedinki. Nakon uzorkovanja jedinke su prenesene u ustanovu Aquarium Pula, te smještene u jedan četvrtasti akvarij volumena 720 litara (D× Š × V 200 × 60 × 60 cm) na aklimatizaciju (Slika 12.). Bazen nije imao nikakvu podlogu, a čišćen je svakodnevno usisavanjem. Tokom procesa aklimatizacije jedinke sam hranila živim tekućim kulturama *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., i *Skeletonema* sp. („Phytobloom“). Hranjenje je započinjalo oko 9 sati ujutro, te trajalo oko 6 sati. Nakon tjedan dana provela sam morfometrijska mjerenja jedinki kako bi se prikupili parametri ljuštura i izračunao indeks kondicije. Nakon provedenih potrebnih mjerenja pripremila sam kompozitne uzorke po 3 školjkaša koje sam zaledila za kasniju analizu antioksidacijskog kapaciteta. Analiza antioksidacijskog kapaciteta tkiva češljače rađena je u laboratoriju Metris u Puli. Tamo sam iz pripremljenih homogenata tkiva odredila ukupne fenole, ukupne flavonoide, ukupne ne-flavonoide, te antioksidacijski kapacitet. Mjerenja su odrađena pomoću spektrofotometrijskih metoda u tri različita otapala (voda, metanol, etanol).



Slika 12. Prikaz četvrtastog akvarija u kojemu su tokom aklimatizacije bile smještene jedinke *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u ustanovama Aquarium Pula)

3.2 Morfometrijsko mjerenje i indeks kondicije

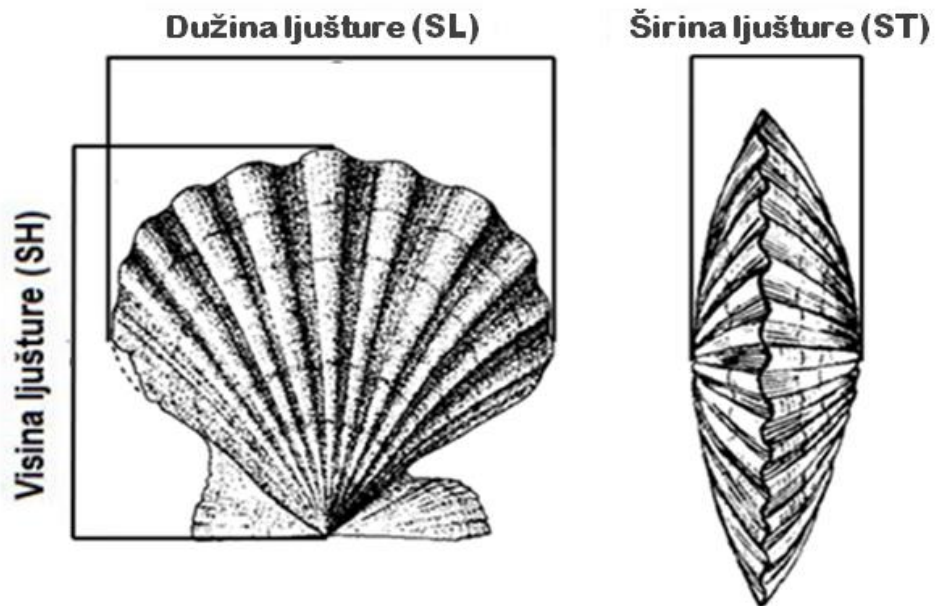
Prije početka morfometrijskih mjerenja na ljuštore 30 jedinki zalijepila sam oznake s brojevima kako bi razlikovanje i praćenje jedinki bilo što jednostavnije, te da se izbjegne slučajno mjerenje istih jedinki (Slika 13.). Za mjerenje je korištena digitalna pomična mjerka, a prikupljeni parametri bili su: visina (SH), dužina (SL) i širina (ST) ljuštore (Slika 14.). Ti parametri su potrebni kako bi se odredile odrasle jedinke. Kada jedinke dosegnu 48-58 mm u dužinu, te 49-59 mm u visinu smatraju se odraslim jedinkama.



Slika 13. Prikaz jedinki vrste *Aequipecten opercularis* (Linnaeus, 1758) označenih brojevima. (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u ustanovama Aquarium Pula)



Slika 14. Prikaz mjerenja morfoloških obilježja ljuštore češljače A) dužina - SL, B) širina - ST, C) visina - SH pomoću digitalne pomične mjerke (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u ustanovama Aquarium Pula)



Slika 15. Morfološka obilježja ljuštore češljača (Preuzeto i prilagođeno prema: Berik i sur., 2017.)

Za dobivanje ukupne mase (TW) i mase mokrog tkiva (SBW) jedinki koristila sam digitalnu vagu. Najprije sam odredila masu cijelog školjkaša. Zatim sam otvorila češljače tako što sam prerezala mišićni aduktor, te sam odvojila mokro tkivo od ljuštura koje je zatim zasebno izvagano. Nakon vaganja je tkivo od po 3 jedinke stavljano u velike plastične falkonice prethodno postavljene na led za daljnje analize. Tkivo je smrznuto na – 20 °C do daljnjih analiza. Rezultati svih navedenih mjerenja uneseni su u excel tablice i korišteni su za izračunavanje indeksa kondicije.

Indeks kondicije je zatim određen prema sljedećoj formuli:

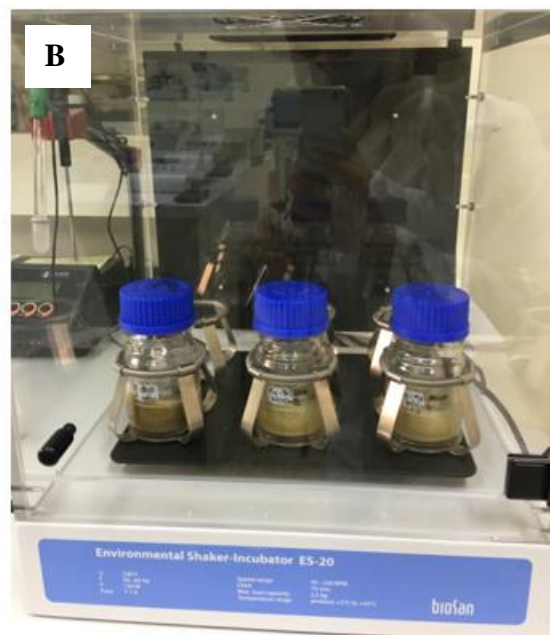
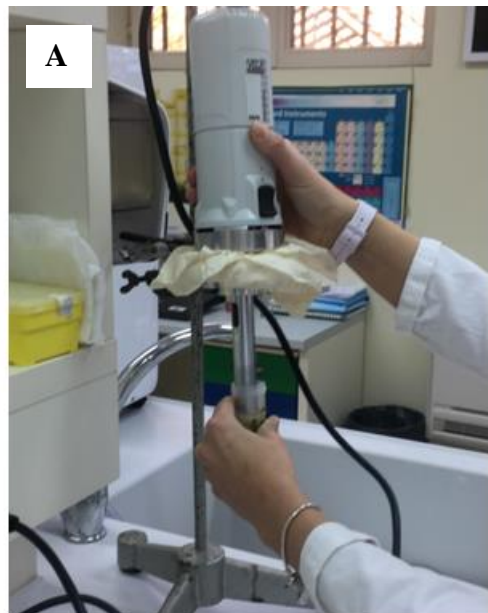
$$IK (\%) = \text{masa mokrog tkiva (g)} \times 100 / \text{masa ljuštura školjkaša (g)}$$

3.3. Homogenizacija tkiva

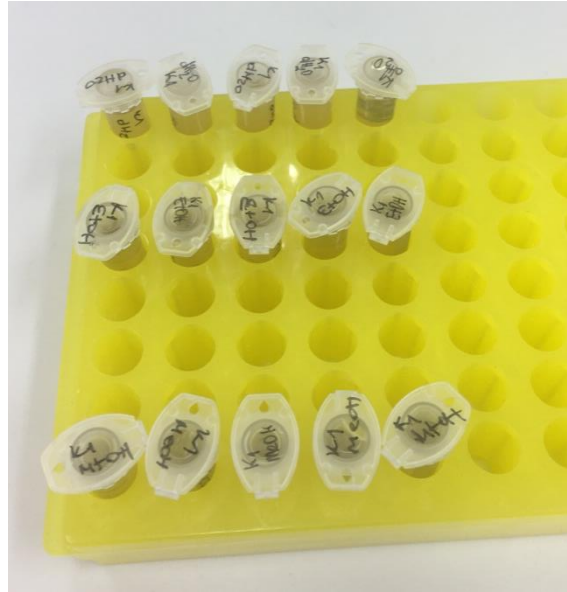
Za analizu ukupne količine fenola, flavonoida i ne-flavonoida, te antioksidacijskog potencijala najprije je bilo potrebno pripremiti homogenate tkiva. Homogenizacija tkiva je proces razgradnje strukture mekog tkiva kojim se uzorak razbija na takav način da se sitni fragmenti tkiva ravnomjerno rasprše u smjesi. Homogenizacija pomaže na način da razbija plazma membranu čime se oslobađa stanični sadržaj bez da se taj sadržaj ošteti. Homogenat tkiva sam pripremila u tri različite otopine (homogenat tkiva s vodom, etanolom i metanolom). Otapala korištena u ovome radu odabrana su na temelju njihovih polarnosti, te osiguravaju različitu ekstrakciju spojeva. Svaki kompozitni uzorak mjerila sam u triplikatima. Kao pripremu za proces homogenizacije izvagala sam tkivo češljače u tri velike plastične falkonice kako bi masa tkiva u svakoj falkonici bila što približnija (Slika 16.). Nakon toga sam u svaku od epruveta dodala po jedno odabrano ekstrakcijsko otapalo u omjeru 1:3. Zatim sam svaki uzorak homogenizirala pomoću vrlo brzog homogenizatora u trajanju od 5 minuta (Slika 17.). Uzorci su zatim ostavljeni pri sobnoj temperaturi u vrtložnoj miješalici tijekom cijele noći (Slika). Zatim sam uzorke prenijela u Eppendorf tube te su centrifugirani 30 minuta pri 10 000 rpm i na 4 °C. Dobivene supernatante sam pažljivo odvojila u nove Eppendorf tube, te spremila u hladnjak za daljnje analize (Slika 18.).



Slika 16. Prikaz vaganja tkiva češljače prije dodavanja otapala (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)



Slika 17. A) Korišteni homogenizator (Velp Scientifica OV5 homogenizator), B) Uzorci ostavljeni preko noći u vrtložnoj miješalici. (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

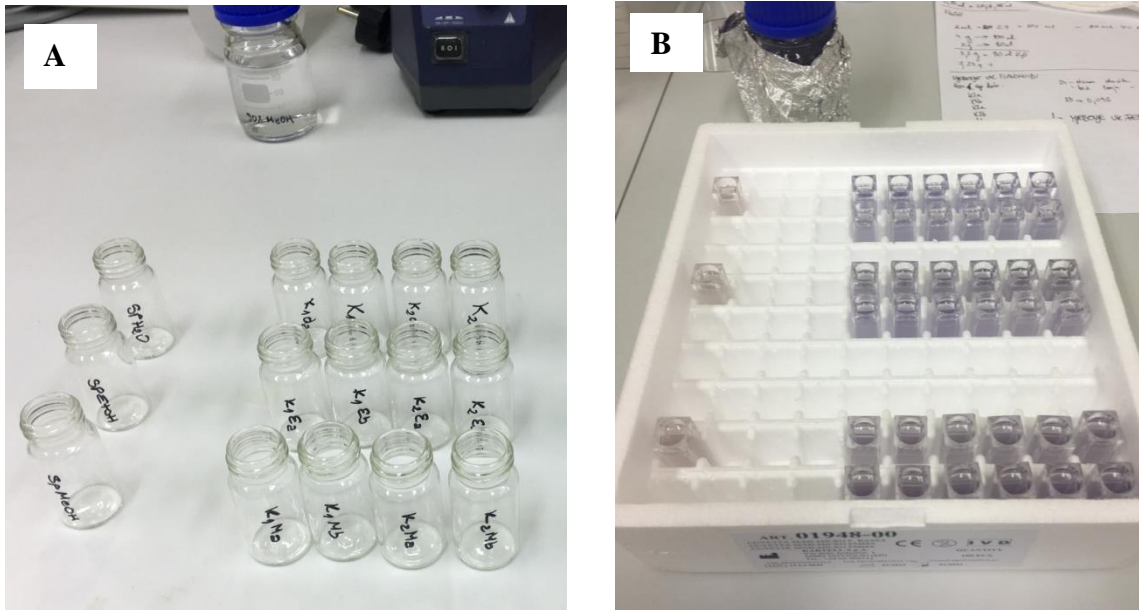


Slika 18. Izdvojeni dobiveni supernatanti od svakog otapala nakon centrifugiranja uzoraka. (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

3.4. Određivanje ukupne količine fenola, flavonoida i ne-flavonoida

3.4.1. Ukupni fenoli

Metoda koju sam koristila za određivanje koncentracije ukupnih fenola je kolorimetrijska reakcija Folin-Ciocalteu reagensa. Ova metoda se temelji na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) pri čemu dolazi do oksidacije i redukcije reagensa do plave boje. Time se omogućava mjerenje u vidljivom području spektra. Najprije sam razrijedila Folin-Ciocalteu reagens s vodom u omjeru 1:2. U staklenu bočicu od 25 mL (Slika 19. A) otpipetirala sam najprije 0,1 mL svog uzorka, zatim sam dodala 7,9 mL deionizirane vode, te na kraju 0,5 mL prethodno razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Dobivenu otopinu sam zatim dobro promiješala na vortex-u, te nakon 3 minute dodala 1,5 mL 20% otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Tako pripremljenu otopinu sam ostavila da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega sam prenijela u kivete i mjerila apsorbanciju pri 765 nm pomoću spektrofotometra (Slika 19. B). Slijepa proba je sadržavala sve reagense bez dodanog uzorka, a kao standard je korištena galna kiselina.



Slika 19. a) Prikaz korištenih staklenih bočica u kojima je pripravljena otopina, b) kivete s uzorcima prije mjerenja apsorbancije (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

3.4.1.1. Izrada baždarne krivulje galne kiseline:

Postupak izrade baždarnog dijagrama sam odrađivala po istom protokolu za određivanje ukupnih fenolnih spojeva u uzorku. Razlika je jedino u tome što sam umjesto uzorka dodavala galnu kiselinu poznate koncentracije. Mjerenja su provedena na 7 koncentracijskih razina u 3 ponavljanja, a na temelju dobivenih apsorbancija je napravljen graf standardne baždarne krivulje galne kiseline.



Slika 20. Prikaz izrađenih razrjeđenja za izradu baždarne krivulje galne kiseline (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

3.3.2. Ukupni ne-flavonoidi

Kako bi odredila koncentraciju ukupnih ne-flavonoida najprije sam u Eppendorf epruvete od 2 mL dodala 1 mL uzorka, 0,5 mL otopine klorovodične kiseline (razrijeđeno u omjeru 1:4 s vodom), te 0,5 mL formaldehida. Napravljenju otopinu sam ostavila da stoji preko noći u mraku, kako bi pomoću formaldehida koji reagira s flavonoidima i uzrokuje njihovu sedimentaciju, iste uklonila iz otopine. Zatim sam pomoću gore opisane metode za određivanje ukupnih fenola odredila ukupne ne-flavonoide u otopini.

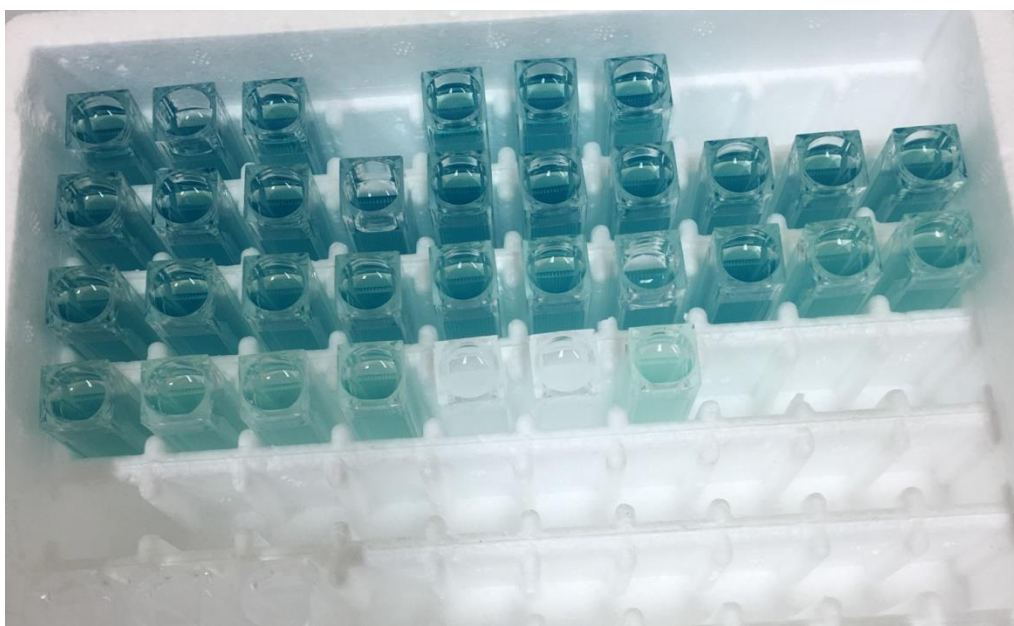
3.3.3. Ukupni flavonoidi

Ukupne flavonoide sam odredila tako da sam u 0,5 mL uzorka dodala 2,2 mL deionizirane vode i 0,15 mL 5% natrijevog nitrita, te vorteksirala otopinu. Nakon 6 minuta otopini sam dodala 0,15 mL 10 % aluminijevog klorida i ponovno vorteksirala. Šest minuta nakon dodavanja aluminijevog klorida dodala sam 2 mL 4% natrijevog hidroksida, vorteksirala i ostavila da odstoji 15 minuta na sobnoj temperaturi prije mjerenja na 510 nm. Kao ekvivalent za izradu standardne baždarne krivulje uzela sam katehin.

3.4. Mjerenje antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama

3.4.1. ABTS

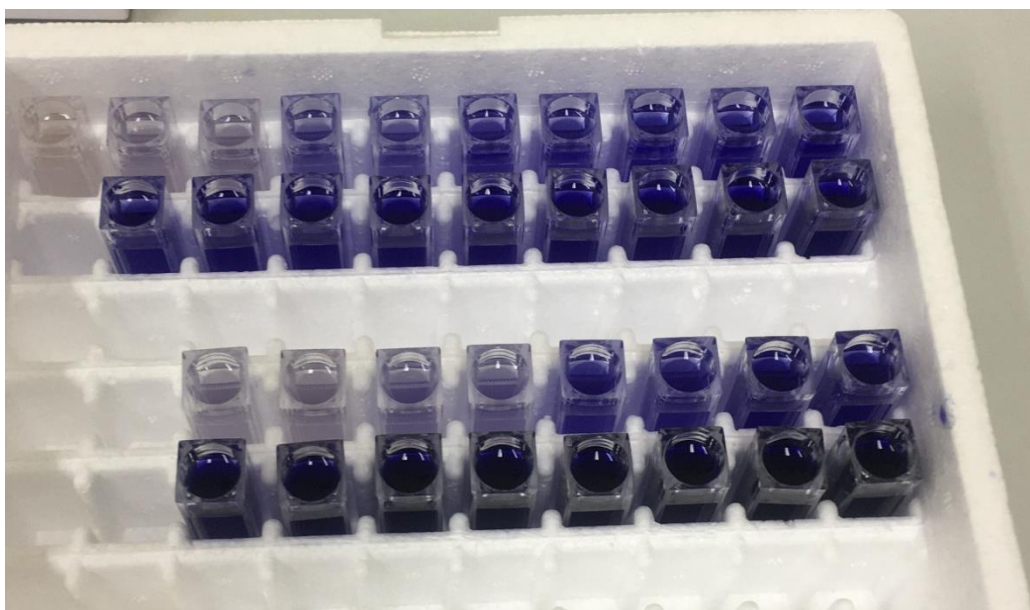
Za pripremu otopine ABTS+ radikala pomiješala sam 20 mL smjese ABTS reagensa (ABTS reagens ranije otopljen u deioniziranoj vodi) sa 352 μL 140 mM kalijevog peroksodisulfatom dan prije provođenja reakcije. Otopinu sam omotala aluminijskom folijom i držala preko noći u mraku iz razloga što je ABTS reagens vrlo nestabilan. Kalijev peroksodisulfat dovodi do oksidacije ABTS reagensa u ABTS+ radikal i nastaje plavo-zeleno obojenje otopine. Prije provođenja reakcije otopinu sam razrijedila 96% etanolom tako da apsorbancija iznosi $0,7 \pm 0,02$. Za provođenje reakcije sam u kiveti pomoću mikropipete pomiješala 20 μL uzorka sa 2 mL otopine ABTS+ radikala. Pomoću antioksidansa dolazi do redukcije ABTS+ radikala, što se očituje u nestanku boje u do tada plavo-zeleno obojenoj otopini (Slika 21.). Tu reakciju sam mjerila spektrofotometrijski na 734 nm, odmah po dodatku uzorka i 6 minuta nakon. Kao standard korišten je Trolox.



Slika 21. Prikaz reakcije antioksidansa sa ABTS+ radikalom (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

3.4.2. FRAP

Druga metoda koju sam koristila za određivanje antioksidativnog kapaciteta fenola bila je metoda FRAP. Ova metoda temelji se na redukciji željeza iz kompleksa Fe (TPTZ)^{3+} u kompleks Fe (TPTZ)^{2+} pomoću antioksidansa. Ovakva reakcija se odvija u kiselom mediju ($\text{pH}=3,6$) pri čemu otopina iz bezbojne prelazi u intenzivno plavu boju (Slika 22.).

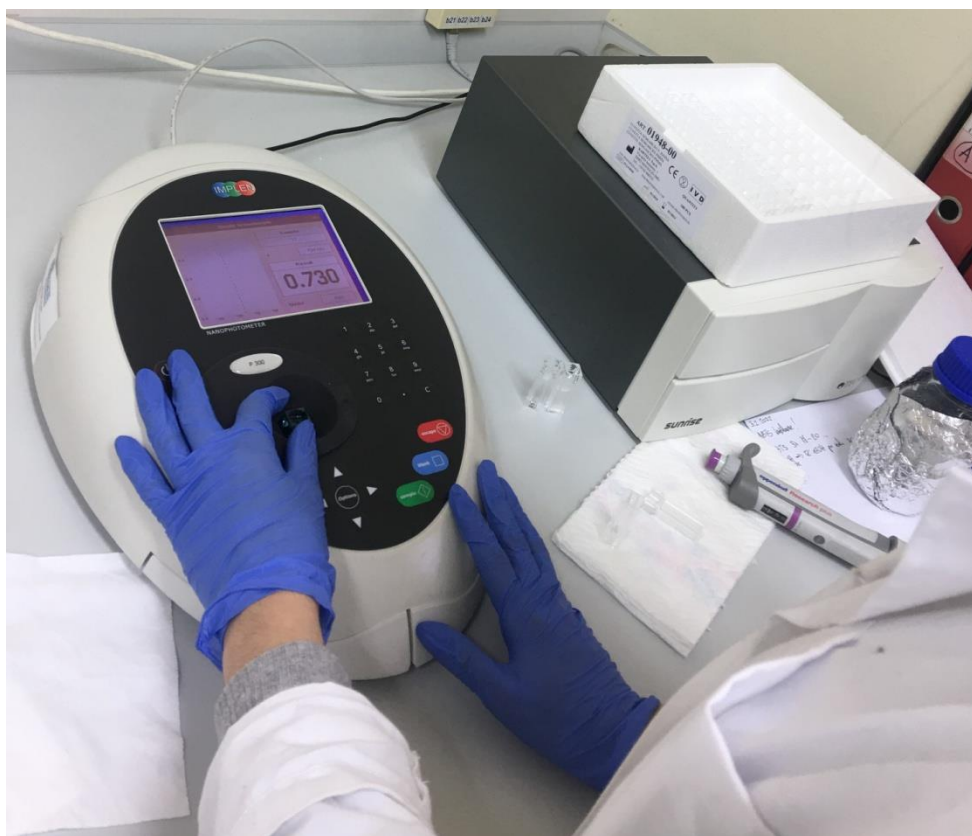


Slika 22. Prikaz rezultata za baždarnu krivulju FRAP metode (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

U ovoj metodi se koristi FRAP reagens koji se priprema miješanjem 300 mM acetatnog pufera, 10 mM TPTZ (2,4,6 – tripiridil – 1,3,5 – triazina) otopine i 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (željezo (III) klorid heksahidrat) u omjeru otopina 10:1:1. Za pripremu 70 ml 300 mM acetatnog pufera dodala sam 0,217 g natrij acetata trihidrata i 1,12 mL koncentrirane octene kiseline, te nadopunila do 70 mL deioniziranom vodom. Zatim sam otopila 10 mM TPTZ u otopini 40 mM klorovodične kiseline. Isti postupak sam ponovila i za 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ tako što sam ga otopila u deioniziranoj vodi. Kada je FRAP reagens pripremljen u kiveti sam pomiješala 100 μL uzorka sa 1900 μL FRAP reagensa. Apsorbanciju sam mjerila na 593 nm odmah nakon dodavanja uzorka u otopinu, te nakon točno 4 minute. Kod slijepe probe sam umjesto uzorka dodala 100 μL deionizirane vode sa FRAP reagensom. Kao standard je također korišten Trolox.

3.4.3. DPPH

DPPH metoda je kolorimetrijska reakcija antioksidansa s organskim radikalom. DPPH radikal posjeduje jedan nespareni elektron. Prilikom reakcije dolazi do redukcije DPPH radikala kada antioksidans donira vodik dušiku koji sadrži jedan nespareni elektron, a posljedica toga je promjena ljubičaste boje otopine u žutu. To smanjenje apsorbancije mjerila sam pri 517 nm spektrofotometrom (Slika 23.). Za provođenje reakcije dodala sam 1,95 ml 0,094 mM DPPH reagensa i 50 μ L uzorka, te vorteksirala. Nakon vorteksiranja sam otopinu ostavila u mraku, a rezultate sam očitavala nakon 30 minuta. Za slijepu probu je korišten metanol umjesto uzorka, dok je Trolox korišten kao standard.



Slika 23. Prikaz korištenog spektrofotometra (NanoPhotometer Implen P300 UV-Vis spektrofotometar) za očitavanje svih analiza (Izvor: vlastita fotografija ; slikano u laboratoriju Metris u Puli)

3.4.4. Izrada baždarnih krivulja za Trolox za sve tri metode

Najprije se pripremi osnovna otopina Trolox-a tako što se 0,0125 g Trolox-a otopi u 50 ml etanola. Zatim se rade razrjeđenja te otopine. Nadalje se baždarni dijagrami izrađuju prema istim protokolima od samih metoda za koje ih radimo, no umjesto dodavanja uzorka dodaje se otopina troloxa poznatih koncentracija.

3.5. Suha tvar

Prije svih gore navedenih metoda je bilo potrebno odrediti postotak suhe tvari u uzorku. Izvagala sam aluminijsku lađicu u kojoj će se uzorak sušiti kako njezina težina nebi imala utjecaj na rezultate. Nakon vaganja lađice sa uzorkom, uzorak je stavljen u sušionik na 105 °C te vagan ponovno nakon 24 h. Razlika u masi prije i nakon sušenja uzorka predstavlja masu isparene vode. Odradila sam 5 mjerenja svaka 24 h i rezultate unijela u excel tablicu. Udio suhe tvari u uzorku sam izračunala preko sljedeće formule:

$$\text{Udio suhe tvari u uzorku (\%)} = \frac{\text{masa uzorka prije sušenja}}{\text{masa uzorka nakon zadnjeg mjerenja}} * 100$$

3.6. Oprema

NanoPhotometer Implen P300 UV-Vis spektrofotometar, Njemačka

Sušionik Memmert UNB400, Njemačka

Analitička semi-mikro vaga Kern AEJ 200-5CM, Njemačka

Orbitalna miješalica inkubator Biosan ES-20, Latvija

Velp Scientifica OV5 homogenizator, Italija

Eppendorf 5430 R centrifuga, Njemačka

3.7. Kemikalije

99% 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (Acros Organics, Geel, Belgija),
98% željezo (III) klorid heksahidrat, krist. (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Njemačka),
36,5% min. klorovodična kiselina (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska),
≥99,8% bezv. octena kiselina (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Njemačka),
99+% natrij acetat trihidrat (Acros Organics, Geel, Belgija),
ABTS[®] BioChemica, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka),
99+% kalijev persulfat (Acros Organics, Geel, Belgija),
≥99,8% etanol (J.T. Baker[®], Avantor Performance Materials S.A., Arnhem, Nizozemska),
Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Velika Britanija), natrij karbonat, bezv. (Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Velika Britanija),
36% min. formaldehid (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska),
98,5% aluminijev klorid, bezv. (Acros Organics, Geel, Belgija),
97+% natrijev nitrit (Acros Organics, Geel, Belgija),
≥98% natrijev hidroksid zrnca (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

3.8. Standardi

željezo sulfat heptahidrat, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (≥99,5%, Acros Organics, Geel, Belgija), $M_r=278,02$ g/mol,
Trolox, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (97%, Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Njemačka), $M_r=250,29$ g/mol,
L-askorbinska kiselina, vitamin C, ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Supelco Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), $M_r=176,12$ g/mol
galna kiselina ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), (98%, Acros Organics, Geel, Belgija), $M_r=170,12$ g/mol
katehin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) (≥99%, Fluka Analytical, Taufkirchen, Njemačka), $M_r=290,27$ g/mol

4. REZULTATI

4.1. Morfometrija

Da bi se odredile odrasle jedinke potrebno je bilo provesti morfometrijska mjerenja školjkaša. Time je vidljivo kako srednja vrijednost ukupne mase školjkaša (TW) iznosi 16,81 g. Također, prema srednjoj vrijednosti dimenzija dužine ljuštura (SL) prosjek ukupnih dužina iznosi 50,63 mm, dok prosjek ukupne visine ljuštura (SH) iznosi 49,55 mm.

Kako je navedeno ranije u tekstu jedinke koje dosegnu 48-58 mm u dužinu, te 49-59 mm u visinu klasificiraju se kao odrasle jedinke. Na temelju rezultata može se zaključiti da su sve proučavane jedinke zaista dosegnule odraslu fazu života i kao takve bile pogodne za istraživanje.

Prosjek širina ljuštura (ST) svih uzorkovanih školjkaša iznosi 17,33 mm, te indeks kondicije (IK) 73,71 %.

Tablica 2. Prikaz morfometrijskih mjerenja sljedećih promatranih parametara: ukupna masa školjkaša (TW), dužina ljuštura (SL), visina ljuštura (SH), širina ljuštura (ST), te indeks kondicije (IK). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (AV) ± standardna devijacija (SD)

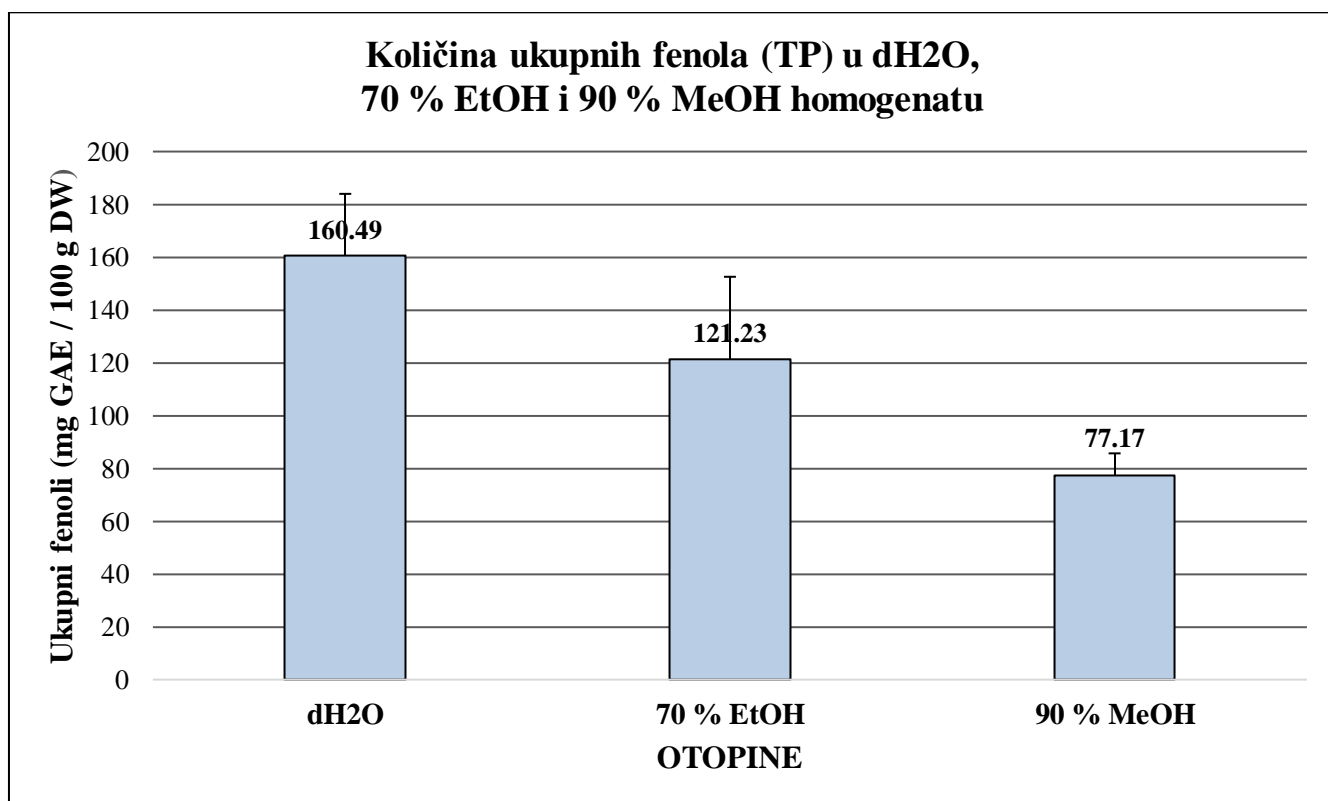
	AV (mm)	SD (mm)
SL	50,63 ± 3,89	
SH	49,55 ± 3,48	
ST	17,33 ± 1,64	
	AV	SD
TW (g)	16,81 ± 3,42	
IK (%)	73,71 ± 9,03	

4.2. Bioaktivne tvari

U ovom radu osim određivanja ukupne količine bioaktivnih tvari i njihovog antioksidacijskog kapaciteta spektrofotometrijskim metodama, jedan od ciljeva je i određivanje utjecaja otopina

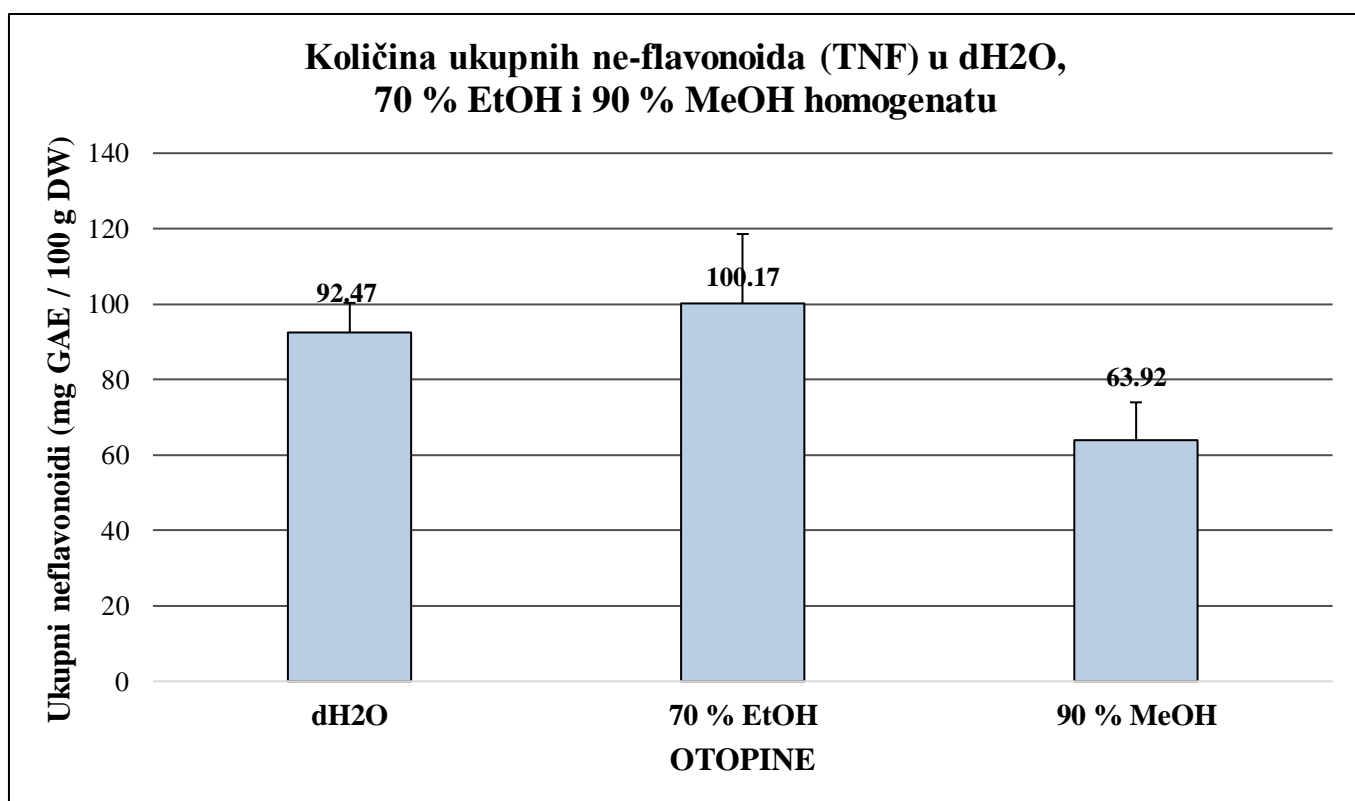
na ekstrakciju. Otapala koja su odabrana u ovome radu osiguravaju različitu ekstrakciju bioaktivnih spojeva na temelju čega će se usporediti antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati količine ukupnih fenola (TP), ne-flavonoida (TNF) i flavonoida (TF) u ovisnosti utjecaja tri različite otopine, vodena (dH₂O), etanolna (70 % EtOH) i metanolna (90 % EtOH) otopina.

Kada pozornost obratimo na ukupne fenole (TP), vidljivo je kako je najveća očitana vrijednost kod vodenog homogenata ($160,491 \pm 23,483$ mg GAE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0010x$, $R^2 = 0,9995$), zatim kod 70 % etanolnog homogenata ($121,227 \pm 31,341$ mg GAE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0004x$ $R^2 = 0,9991$), te najmanja kod 90 % metanolnog homogenata ($77,165 \pm 8,530$ mg GAE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0009x$ $R^2 = 0,9995$) (Slika 24.).



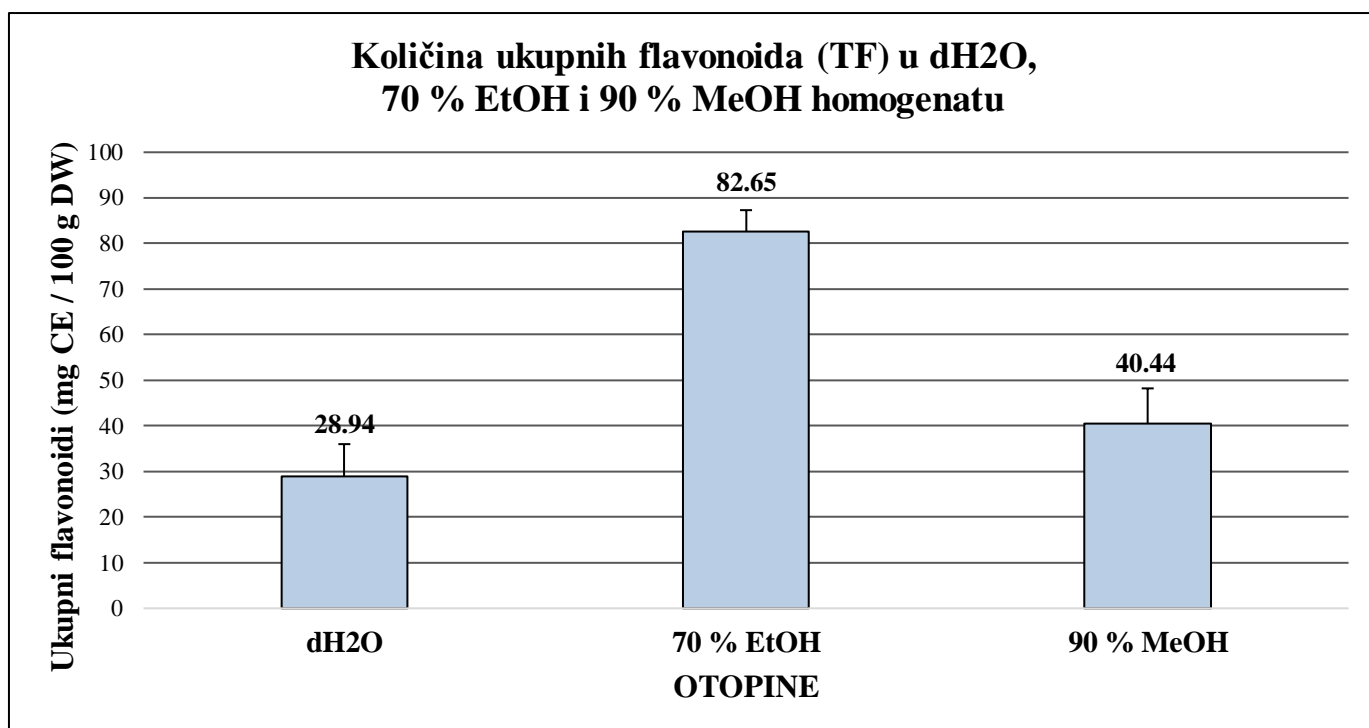
Slika 24. Količina ukupnih fenola (TP) u vodenom (dH₂O), etanolnom (70 % EtOH) i metanolnom (90 % EtOH) homogenatu izražena u obliku ekvivalenata galne kiseline na 100 grama suhe tvari uzorka (mg GAE / 100g DW). Sva mjerenja provedena su u triplikovima, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (\pm SD)

Dok, kod ukupnih ne-flavonoida (TNF) količina skače u etanolnoj otopini ($100,166 \pm 18,399$ mg GAE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0004x$ $R^2 = 0,9991$). Vrijednost kod vodene otopine sada je nešto malo manja u odnosu na ukupne fenole i pokazuje srednje očitavanje ($92,472 \pm 7,859$ mg GAE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0010x$, $R^2 = 0,9995$). Najmanja vrijednost je i u ovom slučaju očitana kod metanolne otopine ($63,924 \pm 10,031$ mg GAE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0009x$ $R^2 = 0,9995$) (Slika 25.). Dakle, kod ukupnih fenola i ukupnih ne-flavonoida rezultati su približni. Vodeni i etanolni ekstrakt imaju približne vrijednosti, a metanolni je konzistentno najmanjih vrijednosti.



Slika 25. Količina ukupnih ne-flavonoida (TNF) u vodenom (dH₂O), etanolnom (70 % EtOH) i metanolnom (90 % EtOH) homogenatu izražena u obliku ekvivalenata galne kiseline na 100 grama suhe tvari uzorka (mg GAE / 100g DW). Sva mjerenja provedena su u triplikatima, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (\pm SD)

Ukupni flavonoidi (TF) pokazuju najmanju vrijednost kod vodene otopine ($28,940 \pm 7,064$ mg CE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0.0036x$, $R^2 = 0.9999$), a najveću kod etanolne ($82,644 \pm 4,656$ mg CE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0024x$, $R^2 = 0.9993$). Metanolna otopina kod ukupnih flavonoida više ne pokazuje najmanju vrijednost kao kod ukupnih fenola i ukupnih ne-flavonoida, nego sada ima srednju vrijednost ($40,436 \pm 7,790$ mg CE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 0,0025x$, $R^2 = 0.9999$). Svaka od otopina pokazuje veću razinu ekstrahiranih ukupnih ne-flavonoida nego što ima ukupnih flavonoida (Slika 26.).

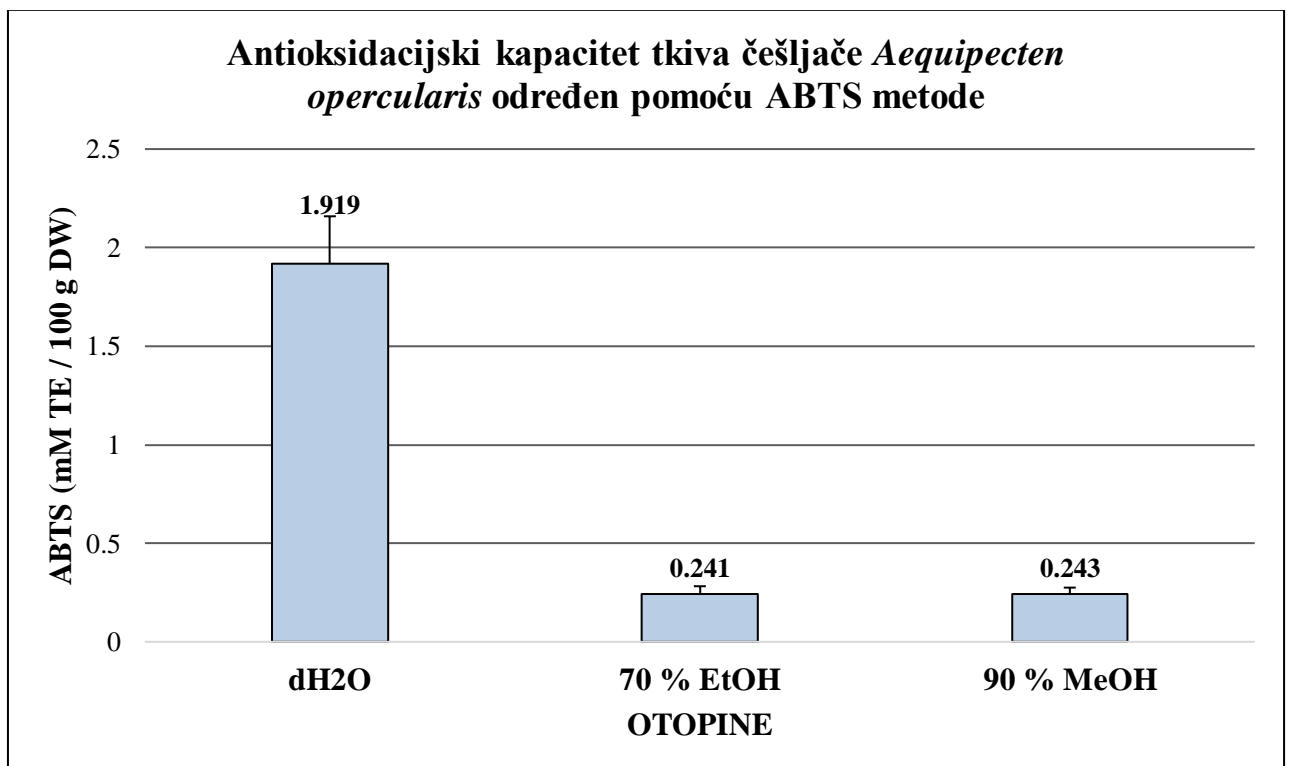


Slika 26. Količina ukupnih flavonoida (TF) u vodenom (dH₂O), etanolnom (70 % EtOH) i metanolnom (90 % EtOH) homogenatu izražena u obliku ekvivalenata katehina na 100 grama suhe tvari uzorka (mg CE / 100g DW). Sva mjerenja provedena su u triplikatima, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (\pm SD)

4.3. Antioksidacijski kapacitet

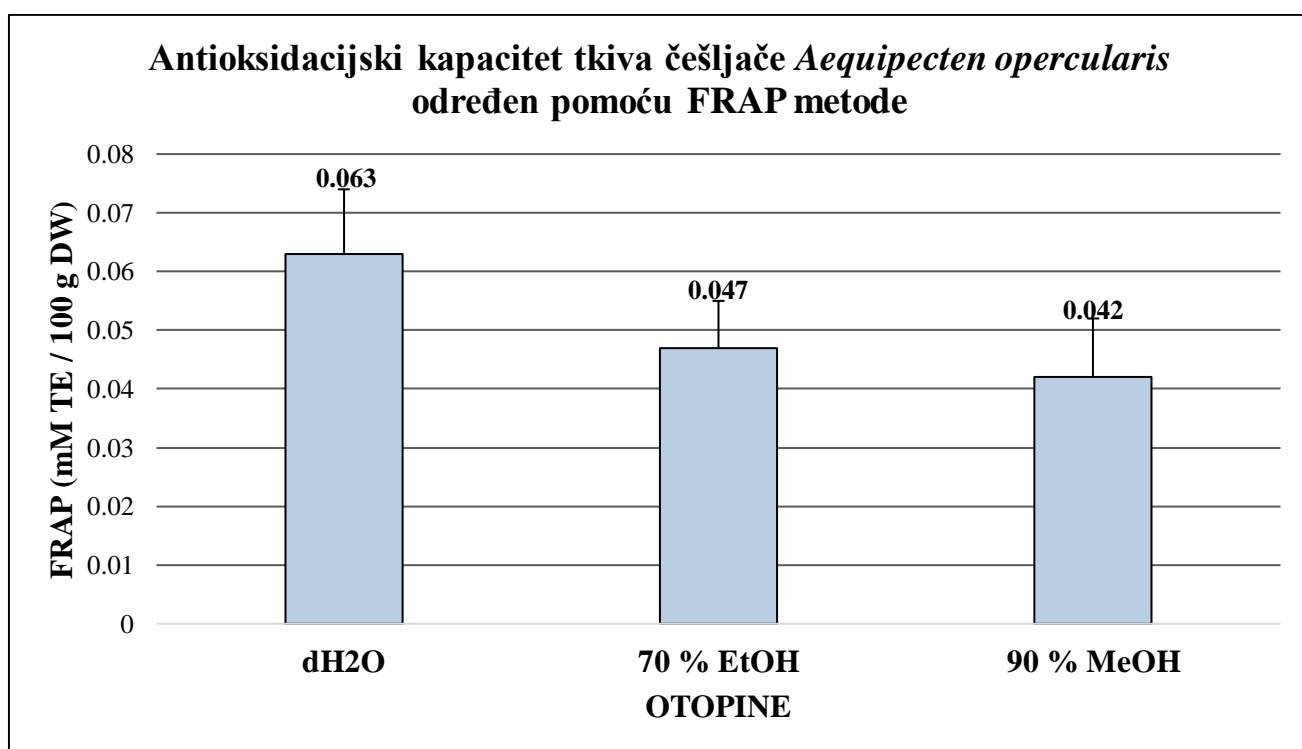
Kada gledamo antioksidacijski kapacitet po njemu se kod metode FRAP malo više ističe vodena otopina ($0,063 \pm 0,011$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 1,1426x$, $R^2 = 0,982$), a etanolna ($0,047 \pm 0,008$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 1,638x$, $R^2 = 0,992$) i metanolna ($0,042 \pm 0,010$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 1,4415x$, $R^2 = 0,972$) otopina su približno iste s vrijednostima (Slika 28.).

Vrijednosti vodene otopine su se pokazale znatno višima kod metode ABTS ($1,919 \pm 0,240$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 21,035x$, $R^2 = 0,987$) (Slika 27.) kao i kod metode DPPH ($1,503 \pm 0,305$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 30,948x$, $R^2 = 0,952$) u odnosu na druge dvije otopine.



Slika 27. Prikaz vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog pomoću metode ABTS u tri različita homogenata (voda – dH₂O, 70 % etanol (EtOH), 90 % metanol (MeOH)). Sva mjerenja provedena su u triplikatima, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (SE)

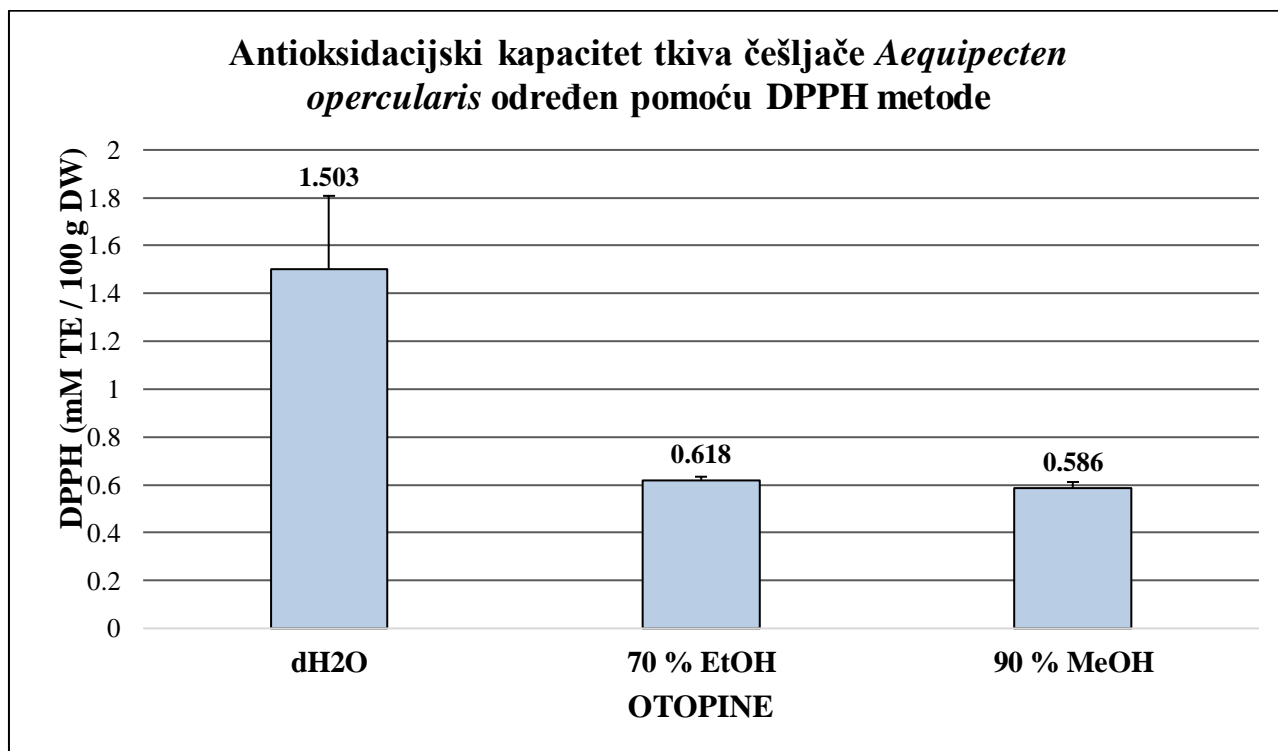
Kod metode ABTS etanolna ($0,241 \pm 0,041$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 33,245x$, $R^2 = 0,990$) i metanolna ($0,243 \pm 0,032$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 42,304x$, $R^2 = 0,990$) otopina pokazuju iznimno malu razliku u vrijednostima. Također isto se ponavlja i kod metode DPPH, gdje metanolna ($0,586 \pm 0,026$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 49,357x$, $R^2 = 0,996$) i etanolna ($0,618 \pm 0,016$ mM TE / 100g DW, pravac baždarne krivulje $y = 44,991x$, $R^2 = 0,997$) otopina imaju približne vrijednosti (Slika 29.).



Slika 28. Prikaz vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog pomoću metode FRAP u tri različita homogenata (voda – dH₂O, 70 % etanol (EtOH), 90 % metanol (MeOH)). Sva mjerenja provedena su u triplikovima, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (SE)

Dakle, može se zaključiti kako se kod antioksidacijskog kapaciteta u svim metodama ističe i najveću vrijednost pokazuje vodeni ekstrakt, dok druge dvije otopine imaju približne vrijednosti.

Što se tiče samih korištenih metoda kod metode FRAP su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta nešto niže u odnosu na metode ABTS i DPPH koje imaju približne vrijednosti otopina.



Slika 29. Prikaz vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog pomoću metode DPPH u tri različita homogenata (voda – dH₂O, 70 % etanol (EtOH), 90 % metanol (MeOH)). Sva mjerenja provedena su u triplikovima, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (SE)

5. RASPRAVA

Slobodni radikali (ROS) su široko rasprostranjeni spojevi koji su u isto vrijeme i iznimno štetni zbog svoje nestabilnosti i reaktivnosti. Stoga, nimalo ne čudi kako je njihova sveprisutnost doprinijela tomu da se antioksidansi koji djeluju protiv slobodnih radikala (Skrovankova i sur., 2015.) upotrebljavaju u gotovo svim industrijama kao mjera zaštite od utjecaja ROS-a (Mikucka i sur., 2022.). No do sada su u upotrebi pretežno prevladavali sintetički antioksidansi koji također mogu imati negativne posljedice na ljudsko zdravlje. Tu se javlja potreba za istraživanjem antioksidacijskog potencijala bioaktivnih tvari (Cartea i sur., 2011.). Jedna od najvažnijih skupina bioaktivnih tvari, upravo zbog svojih sposobnosti eliminiranja ROS-a su fenolni spojevi. Kako su fenolni spojevi u većoj mjeri prisutni u biljkama i algama, jako malo istraživanja se temelji na morskim organizmima. U novije je vrijeme potencijal morskih organizama za pronalazak novih bioaktivnih spojeva puno više prepoznat (Chakraborty i Joy, 2020.; Mateos i sur., 2020.; Ameen i sur., 2021.). Međutim istraživanja se više posvećuju organizmima kao što su spužve (Varijakzhan i sur. 2021.; Esposito i sur., 2022.; Karthikeyan i sur., 2022.), a najmanji broj njih je usredotočen na potencijal školjkaša (Krishnamoorthy i sur., 2022.).

U literaturi ne postoje usporedni podaci o kvantitativnom sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskom kapacitetu u ekstraktima tkiva morskih školjkaša, specifično češljače *A. opercularis*, dobivenih pomoću tri različite otopine (dH₂O, 70 % EtOH i 90 % MeOH) i spektrofotometrijske metode (ABTS, FRAP, DPPH). Krishnamoorthy i sur., (2022.) su se u svom radu koristili istim metodama i otopinama, no na vrsti *Perna viridis* (Linnaeus 1758). Stoga je u ovom diplomskom radu cilj bio promotriti upravo to, odnosno odrediti kroz analizu podataka koja od korištenih otopina, odnosno metoda je najefikasnija za ekstrakciju fenolnih spojeva iz tkiva i istražiti antioksidacijski potencijal tkiva ove vrste za ljudsku konzumaciju.

Određivanje količine fenolnih spojeva bilo je nužno za analizu antioksidacijskog kapaciteta. U literaturi se navode različite metode ekstrakcije fenolnih spojeva koje se uglavnom odnose na ekstrakciju iz biljnih tkiva. Krishnamoorthy i sur. (2022.) u svom su radu analizu vršili specifično za morske školjkaše (*P. viridis*) i ustanovili su kako je metoda ekstrakcije homogenizacijom životinjskog tkiva (ATH) osigurala najbolje rezultate za takvu vrstu supstrata.

U ovom je radu korištena ATH metoda ekstrakcije upravo iz sljedećih razloga: zbog vrste supstrata koji je korišten u ovome radu, te jer pokazuje visoku efikasnost i omogućava postizanje kvalitetnijih rezultata. Pokazalo se je kako u tkivu *A. opercularis* ima više ne-flavonoida (TNF) nego flavonoida (TF) u sva tri korištena otapala. Flavonoidi u biljkama čine većinski dio fenolnih spojeva (Machu i sur. 2015.). Dok su istraživanja kod crvenih, smeđih i zelenih algi također pokazala prevladavanje TNF u odnosu na TF (Zhong i sur., 2020.). Dakle, dalo bi se pretpostaviti kako bi u budućnosti školjkaši mogli služiti kao izvor ne-flavonoida s obzirom da standardni dosad korišteni izvori fenolnih spojeva kao što su biljke dominantno sadrže flavonoide. Ne-flavonoidi ili fenolne kiseline dokazano pomažu kod kardiovaskularnih (Shafreena i sur., 2020.) i neuroloških bolesti (Nabavi i sur., 2017.; Heitman i Ingram, 2017.), te sprječavaju razvoj dugotrajnih komplikacija dijabetesa (Lin i sur. 2016.).

Osim metode ekstrakcije na kvalitetu rezultata antioksidacijskog kapaciteta i količinu dobivenih fenola utječe i niz drugih ključnih faktora kao što su temperatura, vrsta korištenih otapala, korištene metode analize, te kemijski sastav samog supstrata koji se analizira.

Mikucka i sur. (2022.) su ustanovili da kako je temperatura kojoj su uzorci tijekom ekstrakcije bili izlagani rasla, tako je posljedično tome dobivena količina ukupnih fenola bila niža i obrnuto. Raspon temperatura kojima su izlagali svoje ekstrakte kretao se od 25 °C do 260 °C. S obzirom na to da se zaključiti kako je utjecaj temperature na ekstrakciju fenolnih spojeva u ovome radu bio iznimno povoljan. Ekstrakti su ostavljani na sobnoj temperaturi (20 °C – 22 °C), po kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa za TP i TNF na 2 sata, a po metodi reakcije s aluminijskim kloridom TF na 15 minuta. Koliko dugo su vremenski ekstrakti bili izlagani određenoj temperaturi nije toliko značajno kao kolika je visina temperature bila (Mikucka i sur., 2022.).

Razlog osjetljivosti fenolnih spojeva na povećanje temperature može biti upravo njihova kemijska struktura. Pri povećanju temperature dolazi do degradacije termalno nestabilnih fenolnih spojeva (Calinoiu i sur., 2020.).

Kako sam navela osim temperature, jedan od faktora koji utječu na uspješnost ekstrakcije je i vrsta otapala - točnije polarnost odabranih otapala (Do i sur., 2013.). Glavni razlog tomu je širok raspon polarnosti fenolnih spojeva koje se kreću od polarnih do nepolarnih, zbog njihovih različitih molekularnih struktura i svojstava (Awika i sur., 2003.; Dent i sur., 2013.). Polarnost otapala vrlo je važna u pogledu efikasne topljivosti fenola prilikom ekstrakcije.

Kako bih ustanovila koja je otopina najpogodnija za ekstrakciju fenolnih spojeva koristila sam vodu, 70 % etanol i 90 % metanol. Voda je odabrana kao najpolarnije otapalo, zatim slijedi metanol i na kraju kao najmanje polaran od tri je etanol. Rezultati dobiveni u ovome radu pokazuju kako su vrijednosti ukupnih fenola (TF) najveće u vodenoj otopini. Zatim slijedi etanol i na kraju metanol kao otopina s najmanjim vrijednostima TF. U radu koji su proveli Mikucka i sur. (2022.) dobiveni rezultati se slažu s onim dobivenima u ovome radu. Krishnamoorthy i sur., (2022.) čije istraživanje je najbližnje ovome radu također potvrđuju vodeni ekstrakt kao najuspješniji. To također korespondira s rezultatima antioksidacijskog kapaciteta, koji u svim korištenim metodama dosljedno pokazuju kako najveću vrijednost iskazuje vodeni ekstrakt.

Ovakvi rezultati su vrlo optimistični u pogledu korištenja ekstrakata fenolnih spojeva za ljudsku konzumaciju. Osim što je ustanovljeno kako tkivo češljače ima određeni antioksidacijski kapacitet, također je i vodena otopina puno zdravija i pogodnija za ljudsku upotrebu od čistog etanola ili metanola. Rezultati nekih drugih istraživanja pokazali su kako je korištenje miješanih otopina kao primjerice određenog omjera vode i etanola bolje nego korištenje samo vode ili etanola kao zasebnih otapala (Dent i sur., 2013.; Do i sur., 2013.; Mikucka i sur., 2022.b).

Količina fenolnih spojeva u uzorku, a samim time i antioksidacijska aktivnost uzorka se mijenja s obzirom na korištenu metodu analize. Ujedno svaka metoda ima svoje prednosti, no i nedostatke. Stoga kako bi rezultati bili što precizniji i točniji korišteno je više različitih metoda. Metode ABTS, FRAP i DPPH odabrane su zbog svoje jednostavnosti pri korištenju i brzih rezultata. Osim toga u široj su upotrebi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, što pak olakšava usporedbu podataka s ostatkom literature. Za vodeni ekstrakt rezultati antioksidacijskog kapaciteta dobiveni ABTS metodom su pokazali najveće vrijednosti, zatim slijede rezultati dobiveni primjenom DPPH metode, dok su FRAP metodom dobivene najmanje vrijednosti. Kod etanolnog i metanolnog ekstrakta DPPH metoda ima najveće vrijednosti, zatim slijedi ABTS metoda s nešto manjim vrijednostima i ponovno metoda FRAP s najnižim vrijednostima. Dakle, metode ABTS i DPPH imaju približne vrijednosti otopina. Ovakve rezultate su u svom istraživanju potvrdili i Mikucka i sur. (2022.) koji su koristili kao otapalo vodu.

Različiti mehanizam reakcije ovih metoda može imati utjecaj na dobivene rezultate. Mehanizam na kojemu se temelje reakcije ABTS metode je prijenos atoma vodika (eng.

hydrogen atom transfer - HAT), a metoda DPPH i FRAP je prijenos jednog elektrona (eng. *single electron transfer* - SET) (Mikucka i sur., 2022.).

Mateos i sur. (2020.) su iznijeli pretpostavku kako je proizvodnja fenolnih spojeva kod morskih organizama rezultat odgovora na vanjske stresore poput promjene saliniteta, pH, svjetlosti ili temperature. Školjkaši su filtratorski organizmi, stoga se može konstatirati kako su fenolni spojevi unutar njihova tkiva prisutni zbog načina prehrane, odnosno tijekom filtriranja vode pojedinih čestica algi. S obzirom da je u radu korišteno ukupno tkivo školjkaša, pa samim time i dijelovi koji služe pri hranjenju, postoji mogućnost da je to utjecalo i na same rezultate.

Ovaj rad je pridonijeo neke osnovne informacije o uspješnosti otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva i pogodnosti tog otapala za ljudsku konzumaciju. Osim toga, dokazao je kako fenolni spojevi kao bioaktivne tvari koje se nalaze u školjkašima imaju potencijal za korištenje u svrhu antioksidacijske obrane organizma.

Za bolje razumijevanje bilo bi također poželjno kvalitativno odrediti sadržaj fenolnih spojeva. Identifikacija pronađenih spojeva bi omogućila osvjetljavanje njihovih točnih funkcija u organizmu, te kasnije korištenje za specifične ljudske potrebe.

Istraživanja na ovu temu su iznimno malobrojna. Kako utjecaj klimatskih promjena sve više raste, to ujedno dovodi do porasta temperatura mora i smanjenja pH. Dakle, pritisak na morske zajednice će se samo povećavati, a ponajviše na školjkaše. Svakako bi bilo potrebno provesti još istraživanja kako bi se ustanovio odgovor školjkaša na takve promjene, te imaju li fenolni spojevi pronađeni u njima utjecaj na regulaciju stresa i zaštitu od ROS-a dugoročno gledano.

Također bi bilo potrebno detaljnije istražiti ne-flavonoide i njihov utjecaj na ljudsko zdravlje, s obzirom da se je u ovome radu pokazalo kako ne-flavonoida u školjkašima ima nešto više u odnosu na flavonoide.

6. ZAKLJUČAK

- 1.) U tkivu češljače *A. opercularis* kod sva tri korištena otapala (dH₂O, 70 % EtOH, 90 % MeOH) rezultati pokazuju kako su vrijednosti ne-flavonoida (TNF) veće nego vrijednosti flavonoida (TF).
- 2.) Fenolni spojevi, pronađeni u homogenatima tkiva češljače *A. opercularis* pokazuju potencijal da se koriste kao antioksidansi za ljudsku konzumaciju.
- 3.) Metoda ABTS pokazivala je najbolje rezultate, no metoda DPPH je bila približnih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kao kod metode ABTS sa manjim razlikama. Rezultati FRAP metode su kod svih otopina pokazivali najmanji antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva u tkivu češljače.
- 4.) Otopina koja se pokazala najefikasnijom za ekstrakciju fenolnih spojeva bila je deionizirana voda. Zatim je po efikasnosti slijedio etanol i na kraju metanol. Ovakav ishod zapravo je prilično obećavajući s obzirom da je voda kao otapalo najkompatibilnija i sigurnija za korištenje kod ljudske konzumacije.

7. LITERATURA

- Ali, S., S., Ahmad, W., A., N., W., Budin, S., B., Zainalabidin, S., (2020.) Implication of dietary phenolic acids on inflammation in cardiovascular disease. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 21(2):225–240.
- Ameen, F., AlNadhari, S., Al-Homaidan, A. A., (2021.) Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1):224–231.
- Anbudhasan, P., Surendraraj, A., Karkuzhali, S., Satishkumaran, S., (2014.) Natural Antioxidants And Its Benefits. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 3:226-232.
- Andrés-Lacueva, C., Chiva-Blanch, G., Khan, N., Lamuela-Raventós, R. M., Llorach, R., Medina-Reimon, A., Rotches-Ribalta, M., Urpi-Sarda, M., Zamora, R., (2010.) *Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables*. U: *Fruit and vegetable phytochemicals*. Wiley-Blackwell, New Delhi.
- Angiolillo, L., Del Nobile, M.A., Conte, A., (2015.) The extraction of bioactive compounds from food residues using microwaves. *Current Opinion in Food Science*, 5(2):93-98.
- Awika, J., M., Rooney, L., W., Wu, X., Prior, R., L., Cisneros-Zevallos, J., (2003.) Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(23):6657–6662.
- Aydin, S., (2020.) Total Phenolic Content, Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities, FT-IR ANALYSES of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* and *Ornithogalum umbellatum* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 72(2), 341–345.
- Azizkhani, M., Zandi, P., (2009.) Effects of some natural antioxidants mixtures on margarine stability. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 3(1):53-56.
- Berik, N., Çankiriligil, E. C., Gül, G., (2017.) Meat Yield and Shell Dimension of Smooth Scallop (*Flexopecten glaber*) Caught from Çardak Lagoon in Canakkale, Turkey. *Journal of Aquaculture and Marine Biology*, 5(3):82-85.

- Biskup, I., Golonka, I., Gamian, A., Sroka, Z., (2013.) Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67:958-963.
- Brand, A. R., (2006.) Chapter 12 Scallop ecology: distributions and behaviour. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 35:651-744.
- Burda, S., Oleszek, W., (2001.) Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6):2774–2779.
- Calinoiu, L., F., Vodnar, D., C., (2020.) Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran. *Biomolecules*, 10(1):1-21.
- Canesi, L., (2014.) Pro-oxidant and antioxidant processes in aquatic invertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1):1-7.
- Carson, M., Clarke, S.A., (2018.) Bioactive Compounds from Marine Organisms: Potential for Bone Growth and Healing. *Marine Drugs*, 16(9):340.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P., (2011.) Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16:251-280.
- Chakraborty, K., Joy, M., (2020.) High-value compounds from the molluscs of marine and estuarine ecosystems as prospective functional food ingredients: An overview. *Food Research International*, 137:1-36.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T. i Levaj, B., (2013.) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis L.*) Extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1):84-91.
- Do, Q., D., Angkawijaya, A., E., Tran-Nguyen, P., L., Huynh, L., H., Soetaredjo, F., E., Ismadji, S., Ju, Y., H., (2013.) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Linnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3):296-302.

- El Gharras, H., (2009.) Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12):2512–2518.
- Esposito, R., Federico, S., Bertolino, M., Zupo, V., Costantini, M., (2022.) Marine Demospongiae: A Challenging Treasure of Bioactive Compounds. *Marine Drugs*, 20(4):244.
- Gonçalves, S., Romano, A., (2017.) Inhibitory Properties of Phenolic Compounds Against Enzymes Linked with Human Diseases. U: Phenolic Compounds - Biological Activity (SotoHernandez, M., Palma-Tenango, M., Garcia-Mateos M. d. R., Eds). IntechOpen, 100-1.
- Griffin, S., P., Bhagooli, R., (2004.) Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302:201–211.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., (2002.) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10):572-584.
- Heitman, E., Ingram, D., K., (2017.) Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutritional Neuroscience*, 20(1):32-39.
- Huyut, Z., Beydemir, F., Gülçin, E., (2017.) Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*, 1-10.
- Iturria, M., S., Caladob, C., M., B., Prentice, C., (2021.) Microparticles of *Eugenia stipitata* pulp obtained by spray-drying guided by DSC: An analysis of bioactivity and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 334:1-11.
- Jenkins, S. R., Lart, W., Vause, B. J., Brand, A. R., (2003.) Seasonal swimming behaviour in the queen scallop (*Aequipecten opercularis*) and its effect on dredge fisheries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 289(2):163–179.
- Jing, L., Ma, H., Fan, P., Gao, R., Jia, Z., (2015.) Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15:1-12.
- Johnson, A. L. A., Hickson, J. A., Swan, J., Brown, M. R., Heaton, T. H. E., Chenery, S., Balson, P. S., (2000.) The Queen Scallop *Aequipecten opercularis*: a new source of information on late

Cenozoic marine environments in Europe. Geological Society, London, Special Publications, 177(1):425–439.

Kamenos, N.A., Moore, P.G., Hall-Spencer, J.M., (2004.) Maerl grounds provide both refuge and high growth potential for juvenile queen scallops (*Aequipecten opercularis* L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 313(2):241–254.

Karthikeyan, A., Joseph, A., Nair, B.,G., (2022.) Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 20(14): 1-38.

Kris-Etherton, P.M., Lefevre, M., Beecher, G., Gross, M., Keen, C., Etherton, T.D., (2004.) Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. Annual review of nutrition, 24(1):511-538.

Krishnamoorthy, V., Chuen, L. Y., Sivayogi, V., Kathiresan, S., Bahari, M. B., Raju, G., Parasuraman, S., (2019.) Exploration of antioxidant capacity of extracts of *Perna viridis*, a marine bivalve. Pharmacognosy Magazine, 15(66):402-409.

Kumar, N., Goel, N., (2019.) Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports, 24:1-27.

Kumar, S., Pandey, A. K., (2013.) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal, 2013:1-16.

Labieniec, M., Gabryelak, T., (2007.) Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu²⁺ ions. Toxicology in Vitro, 21:146–156.

Laming, S. R., Jenkins, S. R., McCarthy, I. D., (2013.) Repeatability of escape response performance in the queen scallop, *Aequipecten opercularis*. Journal of Experimental Biology, 216(17):3264–3272.

Lima, I., Moreira, S., M., Osten, J., R., V., Soares, A., M., V., M., Guilhermino, L., (2007.) Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical

environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere*, 66:1230–1242.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., Chen, S., (2016.) An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*, 21(10):1374.

Ling, A., L., M., Yasir, S., M., Matanjun, P., Abu Bakar, M., F., (2013.) Antioxidant activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents of Selected Commercial Seaweeds of Sabah, Malaysia. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 3(3): 234-238.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., (2010.) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8):118–126.

Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J., V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T., (2015.) Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. *Molecules*, 20:1118-1133.

Mamelona, J., Pelletier, E., Girard-Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S., Kermasha, S., (2007.) Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104: 1040–1047.

Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., (2005.) The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 2(2):91-104.

Mateos, R., Pérez-Correa, J. R., Domínguez, H., (2020.) Bioactive Properties of Marine Phenolics. *Marine Drugs*, 18(10):2-58.

Mikucka, W., Zielinska, M., Bulkowska, K., Witonska, I., (2022.) Subcritical water extraction of bioactive phenolic compounds from distillery stillage. *Journal of environmental management*, 318:1-12.

Mikucka, W., Zielinska, M., Bulkowska, K., Witonska, I., (2022.) Recovery of polyphenols from distillery stillage by microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional solid-liquid extraction. *Scientific Reports*, 12:1-3232.

Minatel, I. O. , Borges, C. V. , Ferreira, M. I. , Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., Lima, G. P. P, (2017.) Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. U: Phenolic Compounds - Biological Activity (Soto-Hernandez, M., PalmaTenango, M., Garcia-Mateos M. d. R., Eds). IntechOpen, 1-24.

Minh Van, C., Van Kiem, P., Dang Hai, N., (2005.) Marine Natural Products and their Potential Application in the Future. ASEAN Journal on Science and Technology for Development, 22(4): 297-311.

Moharram, H., A., Youssef, M., M., (2014.) Methods for determining the antioxidant activity: a review. Alexandria Journal of Food Science and Technology, 11(1):31-42.

Mosunova, O., Navarro-Munoz, J., Collemare, J., (2021.) The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. Encyclopedia of Mycology, 2:458-476.

Nabavi, S., F., Tejada, S., Setzer, W., N., Gortzi, O., Sureda, A., Braidly, N., Nabavi, S., M., (2017.) Chlorogenic acid and mental diseases: from chemistry to medicine. Current Neuropharmacology, 15(4):471-479.

Outeiro, L., Otero, J., Alonso-Fernández, A., Bañón, R., Palacios-Abrantes, J., (2021.) Quantifying abundance trends and environmental effects on a population of queen scallop *Aequipecten opercularis* targeted by artisanal fishers in a coastal upwelling area (Ría de Arousa, NW Spain) using a Bayesian spatial model. Fisheries Research, 240:1-11.

Paul, A., A., Osoniyi, O., R., Eghianruwa, Q., A., Oparinde, O., G., Adesina, A., S., (2021.) Antioxidant activity of the simulated gastro-intestinal digestion hydrolysate of two edible Nigerian marine molluscs: *Tympanotonus fuscatus* var. *radula* (L.) and *Pachymelania aurita* (M.). International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 12(1):8-16.

Rahman, M.A., Henderson, S., Miller-Ezzy, P.A., Li, X.X., Qin, J.G., (2020.) Analysis of the seasonal impact of three marine bivalves on seston particles in water column. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 522:1-10.

- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., Gupta, S., (2013.) Antimicrobial, antioxidant and free radical scavenging capacity of brown seaweed *Himanthalia elongata* from Western Coast of Ireland. *Journal of Food Biochemistry*, 37(3):322-335.
- Román-Cabello, G., Campos-Loriz, M.J., Acosta, C.P., Canoura, J., (1999.) Growth of the queen scallop (*Aequipecten opercularis*) in suspended culture: influence of density and depth. *Aquaculture*, 178:43–62.
- San Miguel-Chávez, R., (2017.) Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. U: Phenolic Compounds - Biological Activity (Soto-Hernandez, M., Palma-Tenango, M., Garcia-Mateos M. d. R., Eds). IntechOpen, 60-74.
- Sansone, C., Brunet, C., (2019.) Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 8(7):199.
- Schmidt, M., Philipp, E. E. R., Abele, D., (2008.) Size and age-dependent changes of escape response to predator attack in the Queen scallop (*Aequipecten opercularis*). *Marine Biology Research*, 4(6):442–450.
- Schreiber, S. B., Bozell, J. J., Hayes, D. G., Zivanovic, S., (2013.) Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 33(2):207–214.
- Shahidi, F., Zhong, Y., (2007.) Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. *ACS Symposium Series*, 956(4):36-66.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H., Kang, C. M., (2008.) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4(1):8-14.
- Shumway, E., Parsons, G., (2016.) *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*, Third Edition, 40:1216.
- Sinko, J., Rajchard, J., Balounova, Z., Fikotova, L., (2012.) Biologically active substances from water invertebrates: a review. *Veterinární Medicína*, 57(4):177–184.

Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J., (2015.) Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10):24673-24706.

Stephens, P. J., Boyle, P. R., (1978.) Escape responses of the queen scallop (*Chlamys opercularis*) (L.) (Mollusca: Bivalvia). *Marine Behaviour and Physiology*, 5(2):103–113.

Strahl, J., Abele, D., (2010.) Cell turnover in tissues of the long-lived ocean quahog *Arctica islandica* and the short-lived scallop *Aequipecten opercularis*. *Marine Biology*, 157:1283–1292.

Taylor, A. C., Venn, T. J., (1979.) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of the queen scallop, *Chlamys opercularis*, from the Clyde Sea area. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(3):605–621.

Varijakzhan, D., Loh, J., Y., Yap, W., S., Yusoff, K., Seboussi, R., Lim, S., HE., Lai, K., S., Chong, C., M., (2021.) Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine Drugs*, 19(5):246.

Vidal, M. L., Bassères, A., Narbonne, J. F., (2002.) Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology and Pharmacology*, 131(2);133–151.

Villano, D., Fandez-Pachon, M., S., Troncoso, A., M., Garcia-Parrilla M., C., (2005.) Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta* 538: 391–398.

Zaragozá, M. C., López, D., Sáiz, M. P., Poquet, M., Pérez, J., Puig-Parellada, P., Màrmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., Mitjavila, M. T., (2008.) Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17):7773–7780.

Zhong, B., Robinson, N., A., Warner, R., D., Barrow, C., J., Dunshea, F., R., Suleria, H., A., R., (2020.) LC-ESI-QTOF-MS/MS Characterization of Seaweed Phenolics and Their Antioxidant Potential. *Marine Drugs*, 18:331.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 06.03.1996. u Slavonskom Brodu. Osnovnu školu Ivana Kozarca sam završila u Županji 2010. godine, nakon čega upisujem strukovnu srednju školu za odjevnog tehničara u Obrtničko-industrijskoj školi. Zatim 2015. godine upisujem prediplomski studij Znanosti o moru na Sveučilištu „Jurja Dobrile“ u Puli. Studij Znanosti o moru završila sam 2019. godine, s temom „Usporedba morfometrijskih odnosa i indeksa kondicije dagnje *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. s područja Rovinja u Sjevernom Jadranu“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Ines Kovačić. Te iste godine upisujem diplomski studij ekologije i zaštite prirode na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovala sam na manifestacijama poput Europske noći istraživača, kao i na prvoj međunarodnoj studentskoj GREEN konferenciji u Osijeku na kojoj je objavljeni rad ”Plava revolucija”- novi korak prema održivoj budućnosti osvojio drugo mjesto. Radila sam također na inventarizaciji zoološke zbirke u Centru za istraživanje mora u Rovinju.