

PROFIL VRŠNIH PARA SMEĐE ALGE CYSTOSEIRA COMPRESSA: USPOREDBA NAČINA SUŠENJA

Tadić, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:746196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**PROFIL VRŠNIH PARA SMEĐE ALGE *CYTOSEIRA COMPRESSA*:
USPOREDBA NAČINA SUŠENJA**

DIPLOMSKI RAD

VEDRAN TADIĆ

Matični broj: 256

Split, listopad 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

**PROFIL VRŠNIH PARA SMEĐE ALGE *CYTOSEIRA COMPRESSA*:
USPOREDBA NAČINA SUŠENJA**

DIPLOMSKI RAD

VEDRAN TADIĆ

Matični broj: 256

Split, listopad 2023.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNIVERSITY GRADUATE STUDY IN CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**HEADSPACE PROFILE OF THE BROWN ALGA *CYTOSEIRA COMPRESSA*:
COMPARISON OF DRYING METHODS**

MASTERS THESIS

VEDRAN TADIĆ

Parent number: 256

Split, October 2023.

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije : Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Mentor: dr. sc. Sanja Radman

PROFIL VRŠNIH PARA SMEĐE ALGE *CYTOSEIRA COMPRESSA*: USPOREDBA NAČINA SUŠENJA

Vedran Tadić, 256

Sažetak: Alge su skupina pretežno vodenih, fotosintetskih autotrofnih organizama. Većina algi žive u morima i oceanima dok preostali dio predstavljaju slatkovodne alge. Na osnovu fotosintetskih pigmenata alge dijelimo na smeđe, crvene i zelene. Smeđe alge sadrže pigment fukoksantin koji je zaslužan za njihovu zelenkasto-smeđu boju. Biološki su aktivne što je rezultat prisutnosti mnogih aktivnih spojeva primjerice fukoidana, sulfatiranog polisaharida koji je smješten u staničnoj stjenci smeđih algi. Rod *Cystoseira* obuhvaća oko 294 vrste i jedan je od najznačajnijih u obitelji Sargassaceae (nastala spajanjem obitelji Sargassaceae i Cystoseiraceae). Alga *Cystoseira compressa* pripada u razred Phaeophyceae, red Fucales te u rod *Cystoseira*. Cilj ovog rada bio je provesti analizu vršnih para alge *C. compressa* upotrebom GC-MS sustava sušene na tri različita načina. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi ekstrahirane su vršne pare uzoraka na DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlaknima radi potpunijeg profila vršnih para. Usporedbom dobivenih rezultata primijećeno je da u odnosu na sušene uzorke, svježiji uzorci pokazuju višu koncentraciju terpena, norizoprenoida i alifatskih zasićenih spojeva, ali manju koncentraciju alifatskih nezasićenih spojeva. Iako se ukupni postotak identificiranih isparljivih organskih spojeva nije drastično razlikovao s obzirom na tehnike sušenja, primjetne su razlike u zastupljenosti određenih skupina spojeva. Uzorak sušen u pećnici pokazuje veću zastupljenost alifatskih zasićenih spojeva i terpena u usporedbi s liofiliziranim uzorkom, dok liofilizirani uzorak ima viši udio derivata benzena. Okt-1-en-3-ol je najzastupljeniji spoj u sušenim uzorcima izoliranim s oba tipa vlakana, dok ga je u svježem uzorku ima od 1,6-2,5 puta manje. U svježem uzorku, izoliranom na DVB/CAR/PDMS vlaknu, najdominantniji spoj je bio norizoprenoid β -jonon, čija se koncentracija smanjuje 5,9 do 6,9 puta nakon procesa sušenja.

Ključne riječi: HS-SPME, isparljivi organski spojevi, GC-MS

Rad sadrži: 48 stranica, 15 slika, 1 tablica, 74 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Marijanović Zvonimir
2. doc.dr.sc. Zekić Marina
3. dr. sc. Sanja Radman

Datum obrane: 25. listopada 2023.

Rad je u tiskanom i električnom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of chemistry : organic chemistry and biochemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Mentor: Ph.D. Sanja Radman

HEADSPACE PROFILE OF THE BROWN ALGA CYSTOSEIRA COMPRESSA: COMPARISON OF DRYING METHODS

Vedran Tadić, 256

Abstract: Algae are a group of primarily aquatic, photosynthetic autotrophic organisms. Most algae live in seas and oceans, with the remainder being freshwater algae. Based on their photosynthetic pigments, algae are categorized into brown, red, and green types. Brown algae contain the pigment fucoxanthin, which gives them their greenish-brown color. They are biologically active, due in part to the presence of fucoidan, a sulfated polysaccharide located in the cell walls of brown algae. The genus *Cystoseira* includes about 294 species and is one of the most important in the Sargassaceae family. The aim of this study was to perform an analysis of the headspace volatiles of *C. compressa* algae using a GC-MS system, dried in three different ways. A comparison of the obtained chemical profile data revealed that, compared to dried samples, fresh samples show a higher concentration of terpenes, norisoprenoids, and aliphatic saturated compounds but a lower concentration of aliphatic unsaturated compounds. Although the overall percentage of identified volatile organic compounds did not differ drastically between different drying techniques, notable differences were observed in the representation of certain compound groups. The oven-dried sample showed higher concentrations of aliphatic saturated compounds and terpenes compared to the lyophilized sample, while the lyophilized sample had a higher proportion of benzene derivatives. Okt-1-en-3-ol was the most abundant compound in the samples dried in the shade, in the oven, and in those that were lyophilized, for both fiber types. Its concentration was 1,6 to 2,5 times lower in the fresh sample. When the DVB/CAR/PDMS fiber was used in the fresh sample, the most dominant compound was the norisoprenoid β -jonone, whose concentration decreases 5,9 to 6,9 times after the drying process.

Keywords: HS-SPME, volatile organic compounds, GC-MS

Thesis contains: 48 pages, 15 pictures, 1 table, 74 literature references.

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assoc. Prof. Ph.D. Zvonimir Marijanović
2. Asst. Prof. Ph.D. Marina Zekić
3. Ph.D. Sanja Radman

Defence date: October 25th 2023

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakultetu u Splitu pod mentorstvom dr.sc. Sanje Radman, od listopada 2020 godine. do listopada 2023. godine

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Sanji Radman na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade završnog rada. Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su bili tu za mene.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Provesti sušenje alge *C. compressa* na tri različita načina.
2. Provesti analizu vršnih para odabrane alge upotrebom GC-MS sustava.
3. Analizirati isparljive organske spojeve alge *C. compressa*.
4. Analizirati metode sušenja, izolacije i analize isparljivih spojeva.
5. Provesti identifikaciju pojedinačnih spojeva usporedbom indeksa retencije s podacima iz literature i indeksima retencija iz interne baze podataka Zavoda za organsku kemiju.
6. Izvršiti identifikaciju spojeva analizom spektara masa identificiranih spojeva sa spektrima masa iz biblioteka spektara masa Wiley 9 i NIST 17.
7. Poučiti potencijalnu razliku u načinima sušenja.

SAŽETAK

Alge su skupina pretežno vodenih, fotosintetskih autotrofnih organizama. Većina algi žive u morima i oceanima dok preostali dio predstavljaju slatkovodne alge. Na osnovu fotosintetskih pigmenata alge dijelimo na smeđe, crvene i zelene. Smeđe alge sadrže pigment fukoksantin koji je zaslužan za njihovu zelenkasto-smeđu boju. Biološki su aktivne što je rezultat prisutnosti mnogih aktivnih spojeva primjerice fukoidana, sulfatiranog polisaharida koji je smješten u staničnoj stjenci smeđih algi. Rod *Cystoseira* obuhvaća oko 294 vrste i jedan je od najznačajnijih u obitelji Sargassaceae (nastala spajanjem obitelji Sargassaceae i Cystoseiraceae). Alga *Cystoseira compressa* pripada u razred Phaeophyceae, red Fucales te u rod *Cystoseira*. Cilj ovog rada bio je provesti analizu vršnih para alge *C. compressa* upotrebom GC-MS sustava sušene na tri različita načina. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi ekstrahirane su vršne pare uzoraka na DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlaknima radi potpunijeg profila vršnih para. Usporedbom dobivenih rezultata primijećeno je da u odnosu na sušene uzorke, svježi uzorci pokazuju višu koncentraciju terpena, norizoprenoida i alifatskih zasićenih spojeva, ali manju koncentraciju alifatskih nezasićenih spojeva. Iako se ukupni postotak identificiranih isparljivih organskih spojeva nije drastično razlikovao s obzirom na tehnike sušenja, primjetne su razlike u zastupljenosti određenih skupina spojeva. Uzorak sušen u pećnici pokazuje veću zastupljenost alifatskih zasićenih spojeva i terpena u usporedbi s liofiliziranim uzorkom, dok liofilizirani uzorak ima viši udio derivata benzena. Okt-1-en-3-ol je najzastupljeniji spoj u sušenim uzorcima izoliranim s oba tipa vlakana, dok ga je u svježem uzorku ima od 1,6-2,5 puta manje. U svježem uzorku, izoliranom na DVB/CAR/PDMS vlaknu, najdominantniji spoj je bio norizoprenoid β -jonon, čija se koncentracija smanjuje 5,9 do 6,9 puta nakon procesa sušenja.

Ključne riječi: HS-SPME , isparljivi organski spojevi, GC-MS

ABSTRACT

Algae are a group of primarily aquatic, photosynthetic autotrophic organisms. Most algae live in seas and oceans, with the remainder being freshwater algae. Based on their photosynthetic pigments, algae are categorized into brown, red, and green types. Brown algae contain the pigment fucoxanthin, which gives them their greenish-brown color. They are biologically active, due in part to the presence of fucoidan, a sulfated polysaccharide located in the cell walls of brown algae. The genus *Cystoseira* includes about 294 species and is one of the most important in the Sargassaceae family (formed by merging the Sargassaceae and Cystoseiraceae families). The algae *Cystoseira compressa* belongs to the Phaeophyta class, Fucales order, and *Cystoseira* genus. The aim of this study was to perform an analysis of the headspace volatiles of *C. compressa* algae using a GC-MS system, dried in three different ways. Solid-phase microextraction was used to extract the headspace volatiles of the samples on DVB/CAR/PDMS and PDMS/DVB fibers for a more comprehensive profile of the headspace volatiles. A comparison of the obtained chemical profile data revealed that, compared to dried samples, fresh samples show a higher concentration of terpenes, norisoprenoids, and aliphatic saturated compounds but a lower concentration of aliphatic unsaturated compounds. Although the overall percentage of identified volatile organic compounds did not differ drastically between different drying techniques, notable differences were observed in the representation of certain compound groups. The oven-dried sample showed higher concentrations of aliphatic saturated compounds and terpenes compared to the lyophilized sample, while the lyophilized sample had a higher proportion of benzene derivatives. Okt-1-en-3-ol was the most abundant compound in the samples dried in the shade, in the oven, and in those that were lyophilized, for both fiber types. Its concentration was 1,6 to 2,5 times lower in the fresh sample. However, when the DVB/CAR/PDMS fiber was used in the fresh sample, the most dominant compound was the norisoprenoid β -jonone, whose concentration decreases 5,9 to 6,9 times after the drying process.

Keywords: HS-SPME, volatile organic compounds, GC-MS

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. PODJELA ALGI | 3 |
| 1.1.1. SMEDE ALGE | 4 |
| 1.1.2. ROD CYSTOSEIRA..... | 5 |
| 1.2. ISPARLJIVI SPOJEVI MORSKIH ALGI | 6 |
| 1.2.1. BIOAKTIVNOST MORSKIH ALGI | 7 |
| 1.3. METODE SUŠENJA..... | 8 |
| 1.4. METODE IZOLACIJE I ANALIZE ISPARLJIVIH SPOJEVA MORSKIH ALGI..... | 9 |
| 1.4.1. IZOLACIJA VRŠNIH PARA | 13 |
| 1.4.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA | 15 |
| 1.4.3. PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMetriJA MASA (GC-MS)..... | 16 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 2.1. UZORAK Cystoseira Compressa | 18 |
| 2.2. SUŠENJE UZORKA | 19 |
| 2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI (HS-SPME) | 19 |
| 2.4. ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMetriJA MASA (GC-MS) | 20 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA..... | 22 |
| 4. ZAKLJUČAK..... | 36 |
| 5. POPIS KRATICA I SIMBOLA..... | 39 |
| 6. LITERATURA | 42 |

UVOD

Alge su skupina pretežno vodenih, fotosintetskih autotrofnih organizama. Većina algi su morske alge u morima i oceanima dok preostali dio čine slatkovodne alge. Morske alge sadrže velik broj bioaktivnih spojeva: polisaharide, lipide, proteine, polifenole i pigmente. Alge se na osnovu fotosintetskih pigmenata dijele na smeđe, crvene i zelene. Smeđe alge posjeduju pigment fukoksantin koji je zaslužan za zelenkasto-smeđu boju algi. Crvene alge sadrže pigment fikoeritrin zbog kojeg su obojene u crvenkastu boju. Sadrže klorofil a i karotenoide. Zelene alge sadrže klorofil a i b, uz karotene i ksantofile što im daje izrazito zelenu boju.

Smeđe alge su biološki aktivne što je rezultat mnogih aktivnih spojeva kao npr. fukoidana, sulfatiranog polisaharida koji je smješten u staničnoj stjenci smeđih algi. (1) Rod *Cystoseira* obuhvaća oko 294 vrste i jedan je od najzastupljenijih u obitelji Sargassaceae (nastala od spajanja obitelji Sargassaceae i Cystoseiraceae). Makroalge roda *Cystoseira* (Fucales, Phaeophyceae) rastu na stjenovitom dnu gdje imaju važnu ulogu kao graditelji staništa ključni za biološku raznolikost i funkcioniranje ekosustava (2). Rod *Cystoseira* je uključen u Aneks II Barcelonskog protokola o zaštićenim područjima i biološkoj raznolikosti (Program Ujedinjenih naroda za okoliš, 2019 (3)) i u Aneks I Bernske konvencije (Vijeće Europe, Bernska konvencija, 1979 (4)). Sve vrste roda *Cystoseira* EU priznaje kao "staništa od interesa za zajednicu (Habitat Reef-code 1170 Annex I)", Direktivom o staništima (Direktiva, 1992.). (5)

Biološki aktivni spojevi su u mnogim slučajevima isparljivi. U prosjeku imaju malu molekulsku masu ali zato igraju važnu ulogu u morskom ekosustavu. (6). Pregledom dosadašnjih radova o isparljivim spojevima smeđih algi spominju se razne skupine organskih spojeva (terpeni, aromatski ugljikovodici, alifatski ugljikovodici, fenoli, esteri, alkoholi, aldehidi, ketoni i kiseline). (7)

1. OPĆI DIO

1.1. PODJELA ALGI

Alge fiksiraju CO₂ za metabolizam i sinteze te iskorištavaju energiju sunca. Sve alge imaju sposobnost izvođenja fotosinteze te pri tom procesu proizvode kisik, a samim time jedni su od većih predstavnika izvora slobodnog atmosferskog kisika na Zemlji. Pripadaju skupini eukariota (osim cijanobakterija) i posjeduju kloroplast koji sadrži pigmente za absorpciju sunčeve energije. Primarni pigment je klorofil a, dok su za boju pojedine alge su zaslužni drugi pigmenti (npr. fukoksantin kod smeđih algi).

Na temelju izraženih fotosintetskih pigmenata morske alge dijele se na: smeđe, crvene i zelene. (8)

1. Smeđe alge (Phaeophyta) – većih su dimenzija te se mogu manifestirati u obliku divovskih kelpova (do 20 m), debelih morskih trava duljine 2–4 m, do manjih vrsta duljine 30–60 cm. U prosjeku rastu po 20 cm u rasponu od 24 sata. Za zelenkasto-smeđu boju zaslužan je pigment fukoksantin. Za biološku aktivnost smeđih algi su odgovorni jedinstveni sekundarni metaboliti (florotanini), što omogućava njihovo ekonomsko iskorištavanje. (9)

Najpoznatiji predstavnici su:

- Diktiota (lat. *Dyctiota dichotoma*)
 - Padina (lat. *Padina pavonica*)
 - Jadranski bračić (lat. *Fucus virsoides*)
 - Cistozira (lat. *Cystoseira*)
2. Crvene alge (Rhodophyta) – veličine od par centimetara do metra duljine, nalaze se u dubokim oceanima (do 230 m dubine). Crvene alge sadrže pigment fikoeritrin zbog kojeg su obojene u crvenkastu boju te posjeduju sposobnost fotosinteze u tami. (10) Crvene alge imaju najveći udio proizvodnje bioaktivnih spojeva u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i glavni su izvor monoterpena koji imaju citotoksično djelovanje. (11) Osnovna podjela crvenih algi je na:
 - Razred Florideophyceae: Neke od glavnih redova unutar ovog razreda uključuju:
 - Red Bangiales (vrste roda *Porphyra*)

- Red Corallinales (oblikuju koraljni skelet u morskim ekosustavima)
 - Red Ceramiales
 - Red Gelidiales (koriste se za proizvodnju agar-a u prehrambenoj industriji) (12)
3. Zelene alge (Chlorophyta) – uz karotene i ksantofile sadrže klorofil (a i b) koji prevladava stoga su izrazito zelene boje. Generiraju slobodni kisik, posjeduju klorofil, pohranjuju škrob i sadrže celulozu (u staničnim stijenkama). Velike su od par centimetara do metra duljine. (13)

1.1.1. SMEĐE ALGE

Boja smeđih algi rezultat je prisustva ksantofila i karotena. Glavni pigment koji sadrži je fukoksantin, ksantofil tj. vrsta karotenoida koji apsorbira svjetlo u plavom i zelenom dijelu spektra. Omogućuje algi da koristi svjetlosnu energiju za fotosintezu u tim valnim duljinama. Sadrže i druge karotenoidne pigmente, kao što su β -karoten i violaksantin. Karotenoidi osim ostalih funkcija imaju ulogu zaštite stanica od oštećenja uzrokovanih svjetlosnim stresom. Također sadrže klorofil a i klorofil c.

Klasifikacija i raznolikost:

1. Razred Fucoephyceae:

- Red Fucales (*Fucus*, *Ascophyllum*, i *Sargassum*)
- Red Laminariales (*Laminaria*, *Saccharina*, *Macrocystis*)
- Red Ectocarpales (manje alge)

2. Razred Dictyotophyceae:

- Red Dictyotales (nalazimo ih u tropskim morima, alge čiji se talusi se dijele u dvije ili više grana)

3. Razred Tilopteridophyceae:

- Red Tilopteridales: sadrži različit spektar morfologije

4. Razred Desmarestiophyceae:

- Red Desmarestiales: karakterizirane razgranatim talusom. (14) (15)

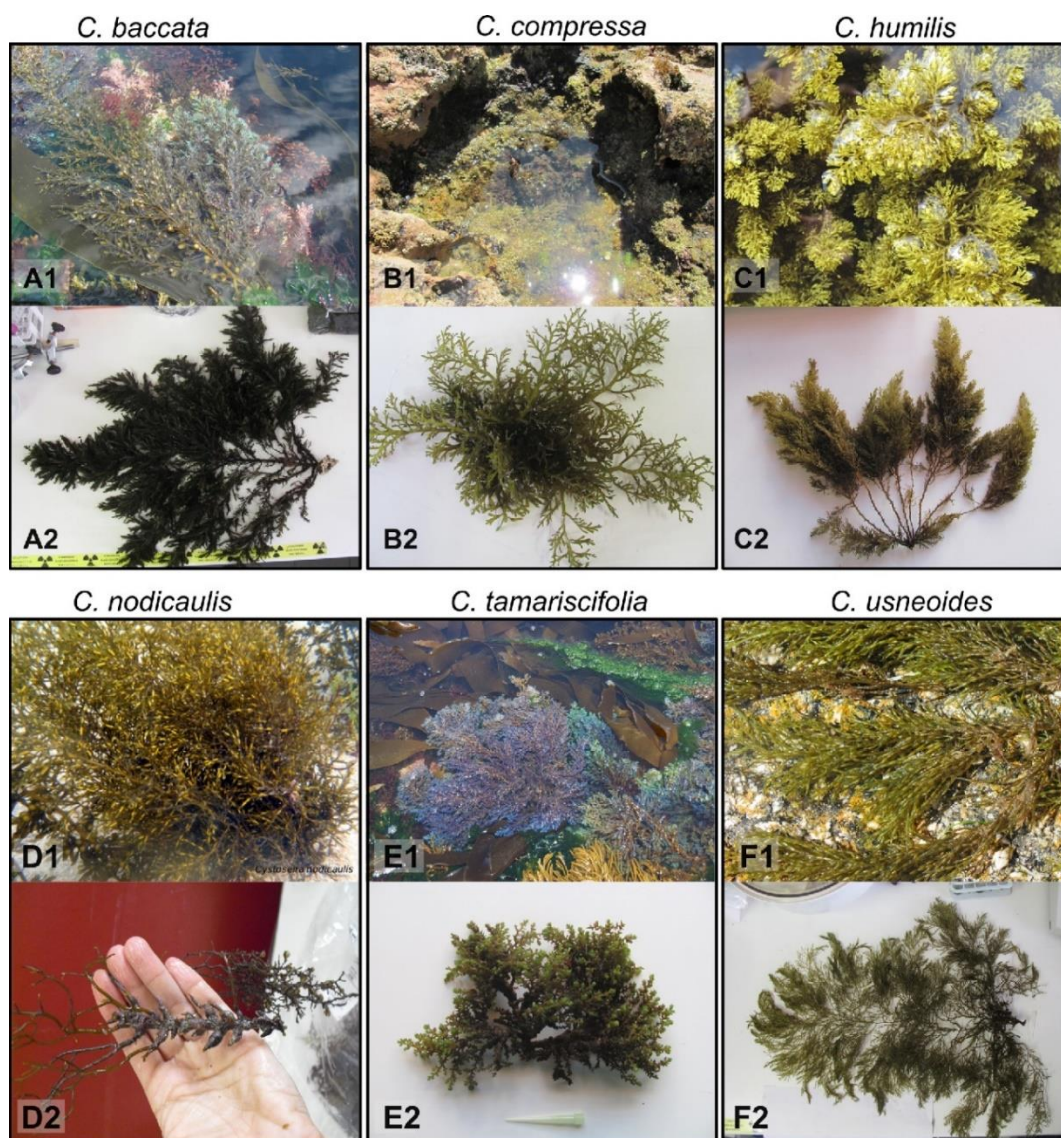
Kao sekundarne metabolite proizvode aktivne komponentne (florotanini), koji su poznati po snažnim antioksidativnim svojstvima (smanjuju oksidativni stres neutralizacijom slobodnih radikala u tijelu). Rezultat toga je veliko ekonomsko iskorištenje u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. (9)

1.1.2. ROD CYSTOSEIRA

Rod *Cystoseira* sadrži oko 294 vrsta i najučestalija je u obitelji Sargassaceae. Alge roda *Cystoseira* mogu se naći na različitim dijelovima svijeta, približno 80% vrsta nalaze se duž Sredozemlja i okolne Atlantske obale. Duljina algi je u prosjeku od 15-30 cm.

Rod *Cystoseira* je proučavan zbog svojih sekundarnih metabolita, uključujući isparljive spojeve. Isparljivi organski spojevi često uključuju terpene, aldehide, ketone i druge organske molekule koje mogu imati različite biološke aktivnosti, poput antimikrobnih ili antioksidativnih svojstava. Neki kemijski spojevi i skupine spojeva koji su identificirani da se nalaze u rodu *Cystoseira* su:

- Monoterpeni (α -pinene, limonene) i seskviterpeni (β -bariofilen): utječu na arome i mirise mnogih biljaka i algi. Sadrže antimikrobna svojstva. (17) (18)
- Halogenirani spojevi (bromometan, kloroform): među morskim organizmima, isparljivi halogenirani spojevi koriste se u obrani protiv grabežljivaca ili patogena. (19)
- Sulfatirani spojevi: pomažu algama u adaptaciji osmotskom stresu.
- Ketoni, alkoholi i aldehidi (heksanal, oktanal): ove osnovne organske molekule često se nalaze kao isparljivi spojevi u mnogim organizmima i mogu imati različite ekološke funkcije. (20)

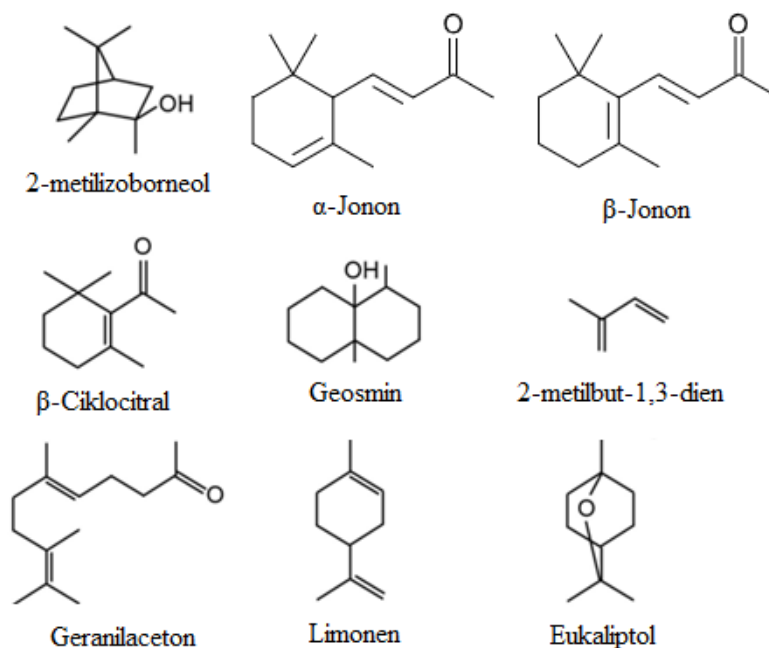


Slika 1. Uzorci Cystoseire (16)

1.2. ISPARLJIVI SPOJEVI MORSKIH ALGI

U vodenim ekosustavima, alge mogu otpustiti širok spektar isparljivih organskih spojeva uključujući terpenoide, furane, sulfo spojeve, alkane, alkene, alkohole, aldehide, ketone i estere. (21) Na prisutne spojeve utječu čimbenici okoliša, kao što su svjetlost, temperatura, uvjeti prehrane i abiotski stresovi. (22) Geosmin i 2-2-metilizoborneol (Slika 2.) koji se oslobađaju iz cijanobakterija dva su dobro poznata terpenoida. (23) Spojevi nastali razgradnjom karotenoida, uključujući β -ciklocitral, β -jonon i geranilaceton (Slika 2), doprinose mirisu vode. (24) Isparljivi organski spojevi u algi imaju važnu ulogu kao što su povećanje tolerancije emitera, komuniciranje s homogenim algama i igranje

alelopatskih uloga u heterogenim algama i vodenim makrofitima. Jedan od razloga zašto alge ispuštaju isparljive organske spojeve su zaštita od grabežljivaca, što im pomaže u preživljavanju. (25)



Slika 2. Kemijska struktura glavnih terpenoida u isparljivim organskim spojevima algi

1.2.1. BIOAKTIVNOST MORSKIH ALGI

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su morske alge vrlo vrijedan izvor hrane s visokom nutritivnom vrijednošću i visokim udjelom bioaktivnih spojeva koji imaju različitu biološku aktivnost (antimikrobnu, antioksidacijsku, anti-age, antidijabetičku i protuupalnu). Proizvodnjom sekundarnih metabolita alge se prilagođavaju promjenama okoline, a upravo ti spojevi posjeduju bioaktivnost. Istraživanje bioaktivnih spojeva u morskim algama se u većini slučajeva bazira na karotenoide, polisaharide, polifenole i ω -3 masne kiseline. Jedan od takvih spojeva je karotenoid fukoksantin koji ima antioksidacijsko, antimikrobno i antihipertenzivno djelovanje. Makroalge omogućuju inhibiciju acetilkolinesteraze te na taj način omogućuju zaštitu od neurodegenerativnih poremećaja. To je rezultat veće količine nezasićenih masnih kiselina u odnosu na zasićene masne kiseline. (26)

U odnosu na crvene alge, smeđe i zelene alge proizvode znatno veću količinu polifenola, a posebna vrsta je florotanin koja se pokazala djelotvorna u borbi protiv dijabetesa i HIVa. (27)

Smeđe alge akumuliraju specifične metabolite, kao što su polisaharidi alginske kiseline, laminarani i fukoidani, fenolni spojevi florotanini, karotenoid fukoksantin. Imaju iznimno visoke razine joda uz istodobne niske omjere Na/K, što im omogućuje da imaju veliki ukupni potencijal. Glavni ciljevi većine nedavnih studija usmjereni su na testiranje ugradnje makroalgi u hranu. One koje se smatraju sigurnima za konzumaciju u Europi su *H. elongata*, *F. vesiculosus*, *A. nodosum*, *F. serratus*, *U. pinnatifida*, *L. japonica*, *L. saccharina*, *L. digitata* i *A. esculenta*. (28)

1.3. METODE SUŠENJA

Tri najpopularnije metode sušenja algi su sušenje liofilizacijom, vrućim zrakom (u pećnici) i sušenje na sobnoj temperaturi. Kod metode sušenja na sobnoj temperaturi glavni nedostatak je vrijeme trajanja i mogućnost onečišćenja uzorka prašinom i mikroorganizmima. Sušenje vrućim zrakom (u pećnici) koristi cirkulaciju toplog zraka, što rezultira bržim sušenjem uzorka, a nedostatak je mogućnost razgradnje spojeva. Kod sušenja zamrzavanjem (liofilizacija), alga se prvo zamrzne i zatim se izvodi postupak sublimacije te se odstranjuje voda pod utjecajem vakuuma. (29) (30)

Proučen je učinak metoda sušenja na suncu, sušenja u pećnici i sušenja smrzavanjem na nutritivni sastav smeđe morske trave *Sargassum hemiphyllum*. Utvrđen je približan nutritivni sastav (aminokiseline, masne kiseline, minerali i vitamin C) morske trave osušene gore navedenim metodama i primijećene su razlike u pojedinim komponentama u uzorcima s obzirom na način sušenja alge. (31) Uzorak alge sušene u pećnici imao je najveći gubitak hranjivih tvari, a uzrok tome je uglavnom učinak visoke temperature tijekom sušenja. Alga sušena na suncu imala je najniže vrijednosti sadržaja pepela, minerala i ukupnog vitamina C u odnosu na druga dva uzorka. Uzrok tome je učinak ispiranja i dugog vremena izlaganja zraku tijekom sušenja na suncu. Liofilizirani (sušenje smrzavanjem) uzorak imao je najveći sadržaj ukupnih aminokiselina, ukupnih višestruko nezasićenih masnih kiselina i ukupnog vitamina C u usporedbi s uzorcima osušanim na

suncu i u pećnici. Nisu nađene značajne razlike u sadržaju sirovih bjelančevina i sirovih lipida u uzorcima alge osušene na tri različita načina. (31)

1.4. METODE IZOLACIJE I ANALIZE ISPARLJIVIH SPOJEVA MORSKIH ALGI

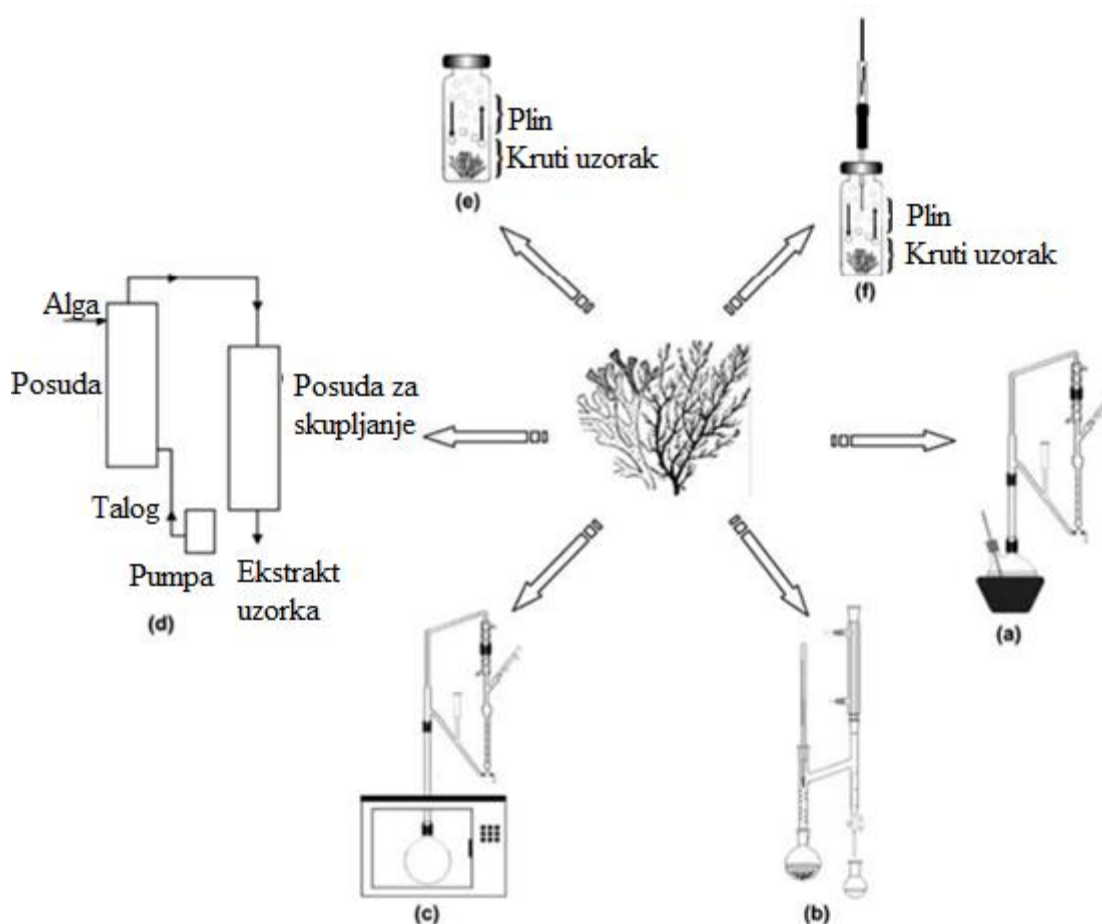
Laboratorijske metode izolacije isparljivih spojeva dijele se na :

- destilacijske metode
- metode ekstrakcije otapalima ili subkritičnim/superkritičnim fluidima
- tehnike izolacije vršnih para
- sorpcijske tehnike

Destilacijskom metodom dolazi do zagrijavanja tekućine do isparavanja, a zatim se para hlađenjem ukapljuje. Destilacijske metode se mogu podijeliti na:

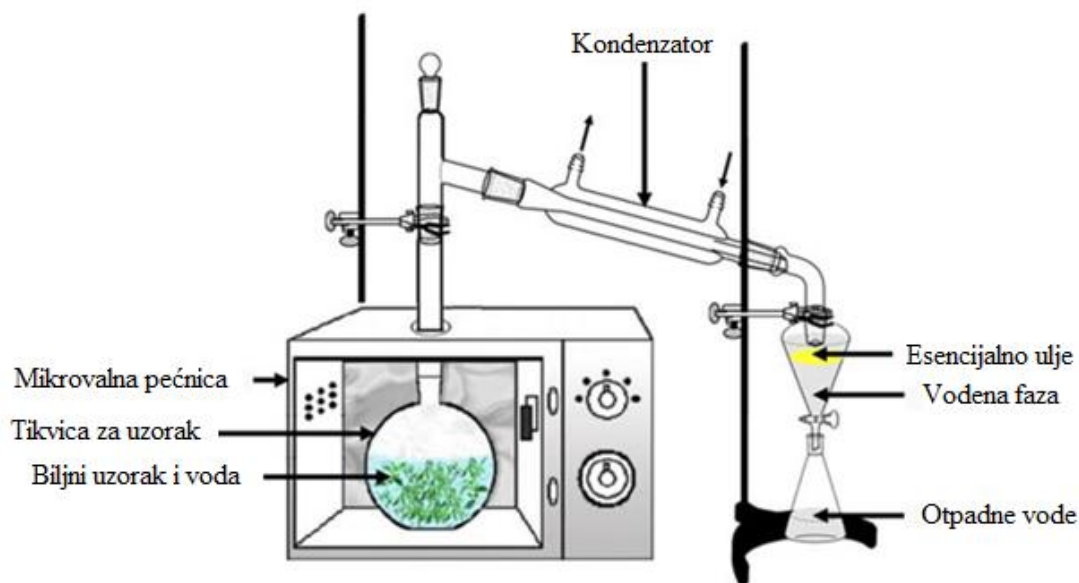
- hidrodestilacija (vodena destilacija)
- vodeno-parna destilacija
- parna destilacija
- hidrodestilacija mikrovalovima

Hidrodestilacija je tehnika primjenjiva za ekstrakciju isparljivih organskih spojeva, korištenjem niza različitih aparatura, kao što su aparatura po Clevengeru i Dean-Starku. Hidrodestilacija koristi zagrijanu vodu te vodenu paru za poticanje isparavanja isparljivih organskih spojeva u trajanju obično 2-4 sata. Osim što oduzima puno vremena, ova metoda ima i drugih nedostataka kao što su mogući gubici isparljivih spojeva i niska učinkovitost ekstrakcije. Nadalje, povišene temperature i korištenje vode mogu uzrokovati djelomičnu ili potpunu degradaciju spojeva. Prednost korištenja ove metode je smanjena mogućnost onečišćenja kolone za plinsku kromatografiju, jer destilat ne sadrži neisparljive tvari (32)



Slika 3. Metode ekstrakcije isparljivih organskih spojeva u algama; a) hidrodestilacija u aparaturi po Clevenger aparatu, b) hidrodestilacija u aparaturi po Dean-Stark aparatu, c) hidrodestilacija mikrovalovima, d) ekstrakcija superkritičnog fluida, e) izolacija vršnih para, f) mikroekstrakcija čvrste faze vršnih para. (33)

Fokusirana hidrodestilacija mikrovalovima (FMAHD) nedavno je privukla pozornost za ekstrakciju eteričnih ulja. Fokusirana mikrovalna pećnica je opremljena modulatorom napajanja i infracrvenim mjerenjem temperature. Alge ili ekstrakt otapala se pomiješaju sa vodom u Clevengerovom ili Dean-Starkovom aparatu te se smjeste u mikrovalnu pećnicu, a mikrovalna energija potiče isparavanje isparljivih organskih spojeva mnogo brže nego što se to zbiva običnom hidrodestilacijom. Proces uključuje vibracije vodikovih veza, što je rezultat mikrovalova inducirane dipolne rotacije molekula te migracije iona, koji poboljšavaju prodiranje otapala u matricu omogućujući otapanje komponenti koje se ekstrahiraju. Prednost ove metode je veća brzina ekstrakcije u kraćem vremenu što rezultira nižim troškom rada. (33)



Slika 4. Mikrovalna ekstrakcija

Ekstrakcija otapalom podijeljena je u tri kategorije: sustavi kruto-tekuće, tekućina-tekućina i sustavi plin-tekućina. Kod ekstrakcije isparljivih organskih spojeva biljnih materijala najčešće se koristi kruto-tekuće sustav. Otapalo u metodi ekstrakcije otapalima, mora biti prikladno za ekstrakciju nepolarnih i polarnih spojeva te mora biti niske temperature vrenja, zbog sačuvanja što većeg postotka isparljivih spojeva. Omjer otapalo/uzorak, vrsta otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije su varijable koje se ispituju u ovoj vrsti ekstrakcije. Znanstvenici su zaključili da veći omjer otapalo/uzorak dovodi do veće ukupne količine izdvojenih krutih tvari, neovisno o korištenom otapalu, temeljem načela prijenosa mase. Vrsta otapala je najviše istraživani čimbenik. Puno parametara otapala može imati utjecaj na ekstrakciju kao što su sklonost akceptora vodikove veze, sklonost donora vodikove veze, polarnost/dipolarnost, dipolni moment, dielektrična konstanta, viskoznost, površinska napetost i gustoća kohezijske energije. Vrijeme i temperatura ekstrakcije su važni parametri koje treba optimizirati čak i kako bi se minimizirao energetska trošak procesa. Mnogi znanstvenici slažu se sa činjenicom da povećanje radne temperature pogoduje ekstrakciji. (35) Mnogi su nedostaci ekstrakcije otapalom kao npr. gubitci isparljivih organskih spojeva tijekom različitih koraka ekstrakcije, potreba za dodatnom koncentracijom ekstrakata, propadanje uzorka što dovodi do stvaranja artefakata i onečišćenje okoliša. (34)

Mnoga različita nepolarna otapala i njihove smjese koriste se za metodu ekstrakcije otapalom, a najčešći su heksan, dietil-eter i diklorometan. Najčešće korišteni sustav koji se koristi je Soxhlet, a trajanje je 4 h. (35)



Slika 5. Soxhletov ekstraktor

Jedna od modernijih ekstrakcija je ekstrakcija superkritične tekućine. Osnovni proces metode ekstrakcije superkritične tekućine je da se tekućina održava na određenom tlaku, temperaturi iznad kritične temperature i tlaka te određenoj brzini protoka, što ju čini superkritičnim fluidom. Superkritična tekućina se pumpa u posudu za ekstrakciju gdje se nalazi matrica uzorka.

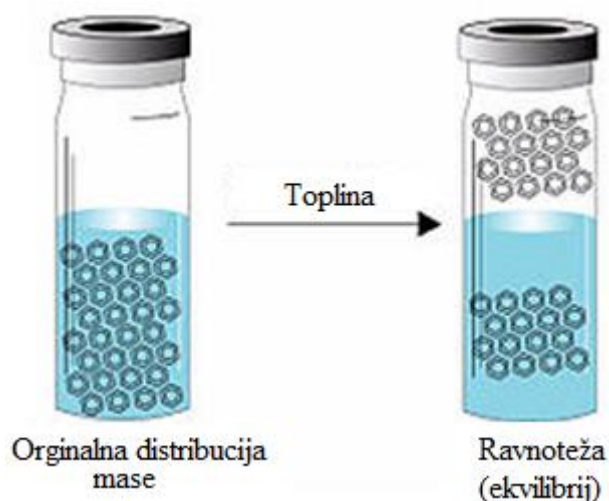
Superkritična tekućina (najčešće CO_2) koja je prošla kroz matricu uzorka, otapa analite od interesa (u ovom slučaju isparljive organske spojeve), zatim ih odnosi iz matrice u uređaj za sakupljanje tako da se analiti mogu analizirati nekom daljnjom analitičkom tehnikom, kao što je kromatografija. (36)

1.4.1. IZOLACIJA VRŠNIH PARA

Izolacija vršnih para (engl. headspace) je nedestruktivna metoda skupljanja isparljivih tvari, čime se daje realistična slika profila isparljivih tvari koje emitiraju. (37) U ovoj se metodi isparljivi sastojci uzorka prvo prenose u plin, a zatim se analiziraju plinskim kapilarnim kolonama. Optimizacija parametara izolacije vršnih para može uključivati testove s različitim temperaturama, ravnotežama i razdobljima ekstrakcije. Izolacija vršnih para dijeli se na:

- statičku izolaciju vršnih para (SHS)
- dinamičku izolaciju vršnih para (DHS)
- mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME).

Statička izolacija vršnih para (engl. static headspace, SHS) prikladna je za određivanje tvari s niskim i srednjim koeficijentom raspodjele. To uključuje ekološki važne vodene otopine isparljivih aromatskih i halogeniranih ugljikovodika, terpena, sulfida, disulfida, karbonilnih spojeva i etera, kao i otopljenih plinova. Uzorak se postavlja u zatvorenu posudu koja se grije na određenu temperaturu te se ostavi određeno vrijeme radi uravnoteženja vršnih para iznad uzorka u posudi, a zatim se atmosfera iznad uzorka uzorkuje i analizira. S obzirom da najisparljiviji spojevi ispune prostor iznad uzorka postoji mogućnost da se ne analiziraju slabije isparljivi spojevi. (38)



Slika 6. Statična izolacija vršnih para, slika preuzeta sa

<https://blog.teledynetekmar.com/blog/bid/393421/Basics-of-Static-Headspace-Analysis->

Part-1

Dinamička izolacija vršnih para (engl. dynamic headspace, DHS) je vjerojatno najrašireniji pristup prikupljanja parne faze. Fleksibilnost ove metode zahtijeva složeniju instrumentaciju i postupke prikupljanja, visoku standardizaciju nekoliko parametara kako bi se postigla dobra ponovljivost uzorkovanja i složene postupke za kvantitativnu analizu.

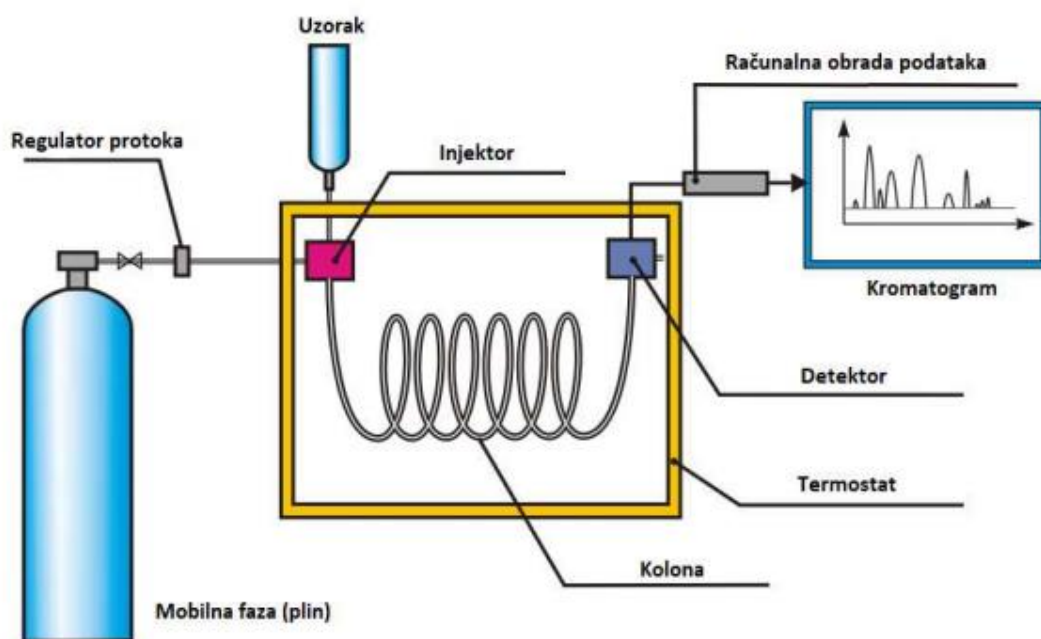
Ova metoda odvaja isparljive sastojke iz uzorka kontinuiranim protokom inertnog plina (obično He) kroz ili iznad uzorka (krutog ili tekućeg) koji se stavlja u spremnik dok su analiti zarobljeni na adsorbentima od različitih materijala. Nakon ovog procesa potreban je korak desorpcije, obično termički. (37)

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) upotrebljava se za izolaciju isparljivih spojeva. Ova metoda uzorkovanja integrira ekstrakciju i koncentriranje u jedan korak, što dovodi do visokih analitičkih performansi i manje manipulacije uzorkom. Ekstrakcija se temelji na adsorpciji/desorpciji isparljivih tvari na obloženom inertnom vlaknu poput igle. U ekstrakciji HS-SPME, vlakno se izlaže parama isparljivih organskih spojeva u hermetički zatvorenoj staklenoj posudi tijekom unaprijed određenog vremenskog razdoblja. Nakon toga, SPME štrcaljka se uklanja i vlakno se stavlja u injektor GC-a. Isparljivi organski spojevi se termički desorbiraju i uvode u kromatografsku kolonu. (35) Toplinska desorpcija isparljivih organskih spojeva iz vlakana eliminira potrebu za otapalima; međutim, ponovljena ubrizgavanja uzorka nisu moguća.

Od uvođenja HS-SPME, različite vrste adsorbensa korištene su za ekstrakciju različitih skupina analita. Polarni premazi, npr. poliakrilat i carbowax, lako zadržavaju fenole i karboksilne kiseline, dok nepolarni premazi, polidimetilsiloksan, lako zadržavaju koncentrat ugljikovodika. Poliakrilat, polidimetilsiloksan, divinilbenzen i karboksen sa 7 do 100 μm debljine su najčešće korištena vlakna (39). Utjecaj afiniteta adsorbensa za analite (kapacitet adsorpcije, laka desorpcija, toplinska stabilnost i da nema kemijske reaktivnosti) koristi se kao ključ za optimizaciju ekstrakcije isparljivih organskih spojeva tj. poboljšanje detekcije tragova organskih spojeva u različitim uzorcima. (40) Potrebna je optimizacija vremena i temperature adsorpcije kako bi se postigla dobra izvedba u ekstrakciji i rezultati visoke ponovljivosti. Preporučuje se korištenje internog standarda za kvantifikaciju. (41)

1.4.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je metoda koja razdvaja komponente u smjesi na temelju razlike u ponašanju raspodjele između pokretnih i nepokretnih faza. Plinska kromatografija (GC) jedna je od popularnih kromatografskih tehnika za odvajanje isparljivih spojeva ili tvari. Komponente u smjesi su raspoređene između dvije faze, nepokretna faza i pokretna faza, odnosno plina nositelja, koji provodi smjesu kroz nepokretnu fazu. Pokretna faza mora biti kemijski inertan plin, kao što su dušik, helij, argon ili ugljikov dioksid. Spojevi u pokretnoj fazi stupaju u interakciju sa nepokretnom fazom dok prolaze kroz nju. Zbog razlike u svojstvima i strukturama svake komponente, veličina i afinitet svake interakcije sa nepokretnom fazom su različiti. Stoga, pod istom pokretačkom silom, vrijeme zadržavanja različitih komponenti razlikuje se u stupcu, čime se kreće iz stupca različitim redoslijedom. Zbog svoje jednostavnosti, visoke osjetljivosti i sposobnosti učinkovitog odvajanja smjesa, plinska kromatografija postala je jedan od najvažnijih alata u kemiji. (42)

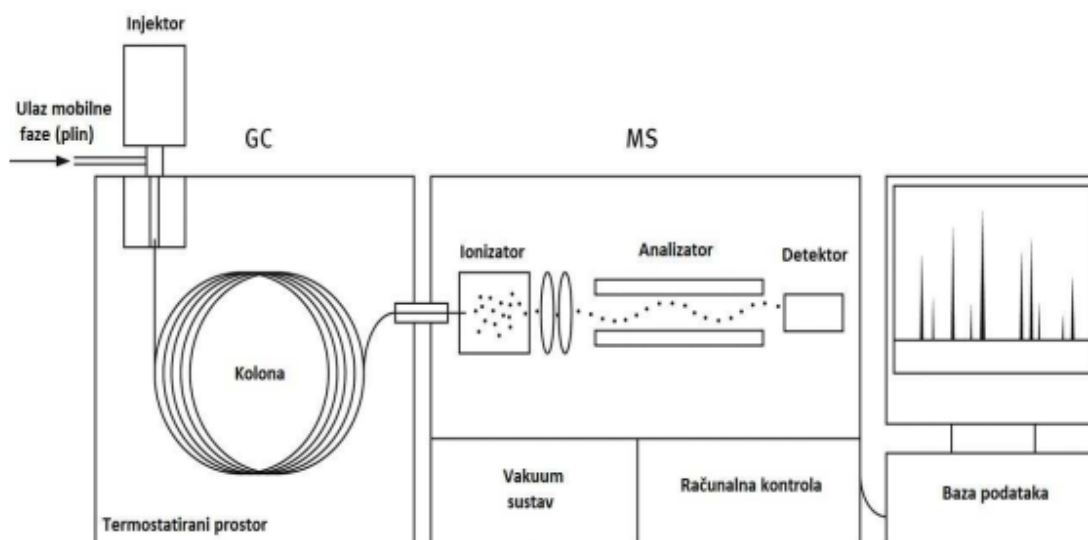


Slika 7. Shematski prikaz plinskog kromatografa (43)

Mala količina uzorka uvodi se u injektor lociran na vrhu kolone. Temperatura injektora mora biti viša od temperature vrelišta najmanje isparljive komponentne da bi se izvršilo potpuno isparavanje uzorka. Odjeljivanje sastojka smjese vrši se na koloni koja je ispunjena nepokretnom fazom. Detektor očitava odjeljenje komponente smjese. (44)

1.4.3. PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) sastoji se od dvije vrlo različite analitičke tehnike: plinske kromatografije (GC) i spektrometrije masa (MS). Analitički instrument sastoji od plinskog kromatografa koji je povezan s spektrometrom masa, a dvije se tehnike odvijaju u nizu. Spektrometrija masa (MS) je analitička tehnika koja mjeri omjer mase i naboja (m/z) nabijenih čestica i stoga se može koristiti za određivanje molekularne težine i elementarnog sastava, kao i za identifikaciju kemijske strukture molekula. Podaci iz GC-MS daju spektre masa koji se mogu koristiti za potvrdu identiteta ili identifikaciju nepoznatih spojeva. Ova metoda se često koristi za određivanje isparljivih sekundarnih metabolita. (45)

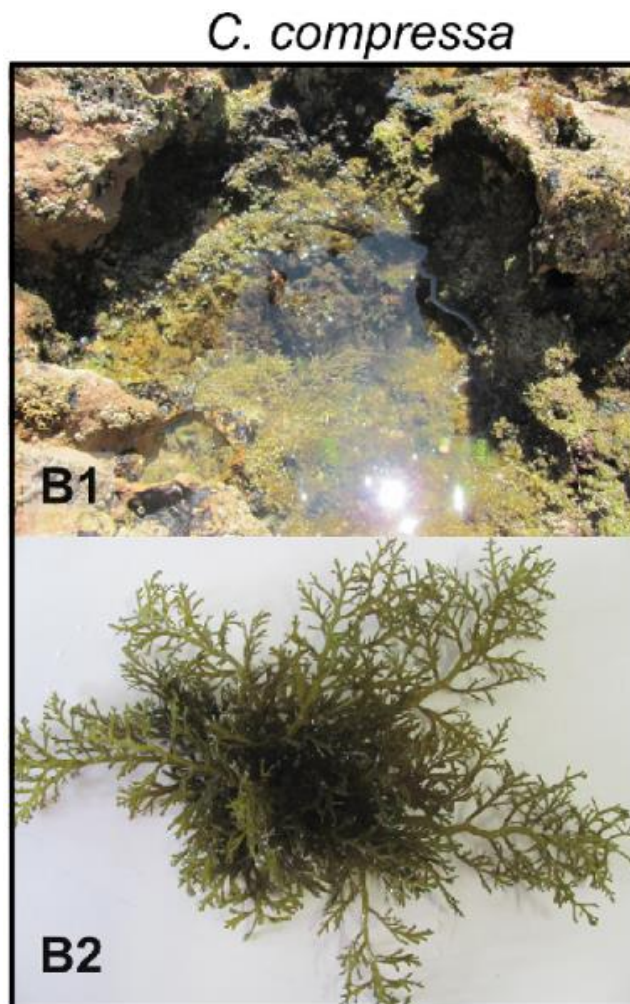


Slika 8. Shematski prikaz metode GC-MS (46)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. UZORAK *Cystoseira Compressa*

Cystoseira compressa (Esper) Gerloff & Nizamuddin, razred Phaepohyta, red Fucales rod *Cystoseira*, uzorkovana je na području grada Zadra, na mjestu Zadar Kolovare II (kod Fontane) (44° 07' 00" N ; 15° 14' 00" E) u ožujku 2021 god. sa dubine od 0,5 m pri temperaturi mora od 13 °C. Alga je u morskoj vodi prenesena uz pomoć prijenosnog hladnjaka u laboratorij, te na taj način sačuvana od isušivanja ili raspadanja. Svježi uzorak se čuvao u zamrzivaču do obrade, a dio alge je stavljen na sušenje. Prije analize kamenčići i ostala vidljiva strana tijela uklonjena su s alge.



Slika 10. *C. compressa* alga (47)

C. compressa je smeđa granasta alga s ishodištem koje se sastoji od jedne kompaktne jedinice iz koje izlazi par kratkih grana. Sadrži dva tipa grana: spljoštene i cilindrične.

„Cystoseira“ predstavlja "lanac vezikula", a „compressa“ predstavlja spljošteni oblik grana. (48)

Najčešće je u tonovima svijetlosmeđe i krem boje, povremeno jednolike boje, u nekim slučajevima je pjegava. Nalazi se u područjima gdje nema zraka i struja nije jaka, kao što su kamenita i pješćana podloga u morskim bazenima. (48)

2.2. SUŠENJE UZORKA

U eksperimentalnom radu alga je sušena na tri različita načina uz svježi, kontrolni, uzorak:

- Sušenje u sjeni – 10 dana na sobnoj temperaturi u sjeni,
- Sušenje u pećnici – 24h na 60 °C u ventiliranoj pećnici,
- Sušenje liofilizacijom (smrzavanjem) – 2 dana u liofilizatoru (FreeZone 2.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).

2.3. MIKROEKSTRAKCIJA VRŠNIH PARA NA ČVRSTOJ FAZI (HS-SPME)

HS-SPME je izveden s PAL Auto Sampler System (PAL, RSI 85, CTC Analytics AG, Švicarska) koristeći SPME vlakna (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). prevučena s:

- divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksanom (DVB/CAR/PDMS, v1)
- polidimetilsiloksan/divinil-benzenom (PDMS/DVB, v2)

1 g svježeg i suhog uzorka spužve stavljeno je u staklene bočice od 20 mL i zatvoreno čepom koji sadrži politetrafluoroetilen (PTFE)/silikonski septum. Uzorci su grijani 15 minuta na 60 °C i potom ekstrahirani 45 minuta. Temperatura injektora postavljena je na 250 °C i toplinska desorpcija je provedena 7 minuta izravno na GC koloni.

2.4. ANALIZA ISPARLJIVIH SPOJEVA VEZANIM SUSTAVOM PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA (GC- MS)

Korištena metoda za analizu isparljivih organskih spojeva je plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS). Aparatura se sastoji od plinskog kromatografa modela 8890A, spektrometara masa modela 5977E, proizvođača Agilent Technologies.



Slika 11. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Analize su izvršene na HP-5MS koloni sa nepolarnom stacionarnom fazom 5% difenil – 95% dimetilpolisiloksan dimenzija 30 m x 0.25 mm te 0.25 μ m debljina filma. Uvjeti rada GC-MS-a su bili:

- program kolone:
 - 2 min izotermno na 70 °C
 - 70 °C do 200 °C brzinom 3 °C/min
 - zadržavanje 18 min pri 200 °C,

- temperature:
 - injektor, 250 °C,
 - ionski izvor, 230 °C,
 - detektor, 280 °C,
- omjer cijepanja: 1:50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mL/min.,
- energija ionizacije: 70 eV,
- interval snimanja masa: 30-350 m/z.

Dobivenim spojevima izračunat je indeks zadržavanja pomoću poznatih vremena zadržavanja alkana (C₉-C₂₄). Zatim je provedena identifikacija spojeva usporedbom indeksa zadržavanja s literaturnim podacima. S bazom podataka spektra masa Wiley9 (SAD) i NIST17 (SAD), odrađena je usporeba spektra masa analiziranih spojeva.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Vršne pare alge *C. compressa* izolirane su pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (HS-SPME). Udio komponenti kao i kemijski sastav analiziran je tehnikom GC-MS. Analizirana su po četiri različito pripremljena uzorka ekstrahirana na dva vlakna DVB/CAR/PDMS (v1) i PDMS/DVB (v2)

1. Svježi uzorak alge *C. compressa* (SvCC)
2. Uzorak alge *C. compressa* sušen u sjeni na sobnoj temperaturi u vremenskom razdoblju od 10 dana (SjCC)
3. Uzorak alge *C. compressa* sušen u pećnici na 60°C u trajanju od 24 h (PeCC)
4. Liofilizirani uzorak alge *C. compressa*, trajanje liofilizacije 2 dana (LiCC)

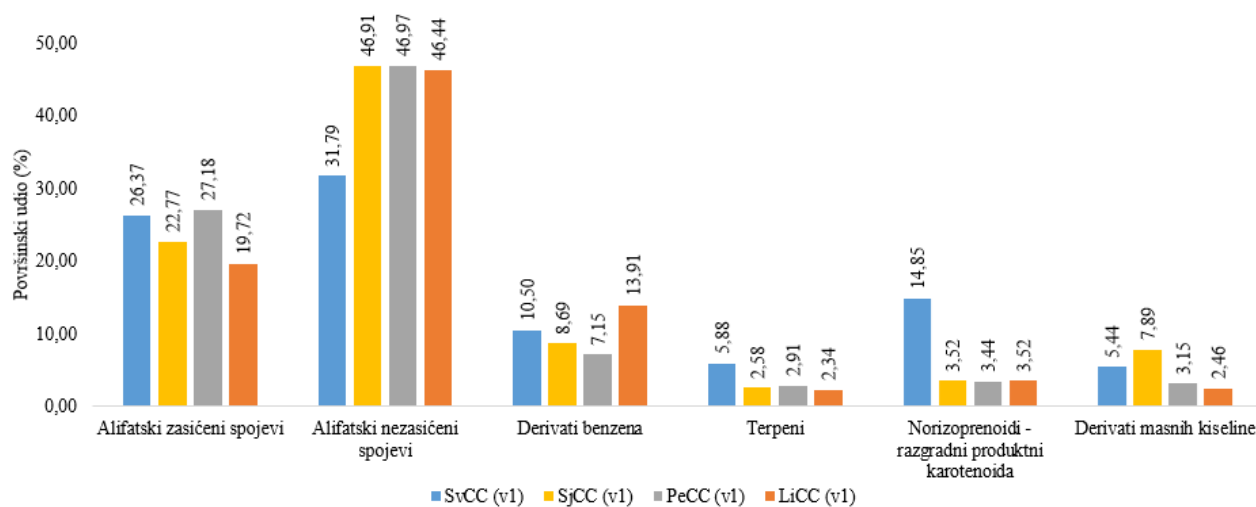
Tablica 1. Isparljivi organski spojevi iz *C. compressa* izolirani mikroekstrakcijom čvrste faze (HS-SPME) i analizirani plinskom kromatografijom–masenom spektrometrijom (GC–MS); (I: svježi uzorak *C.compressa* (SvCC) ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom, II: uzorak sušen u sjeni *C.compressa* (SjCC) ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom, III: uzorak sušen u pećnici *C.compressa* (PeCC) ekstrahiran DVB/CAR/PDMS vlaknom), IV: liofilizirani uzorak *C.compressa* (LiCC) ekstrahiran DVB/CAR/PDMSvlaknom, V: svježi uzorak *C.compressa* (SvCC) ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom, VI: uzorak sušen u sjeni *C.compressa* (SjCC) ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom, VII: uzorak sušen u pećnici *C.compressa* (PeCC ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom), VIII: liofilizirani uzorak *C.compressa* (LiCC) ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom)

| SPOJ | RI | Površinski udio (%) ± SD | | | | | | | |
|---------------------------|-------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | DVB/CAR/PDMS vlakno (v1) | | | | PDMS/DVB vlakno (v2) | | | |
| | | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
| propanska kiselina | < 900 | - | 2,12 ± 0,02 | 0,79 ± 0,02 | 1,34 ± 0,02 | - | 1,15 ± 0,06 | 0,34 ± 0,01 | 0,53 ± 0,16 |
| pent-1-en-3-ol | < 900 | 4,98 ± 0,20 | - | 0,82 ± 0,09 | 0,95 ± 0,07 | 1,55 ± 0,10 | - | 0,71 ± 0,04 | 0,56 ± 0,08 |
| pent-2-en-1-ol | < 900 | 4,24 ± 1,65 | 0,95 ± 0,06 | 1,33 ± 0,01 | 1,28 ± 0,02 | 1,65 ± 0,11 | 0,68 ± 0,00 | 0,89 ± 0,06 | 0,89 ± 0,00 |
| pentanal | < 900 | - | - | - | - | - | - | - | 0,2, ± 0,07 |
| heksanal | < 900 | 2,58 ± 0,15 | 1,48 ± 0,11 | 2,37 ± 0,15 | 2,34 ± 0,01 | 6,09 ± 0,36 | 1,76 ± 0,22 | 2,45 ± 0,25 | 3,17 ± 0,11 |
| 3-metilbutanska kiselina | < 900 | - | 0,96 ± 0,03 | - | - | - | 1,13 ± 0,01 | - | 0,52 ± 0,07 |
| 2-metilbutanska kiselina | < 900 | - | 0,43 ± 0,03 | - | - | - | 0,41 ± 0,03 | - | 0,23 ± 0,09 |
| (E)-heks-2-enal | < 900 | - | 1,20 ± 0,11 | 2,47 ± 0,15 | - | - | 0,57 ± 0,06 | 1,48 ± 0,12 | - |
| heks-3-en-1-ol | < 900 | 3,99 ± 0,12 | - | - | 1,85 ± 0,10 | 3,69 ± 0,24 | - | - | 1,41 ± 0,02 |
| heksan-1-ol | < 900 | 4,86 ± 0,31 | - | - | 0,68 ± 0,04 | 2,95 ± 0,19 | - | - | 0,71 ± 0,03 |
| heptan-2-on | < 900 | 1,89 ± 0,10 | 0,39 ± 0,01 | 0,32 ± 0,00 | 0,32 ± 0,09 | 4,41 ± 0,29 | 0,65 ± 0,02 | 0,53 ± 0,00 | 0,48 ± 0,06 |
| heptanal | 907 | - | 0,46 ± 0,02 | 0,61 ± 0,02 | 0,58 ± 0,02 | 1,00 ± 0,07 | 0,51 ± 0,05 | 0,65 ± 0,05 | 0,63 ± 0,08 |
| 6-metilheptan-2-on | 958 | 0,61 ± 0,08 | - | - | - | 0,74 ± 0,05 | - | - | - |
| (E)-hept-2-enal | 963 | - | 0,67 ± 0,03 | 0,86 ± 0,11 | 0,91 ± 0,03 | - | 0,61 ± 0,03 | 0,72 ± 0,07 | 0,96 ± 0,00 |
| benzaldehyd | 970 | 4,88 ± 0,94 | 2,79 ± 0,01 | 2,35 ± 0,02 | 2,85 ± 0,02 | 1,89 ± 0,12 | 1,46 ± 0,07 | 1,41 ± 0,05 | 1,59 ± 0,03 |
| okt-1-en-3-on | 979 | 2,07 ± 0,00 | - | - | - | 1,80 ± 0,12 | - | - | - |
| 3,5,5-trimetil-heks-2-ene | 980 | - | - | 3,60 ± 0,03 | 2,16 ± 0,05 | - | - | 3,89 ± 0,01 | 2,23 ± 0,07 |
| heksanska kiselina | 982 | - | 1,96 ± 0,10 | 1,45 ± 0,07 | - | - | 2,15 ± 0,02 | 1,52 ± 0,12 | - |
| okt-1-en-3-ol | 984 | 5,61 ± 0,00 | 13,78 ± 0,53 | 10,17 ± 0,19 | 14,01 ± 0,43 | 6,42 ± 0,42 | 14,88 ± 0,13 | 10,52 ± 0,40 | 14,19 ± 0,44 |
| 6-metilhept-5-en-2-on | 991 | 2,03 ± 0,08 | 0,86 ± 0,11 | 1,13 ± 0,05 | - | 1,24 ± 0,08 | 0,95 ± 0,04 | 1,03 ± 0,07 | 0,80 ± 0,01 |
| 2-fentanilfuran | 996 | 1,39 ± 0,08 | 0,99 ± 0,08 | 1,04 ± 0,08 | 1,56 ± 0,08 | 1,86 ± 0,12 | 0,94 ± 0,07 | 0,85 ± 0,07 | 1,28 ± 0,11 |

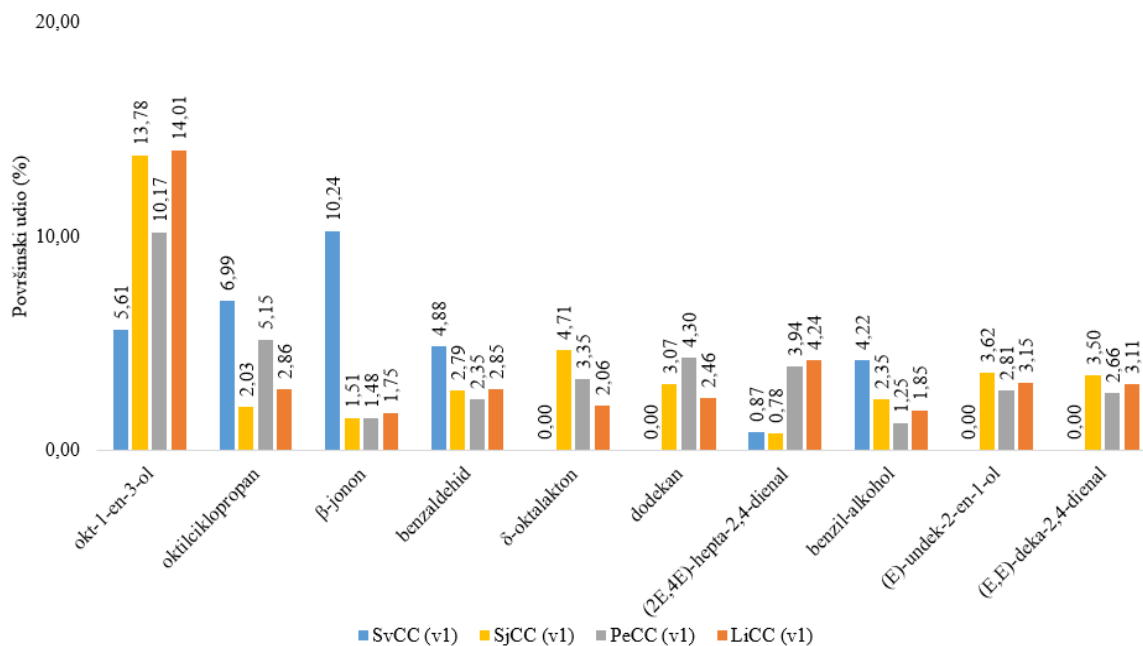
| | | | | | | | | | |
|--|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| oktanal | 1001 | 2,96 ± 0,05 | 0,64 ± 0,17 | 2,63 ± 0,07 | 2,61 ± 0,05 | 5,27 ± 0,35 | 0,58 ± 0,05 | 1,75 ± 0,09 | 2,48 ± 0,06 |
| dekan | 1003 | - | - | - | - | - | 0,48 ± 0,03 | - | - |
| (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-hepta-2,4-dienal | 1016 | 0,87 ± 0,06 | 0,78 ± 0,10 | 3,94 ± 0,21 | 4,24 ± 0,03 | 3,36 ± 0,22 | 0,58 ± 0,04 | 3,14 ± 0,07 | 2,59 ± 0,26 |
| β-cimen | 1032 | 0,53 ± 0,09 | - | - | - | 1,88 ± 0,12 | - | 0,42 ± 0,04 | 0,37 ± 0,06 |
| limonen | 1037 | 3,02 ± 0,32 | 0,47 ± 0,00 | - | 0,61 ± 0,03 | 7,01 ± 0,66 | 0,33 ± 0,02 | - | 0,27 ± 0,10 |
| benzil-alkohol | 1041 | 4,22 ± 0,89 | 2,35 ± 0,03 | 1,25 ± 0,02 | 1,85 ± 0,02 | 2,43 ± 0,16 | 2,14 ± 0,04 | 0,94 ± 0,21 | 1,36 ± 0,24 |
| (<i>E</i> , <i>E</i>)-okta-3,5-dien-2-ol | 1044 | - | 1,58 ± 0,44 | 0,96 ± 0,02 | 0,68 ± 0,01 | - | 1,31 ± 0,39 | 0,90 ± 0,02 | 0,52 ± 0,00 |
| (<i>E</i>)-3-okten-2-on | 1046 | - | - | 1,05 ± 0,00 | - | - | - | 0,95 ± 0,04 | 0,73 ± 0,05 |
| fenilacetaldehid | 1052 | - | 1,19 ± 0,25 | 1,39 ± 0,10 | 1,36 ± 0,01 | - | 0,95 ± 0,04 | 1,27 ± 0,03 | 1,02 ± 0,13 |
| γ- kaprolakton | 1061 | - | 0,48 ± 0,02 | - | - | - | 0,52 ± 0,02 | - | - |
| (<i>E</i>)-okt-2-enal | 1064 | - | 2,35 ± 0,01 | 2,60 ± 0,18 | 3,90 ± 0,12 | - | 2,79 ± 0,14 | 3,19 ± 0,03 | 4,17 ± 0,02 |
| acetofenon | 1069 | - | - | - | - | - | 0,61 ± 0,02 | - | - |
| (<i>E</i>)-okt-2-en-1-ol | 1073 | 1,89 ± 0,08 | 2,51 ± 0,05 | 2,35 ± 0,03 | 2,04 ± 0,00 | 1,75 ± 0,06 | 2,53 ± 0,01 | 2,34 ± 0,02 | 2,09 ± 0,02 |
| oktilciklopropan | 1076 | 6,99 ± 0,08 | 2,03 ± 0,04 | 5,15 ± 0,07 | 2,86 ± 0,00 | 5,41 ± 0,37 | 2,05 ± 0,04 | 5,47 ± 0,01 | 2,89 ± 0,01 |
| heptanska kiselina | 1079 | - | 2,42 ± 0,02 | 0,90 ± 0,22 | 1,13 ± 0,14 | - | 2,14 ± 0,09 | 1,03 ± 0,03 | 1,13 ± 0,09 |
| nonan-2-on | 1088 | - | - | - | - | - | 0,61 ± 0,06 | 0,57 ± 0,05 | - |
| (<i>E</i> , <i>E</i>)-okta-3,5-dien-2-on | 1097 | 2,98 ± 0,25 | 1,87 ± 0,03 | 1,69 ± 0,02 | 1,41 ± 0,47 | 2,85 ± 0,21 | 1,94 ± 0,09 | 1,93 ± 0,06 | 1,73 ± 0,09 |
| linalol | 1105 | 1,17 ± 0,08 | 0,96 ± 0,05 | 1,14 ± 0,10 | 0,78 ± 0,01 | - | 1,54 ± 0,15 | 1,95 ± 0,13 | 1,18 ± 0,07 |
| nonanal | 1108 | 2,25 ± 0,36 | 1,40 ± 0,01 | 1,05 ± 0,07 | 1,34 ± 0,02 | 6,07 ± 2,31 | 1,31 ± 0,05 | 1,07 ± 0,04 | 1,37 ± 0,08 |
| (3 <i>E</i>)-6-metilhepta-3,5-dien-2-on | 1111 | - | 0,56 ± 0,02 | 0,58 ± 0,06 | 0,42 ± 0,01 | - | 0,94 ± 0,08 | 0,92 ± 0,07 | 0,62 ± 0,01 |
| 2,6- dimetilcikloheksan-1-ol | 1114 | 2,05 ± 0,22 | 1,77 ± 0,04 | 2,40 ± 0,16 | 1,77 ± 0,02 | 1,31 ± 0,20 | 2,01 ± 0,04 | 3,31 ± 0,08 | 1,93 ± 0,08 |
| 2- hidroksiizoforon | 1119 | 1,29 ± 0,11 | 0,88 ± 0,03 | 0,54 ± 0,45 | 1,76 ± 0,08 | 2,63 ± 0,65 | 1,28 ± 0,05 | 1,24 ± 0,07 | 2,55 ± 0,03 |
| 4- ketoizoforon | 1150 | 1,43 ± 0,17 | 0,72 ± 0,04 | 0,58 ± 0,01 | 0,54 ± 0,01 | - | 0,65 ± 0,02 | 0,59 ± 0,03 | 0,53 ± 0,03 |
| (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-nona-2,6-dienal | 1159 | 0,79 ± 0,06 | 0,83 ± 0,02 | 2,00 ± 0,05 | 0,76 ± 0,01 | 1,68 ± 0,41 | 0,67 ± 0,03 | 1,81 ± 0,10 | 0,77 ± 0,08 |
| (<i>E</i>)-non-2-enal | 1165 | - | 1,67 ± 0,00 | 2,20 ± 0,08 | 1,35 ± 0,02 | 0,86 ± 0,51 | 1,45 ± 0,07 | 1,80 ± 0,15 | 1,26 ± 0,11 |
| 2,4- dimetilbenzaldehid | 1179 | - | 0,85 ± 0,03 | 1,12 ± 0,04 | 0,75 ± 0,02 | - | 0,63 ± 0,02 | 0,86 ± 0,06 | 0,62 ± 0,04 |
| butil-heksanoat | 1195 | 1,01 ± 0,09 | - | - | - | 3,93 ± 0,51 | - | - | - |
| (<i>Z</i>)-dek-4-enal | 1197 | - | 0,65 ± 0,04 | 0,86 ± 0,01 | 0,77 ± 0,02 | - | 0,69 ± 0,03 | 0,88 ± 0,05 | 0,80 ± 0,02 |
| dodekan | 1202 | - | 3,07 ± 0,08 | 4,30 ± 0,14 | 2,46 ± 0,05 | - | 3,12 ± 0,20 | 4,22 ± 0,20 | 2,50 ± 0,17 |
| (2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i>)-nona-2,4-dienal | 1218 | - | 0,44 ± 0,01 | 0,44 ± 0,01 | 0,52 ± 0,06 | - | 0,51 ± 0,03 | - | 0,47 ± 0,01 |
| β-ciklocitral | 1226 | 4,61 ± 0,02 | 0,83 ± 0,04 | 1,02 ± 0,01 | 0,72 ± 0,17 | 2,94 ± 0,51 | 0,85 ± 0,03 | 1,25 ± 0,02 | 0,62 ± 0,01 |
| heksil 2-metilpropanoat | 1243 | 2,69 ± 0,06 | - | - | - | 3,65 ± 0,33 | - | - | - |

| | | | | | | | | | |
|---|------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| (<i>E</i>)-dek-2-enal | 1267 | - | 0,54 ± 0,00 | - | 0,77 ± 0,08 | - | - | - | 0,74 ± 0,04 |
| (<i>E</i>)-dek-2-en-1-ol | 1272 | 0,49 ± 0,00 | 2,30 ± 0,06 | 1,57 ± 0,08 | 1,87 ± 0,06 | - | 3,24 ± 0,31 | 1,65 ± 0,09 | 1,85 ± 0,08 |
| dekan-1-ol | 1273 | - | 0,68 ± 0,03 | 0,99 ± 0,04 | 0,70 ± 0,01 | - | 0,75 ± 0,01 | 1,02 ± 0,05 | 0,69 ± 0,03 |
| δ-Oktalaktan | 1284 | - | 4,71 ± 0,06 | 3,35 ± 0,06 | 2,06 ± 0,08 | - | 5,29 ± 0,22 | 3,96 ± 0,17 | 2,54 ± 0,32 |
| undekan-2-on | 1292 | - | 1,00 ± 0,03 | 0,80 ± 0,02 | 0,43 ± 0,05 | - | 1,10 ± 0,06 | 0,96 ± 0,02 | 0,34 ± 0,07 |
| (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)-deka-2,4-dienal | 1296 | - | 1,88 ± 0,03 | 1,45 ± 0,03 | 1,74 ± 0,08 | 1,49 ± 0,75 | 1,80 ± 0,01 | 1,47 ± 0,07 | 2,10 ± 0,04 |
| tridekan | 1304 | - | 1,13 ± 0,00 | 0,70 ± 0,06 | - | - | 1,02 ± 0,06 | 0,76 ± 0,01 | 0,34 ± 0,03 |
| undekanal | 1309 | - | 1,68 ± 0,01 | 1,10 ± 0,04 | - | - | 1,45 ± 0,04 | 1,23 ± 0,00 | 0,30 ± 0,18 |
| (<i>E</i> , <i>E</i>)-deka-2,4-dienal | 1320 | - | 3,50 ± 0,02 | 2,66 ± 0,03 | 3,11 ± 0,02 | 1,78 ± 0,16 | 3,37 ± 0,08 | 2,80 ± 0,07 | 3,11 ± 0,03 |
| (<i>E</i>)-undek-2-en-1-ol | 1340 | - | 3,62 ± 0,01 | 2,81 ± 0,01 | 3,15 ± 0,02 | - | 3,66 ± 0,18 | 2,77 ± 0,28 | 3,30 ± 0,02 |
| 3,4- dehidroionen(1,1,6- trimetil -2h-naftalin) | 1358 | - | 1,18 ± 0,02 | 0,93 ± 0,12 | 1,04 ± 0,02 | - | 1,13 ± 0,05 | 0,89 ± 0,03 | 1,09 ± 0,05 |
| heksil-heksanoat | 1390 | 1,74 ± 0,32 | - | - | - | 1,10 ± 0,11 | - | - | - |
| tetradekan | 1402 | - | 1,40 ± 0,04 | 1,41 ± 0,01 | 1,16 ± 0,00 | - | 1,03 ± 0,13 | 1,29 ± 0,03 | 1,06 ± 0,03 |
| dodekanal | 1409 | - | 0,45 ± 0,01 | - | - | - | - | - | - |
| β-jonon | 1489 | 10,24 ± 0,74 | 1,51 ± 0,01 | 1,48 ± 0,03 | 1,75 ± 0,06 | 4,81 ± 1,05 | 1,39 ± 0,03 | 1,50 ± 0,01 | 1,62 ± 0,01 |
| pentadek-1-en | 1498 | - | 1,58 ± 0,00 | 0,77 ± 0,01 | 0,49 ± 0,01 | - | 1,47 ± 0,00 | 0,80 ± 0,01 | 0,48 ± 0,01 |
| pentadekan | 1502 | 2,18 ± 0,71 | - | - | 0,44 ± 0,00 | - | - | - | 0,38 ± 0,02 |
| 2,4-ditert-butilfenol | 1518 | - | 0,52 ± 0,02 | - | - | - | 0,52 ± 0,04 | - | - |
| dihidroaktinolid | 1532 | 1,17 ± 0,23 | 1,15 ± 0,03 | 1,78 ± 0,09 | 0,96 ± 0,03 | - | 1,00 ± 0,06 | 1,79 ± 0,02 | 0,93 ± 0,00 |
| dibutil-ftalat | 1967 | - | - | - | 5,53 ± 0,67 | - | - | - | 6,06 ± 0,46 |

Od uzoraka ekstrahiranom s DVB/CAR/PDMS vlaknom, u uzorku sušenom u pećnici identificirano je 90,80 % (Tablica 1.) od ukupno detektiranih spojeva, a najzastupljeniji su bili alifatski nezasićeni spojevi (46,97 %) (slika 12.). Slična zastupljenost alifatskih nezasićenih spojeva identificirana je u uzorku sušenom u sjeni (46,91%, ukupno identificirano 92,37 %) i liofiliziranom uzorku (46,44%, ukupno identificirano 88,93 %). Svježi uzorak, iako ima najveći ukupan udio identificiranih spojeva (94,83 %) od svih uzoraka koji su ekstrahirani s ovim vlaknom, sadrži najmanji postotak alifatskih nezasićenih spojeva (31,79 %). Najveći postotak alifatskih nezasićenih spojeva može se prepisati njihovoj niskoj molekularnoj masi, isparljivosti i većoj reaktivnosti u odnosu na alifatski zasićene spojeve. Poznato je da su ugljikovodici karakteristični spojevi za morske beskralježnjake i alge te su dio njihovog obrambenog sustava. (Tablica 1., Slika 12.). (49)



Slika 12. Histogramski prikaz strukturalnih skupina spojeva u analiziranim uzorcima vršnih para *C. compressa* izoliranih DVB/CAR/PDMS vlaknom: svježi uzorak (SvCC (v1)), uzorak sušen u sjeni (SjCC (v1)), uzorak sušen u pećnici (PeCC (v1)), liofilizirani uzorak (LiCC (v1)).



Slika 13. Histogramski prikaz kvantitativno najzastupljenijih spojeva u analiziranim uzorcima vršnih para *C. compressa* izoliranih DVB/CAR/PDMS vlaknom: svježi uzorak (SvCC (v1)), uzorak sušen u sjeni (SjCC (v1)), uzorak sušen u pećnici (PeCC (v1)), liofilizirani uzorak (LiCC (v1)).

Najzastupljeniji spoj bio je okt-1-en-3-ol oksilipin poznat kao globalni metabolom koji potiče obranu morskih beskralješnjaka i algi. (50) Uglavnom za proizvodnju oksilipina, smeđe alge metaboliziraju C_{18} i C_{20} kiseline djelovanjem lipooksigenaza na C-6. (51) U liofiliziranom uzorku površinski udio mu je 14,01 %, uzorku sušenom u sjeni 13,78 %, te u uzorku sušenom u pećnici 10,17 %. To je ujedno bio i najdominantniji spoj od svih identificiranih spojeva u navedenim uzorcima. U svježem uzorku spoj okt-1-en-3-ol (5,61%), iako najzastupljeniji od svih identificiranih nezasićenih ugljikovodika, ima 2,5 puta manji sadržaj nego u liofiliziranom uzorku. Pojava nižih alifatskih karbonilnih spojeva u suhom uzorku može biti rezultat izražene reakcije oksidacije i razgradnje spojeva izvedenih iz lipida tijekom sušenja (Slika 13.). (52) (53)

Druga dva najzastupljenija spoja skupine alifatskih nezasićenih spojeva u svježem uzorku su pent-1-en-3-ol (4,98 %) i pent-2-en-1-ol (4,24 %), dok su u ostalim uzorcima prisutni u malim udjelima. Tako je sadržaj pent-1-en-3-ola u liofiliziranom uzorku (0,95 %) čak 5,2 puta manji nego u svježem uzorku, a sadržaj pent-2-en-1-ola u uzorku sušenom u pećnici (1,33 %) je 3,2 puta manji nego u svježem uzorku. Heks-3-en-1-ol, alifatski nezasićeni spoj, identificiran je jedino u svježem uzorku (3,99%) i liofiliziranom uzorku (1,85 %) (Tablica 1, Slika 13.).

Od alifatskih nezasićenih spojeva dva spoja koja nisu identificirana u svježem uzorku, ali su identificirana u tri ostala uzorka u značajnijoj količini su (E)-undek-2-en-1-ol i (E,E)-deka-2,4-dienal. (E)-Undek-2-en-1-ol prisutan je najviše u uzorku sušenom u sjeni (3,62 %) te nešto malo manje u liofiliziranom uzorku (3,15 %) i uzorku sušenom u pećnici (2,81 %). (E,E)-Deka-2,4-dienal prisutan je najviše u uzorku sušenom u sjeni (3,50 %) te nešto malo manje u liofiliziranom uzorku (3,11 %) i uzorku sušenom u pećnici (2,66 %). Spoj (2E,4E)-hepta-2,4-dienal identificiran je u znatnim količinama u liofiliziranom uzorku (4,24 %) i u uzorku sušenom u sjeni (3,94 %), dok je u svježem uzorku (0,87 %) i u uzorku sušenom u sjeni (0,78 %) prisutan u znatno manjim količinama. Povećani udio nezasićenih aldehida u sušenim uzorcima vjerojatno je rezultat cijepanja dvostrukih veza odgovarajućih nezasićenih masnih kiselina tijekom sušenja. (54) (Tablica 1, Slika 13.)

Alifatski zasićeni spojevi su druga najzastupljenija skupina, najviše zastupljena u uzorku sušenom u pećnici (27,18 %), u sličnim omjerima u svježem uzorku (26,37 %) te malo manje u uzorku sušenom u sjeni (22,77 %) i u liofiliziranom uzorku (19,72 %)(Slika 12.). Najzastupljeniji od identificiranih alifatskih zasićenih spojeva je oktilciklopropan i prisutan je u najvećem udjelu u svježem uzorku (6,99 %), malo manje u uzorku sušenom u pećnici (5,15 %), dok je njegov udio čak 2,4 puta manji u liofiliziranom uzorku (2,86 %) i 3,44 puta manji u uzorku sušenom u sjeni (2,03 %) u odnosu na svježi uzorak (Tablica 1, Slika 13).

Dva spoja koja nisu identificirana u svježem uzorku, a identificirana su u ostala tri uzorka su δ -oktalakton i dodekan. Udio δ -oktalaktona je najviši u uzorku sušenom u sjeni (4,77 %), zatim u uzorku sušenom u pećnici (3,35 %) i u liofiliziranom uzorku (2,06 %). Dodekan je najdominantniji u uzorku sušenom u pećnici (4,30%), dok ga ima manje u uzorku sušenom u sjeni (3,07%) i liofiliziranom uzorku (2,46 %). Razlog identifikacije dodekana u osušanim uzorcima može se pripisati prisutnosti cijanobakterija koje simbiotski žive sa spužvama. Otkriveno je da se biosintetski put iz cijanobakterija sastoji od acil-acil nosača proteina reduktaze i aldehyd dekarbonilaze, koji zajedno pretvaraju međuprodukte metabolizma masnih kiselina u alkane i alkene. (55)

Spoj heksan-1-ol, masni alkohol koje djeluje kao bioaktivni agens s antimikrobnim, antifungalnim biološkim aktivnostima, određen je u znatnim količinama u svježem uzorku (4,86 %), dok mu je udio nakon procesa sušenja u liofiliziranom uzorku (0,68 %) 7,1 puta manji, a u ostala dva uzorka nije detektiran (Tablica 1, Slika 13.). (56) (57)

Udio skupine derivata benzena je najveći u liofiliziranom uzorku (13,91 %), zatim u svježem uzorku (10,50 %), dok su u uzorku sušenom u sjeni (8,69 %) i uzorak sušen u pećnici (7,15 %) udjeli malo niži (Slika 12.). Razlog zbog kojeg liofilizirani uzorak ima veći udio derivata benzena je znatna količina spoja dibutil-ftalat (5,53 %), a nije detektiran u ostala tri uzorka. Utvrđeno je različitim metodama da alge imaju sposobnost prirodnog sintetiziranja dialkil-ftalata. (58)

Najzastupljeniji spoj skupine derivata benzena bio je benzaldehid i to u svježem uzorku (4,88 %), a uočen je znatan gubitak nakon sušenja: u liofiliziranom uzorku (2,85 %) 1,7 puta manje, u uzorku sušenom u sjeni (2,79 %) 1,8 puta manje, te u uzorku sušenom u pećnici (2,35 %) 2,1 puta manje. Kao što je već objašnjeno u prethodno objavljenom istraživanju gubitak benzaldehida tijekom sušenja na zraku mogao bi biti posljedica njegove visoke isparljivosti. (59) (60) (61)

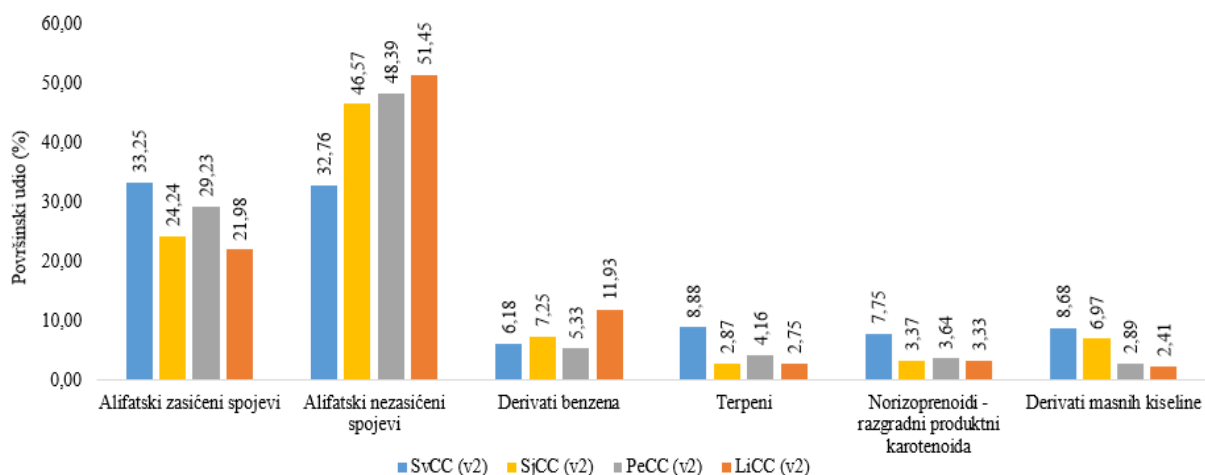
Još jedan od spojeva na koji je sušenje imalo sličan utjecaj je benzil-alkohol, kojemu je udio najviši u svježem uzorku (4,22 %), znatno manje u liofiliziranom uzorku (1,85 %) te u sličnim udjelima u uzorku sušenom u sjeni (2,35 %) i uzorku sušenom u pećnici (1,25 %) (Tablica 1, Slika 13.). Derivati fenilpropana izvedeni su iz fenilalanina s bočnim lancem skraćenim za dva ugljikova atoma koji može zauzeti mjesto β -oksidativno ili neoksidativno. (62) Terpeni su najdominantniji bili u svježem uzorku (5,88 %), nakon sušenja dolazi do znatnog pada udjela terpena, oko 50 % u sva tri uzorka: uzorak sušen u sjeni (2,58 %), uzorak sušen u pećnici (2,91 %) i liofilizirani uzorak (2,34 %). Glavni razlog tome je spoj limonen koji je prisutan u znatnim količinama u svježem uzorku (3,02 %), dok dolazi do značajnog pada njegovog udjela u sušenim uzorcima. U liofiliziranom uzorku (0,61 %) udio mu je čak 5 puta manji, dok u uzorku sušenom u sušenom u sjeni (0,41 %) ga je 7,4 puta manje. (Tablica 1., Slika 12.) Porast alifatskih spojeva i derivata benzena vjerojatno je doveo do smanjenja obilja seskviterpena u prostoru vršnim parama. (63)

Najveću razliku u zastupljenosti strukturnih spojeva između uzoraka zabilježena je kod norizoprenoida - derivata izoprenoida s jednom ili više jedinica izoprena (pet-ugljični monomer). Svježi uzorak sadrži najveći udio norizoprenoida u iznosu od 14,85 % dok je udio u preostala tri uzorka znatno niži. Zabilježen je udio 4,2 puta manji u uzorku sušenom u sjeni (3,52 %) i liofiliziranom uzorak (3,52 %) te 4,3 puta manji u uzorku sušenom u pećnici (3,44 %) (Slika 12.).

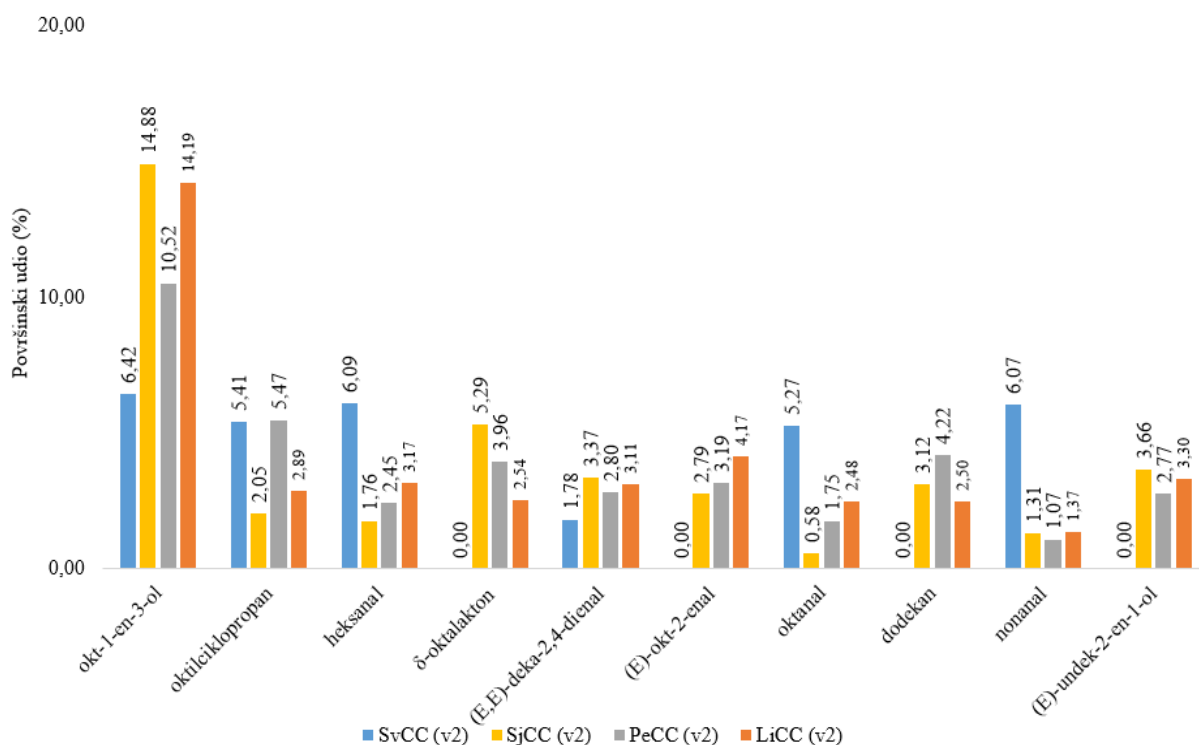
Razlog tomu su dva spoja, β -jonon i β -ciklocitral. Spoj β -jonon je izrazito zastupljen u svježem uzorku u udjelu od 10,24% dok je zamijećen gubitak sušenjem. U liofiliziranom uzorku (1,75 %) njegov udio je 5,9 puta manji, u uzorku sušenom u pećnici (1,48 %) 6,9 puta manji i u uzorku sušenom u sjeni (1,51 %) 6,8 puta manji. Veliki gubitak sušenjem je zamijećen i kod spoja β -ciklocitrala. U svježem uzorku mu je udio 4,61 % dok je u sušenim uzorcima znatno niži: uzorak sušen u sjeni (0,83 %), uzorak sušen u pećnici (1,02 %) i u liofiliziranom uzorku (0,72 %). Manja prisutnost nakon sušenja vjerojatno je posljedica njihove isparljivosti i povećanja udjela drugih spojeva u prostoru vršnih para. (63) (Tablica 1, Slika 13.)

Udio derivata masnih kiselina je najveći u uzorku sušenom u sjeni (7,89 %), malo manje u svježem uzorku (5,44 %), a znatno manje u uzorku sušenom u pećnici (3,15 %) i u liofiliziranom uzorku (2,46 %). Razlog najvećem udjelu derivata masnih kiselina u uzorku sušenom u sjeni je prisutnost heptanske i heksanske kiseline. Već je utvrđeno da sušenje algi ima utjecaj na sastav masnih kiselina, osušeni uzorci algi sadrže manje udjele polinezasićenih masnih kiselina, što dovodi do zaključka da su te komponente osjetljive na oksidaciju. (Tablica 1.) (64)

Iako svježi uzorak ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom ima najveći udio identificiranih spojeva (97,50 %) sadrži najmanji postotak alifatskih nezasićenih spojeva (32,76 %). Znatno veći postotak alifatskih nezasićenih spojeva zamijećen je u uzorku sušenom u sjeni (46,57 %, ukupno identificirano 91,28 %), a slična zastupljenost nezasićenih ugljikovodika zamijećena je u uzorku sušenom u pećnici (48,39 %, ukupno identificirano 92,37 %). Liofilizirani uzorak (51,45 %, ukupno identificirano 93,85 %) sadrži najveći udio alifatskih nezasićenih spojeva (Tablica 1., Slika 14).



Slika 14. Histogramski prikaz kvantitativno najzastupljenijih spojeva u analiziranim uzorcima vršnih para *C. compressa* izoliranih PDMS/DVB vlaknom: svježi uzorak (SvCC (v2)), uzorak sušen u sjeni (SjCC (v2)), uzorak sušen u pećnici (PeCC (v2)), liofilizirani uzorak (LiCC (v2)).



Slika 15. Histogramski prikaz kvantitativno najzastupljenijih spojeva u analiziranim uzorcima vršnih para *C. compressa* izoliranih PDMS/DVB vlaknom: svježi uzorak (SvCC (v2)), uzorak sušen u sjeni (SjCC (v2)), uzorak sušen u pećnici (PeCC (v2)), liofilizirani uzorak (LiCC (v2)).

Najzastupljeniji spoj iz skupine alifatskih nezasićenih spojeva te ujedno i najzastupljeniji spoj ekstrahiran PDMS/DVB vlaknom bio je oksipilin okt-1-en-3-ol. Ovaj spoj koristi se za obranu morskih organizama bez kralježnice i algi. (50) Kada je riječ o proizvodnji oksipilina, smeđe alge proizvode C₁₈ i C₂₀ kiseline putem lipooksigenaza (na C-6). (51) U uzorku sušenom u sjeni prisutan je u udjelu od 14,88 %, liofiliziranom uzorku 14,19 %, te u uzorku sušenom u pećnici 10,52 %. U svježem uzorku sadržaj spoja okt-1-en-3-ol (6,42 %), iako najzastupljenijeg od svih spojeva skupine alifatskih nezasićenih spojeva, je 2,3 puta manji nego u uzorku sušenom u sjeni (Tablica 1., Slika 15.). Pojava alifatskih karbonilnih spojeva s manjim brojem ugljika u suhom uzorku mogla bi proizaći iz intenzivne oksidacije i razgradnje lipidnih derivata tijekom postupka sušenja. (52) (53) Nezasićeni ugljikovodik 3-heksen-1-ol jedino je identificiran u svježem uzorku (3,69 %) i liofiliziranom uzorku (1,41 %).

Spojevi (*E*)-undek-2-en-1-ol i (*E*)-okt-2-enal nisu identificirani u svježem uzorku, ali su prisutni u sušenim uzorcima. Sadržaj (*E*)-undek-2-en-1-ola u liofiliziranom uzorku je 3,33 %, u uzorku sušenom u pećnici 2,77 %, a u uzorku sušenom u sjeni 3,66 %.

Spoj (*E*)-Okt-2-enal u liofiliziranom uzorku se nalazi u udjelu od 4,17 %, uzorku sušenom u pećnici 3,19 % i uzorku sušenom u sjeni 2,79 %. Spoj (*E,E*)-deka-2,4-dienal identificiran je u sličnim omjerima u uzorku sušenom u sjeni (3,37 %), uzorku sušenom u pećnici (2,80 %) i liofiliziranom uzorku (3,11 %), dok je u svježem uzorku (1,49 %) prisutan u manjem udjelu (Tablica 1., Slika 15.). Tijekom sušenja, dvostruke veze određenih nezasićenih masnih kiselina vjerojatno su se rascijepale, što je rezultiralo nastankom nezasićenih aldehida. (54)

Udio skupine alifatskih zasićenih spojeva najveći je u svježem uzorku (33,25 %), u sličnom udjelu u uzorku sušenom u pećnici (29,23 %) dok je znatno manji udio u uzorku sušenom u sjeni (24,24 %) i u liofiliziranom uzorku (21,98 %) (Slika 14.).

Najzastupljeniji spoj skupine alifatskih zasićenih spojeva je oktilciklopropan i prisutan je u sličnom postotku u svježem uzorku (5,41 %) i u uzorku sušenom u pećnici (5,47%). U liofiliziranom uzorku njegov udio je 1,9 puta manji (2,89 %) i 2,64 puta manji u uzorku sušenom u sjeni (2,05 %) u odnosu na svježi uzorak (Tablica 1, Slika 15).

Četiri spoja kojima je zabilježen najveći gubitak nakon sušenja su heksanal, oktanal, nonanal i heptan-2-on. Najvjerojatniji razlog tome je njihova visoka isparljivost. Spoj heksanal i oktanal imaju visoki udio u svježem uzorku (heksanal 6,09 %; oktanal 5,27 %), međutim nakon sušenja dolazi do pada njihovog udjela u liofiliziranom uzorku (heksanal 3,17 %; oktanal 2,48 %), uzorku sušenom u pećnici (heksanal 2,45 %; oktanal 1,75 %) i u uzorku sušenom u sjeni (heksanal 1,76%; oktanal 0,58 %). Slično tomu spoj nonanal ima veliku razliku u udjelu u svježem uzorku (6,07 %) u usporedbi s liofiliziranim uzorkom (1,37%), uzorkom sušenom u pećnici (1,07 %) i uzorku sušenom u sjeni (1,31%). Spoju heptan-2-on zabilježen je pad udjela do oko 10 puta nakon sušenja. U svježem uzorku udio mu je 4,41 %, u liofiliziranim uzorku 0,48%, uzorku sušenom u pećnici 0,53% i uzorku sušenom u sjeni 0,65 %. (Tablica 1.).

Dva spoja koja nisu identificirana u svježem uzorku, a identificirana su u ostala tri uzorka su δ -oktalakton i dodekan. δ -Oktalakton je zastupljen najviše u uzorku sušenom u sjeni (5,29 %), u liofiliziranom uzorku (2,54 %) čak do 2,1 puta manje i 1,3 puta manje u uzorku sušenom u pećnici (3,96 %). Dodekan je najzastupljeniji u uzorku sušenom u pećnici (4,22 %), a znatno manje ga ima u liofiliziranom uzorku (2,50 %) i u uzorku sušenom u sjeni (3,12 %). Identifikacija dodekana u osušenim uzorcima mogla bi biti posljedica prisutnosti cijanobakterija koje žive u simbiozi sa spužvama. Utvrđeno je da biosintetski mehanizam u cijanobakterijama uključuje acil-acil nosač protein reduktazu i aldehid dekarbonilazu. Ovi enzimi surađuju u pretvorbi među produkata iz metabolizma masnih kiselina u alkane i alkene. (55) (Tablica 1.).

Skupina derivata benzene je prisutna u najvećem postotku u liofiliziranom uzorku (11,93 %), a znatno manje u ostalim uzorcima: svježi uzorak (6,18 %), uzorak sušen u sjeni (7,25 %) i uzorak sušen u pećnici (5,33 %) (Slika 14.). Razlog zbog kojeg liofilizirani uzorak ima veći postotak skupine aromatskih spojeva je spoj dibutil-ftalat. On je jedini derivat benzene zastupljen u znatnoj količini u liofiliziranom uzorku (6,06 %), a u preostala tri uzorka nije detektiran (Tablica 1.). Pokazalo se raznim metodama da alge mogu prirodno sintetizirati dialkil-ftalate. (58)

Skupina terpena je najdominantnija u svježem uzorku (8,68 %), a nakon sušenja dolazi do znatnog gubitka terpena u sva tri uzorka. Nalazimo ih znatno manje u uzorku sušenom u pećnici (4,16 %), u uzorku sušenom u sjeni (2,87 %) i liofiliziranom uzorku (2,87 %) (Slika 14.). Značajan porast alifatskih spojeva (kao i derivata benzene) vjerojatno je uzrokovao smanjenje obilja seskviterpena u prostoru vršnim parama (headspace). (63)

Glavni razlog tomu je spoj limonen koji je detektiran u znatnim količinama u svježem uzorku (7,01 %), dok nakon sušenja dolazi do značajnog gubitka. U liofiliziranom uzorku (0,27 %) čak ga je 26 puta manje, dok u uzorku sušenom u sušenom u sjeni (0,33 %) ga je 21,2 puta manje (Tablica 1.).

Kod strukturne skupine norizoprenoida svježi uzorak sadrži najveći postotak (7,75 %), dok ostala tri uzorka sadrže oko 50% manje identificiranih spojeva. Uzorak sušen u sjeni (3,37 %), liofilizirani uzorak (3,33 %) i uzorak sušen u pećnici (3,64 %) sadrže sličan postotak norizoprenoida (Slika 14.).

Razlog tomu su dva spoja, β -jonon i β -ciklocitral. Spoj β -jonon dominira u svježem uzorku (4,81 %), dok je zabilježen gubitak nakon sušenja. U liofiliziranom uzorku (1,62 %) udio mu je 3 puta manji, u uzorku sušenom u pećnici (1,50 %) 3,2 puta manji, a u uzorku sušenom u sjeni (1,39 %) 3,5 puta manji. Razlika identificiranog spoja β -ciklocitrala u svježem uzorku (2,94 %) je znatno veća u usporedbi s uzorkom sušenom u sjeni (0,85 %), uzorkom sušenom u pećnici (1,25 %) i u liofiliziranom uzorku (0,62 %). Manja prisutnost nakon sušenja vjerojatno je posljedica njihove isparljivosti i povećanja udjela drugih spojeva u prostoru vršnim parama (headspace). (63) (Tablica 1, Slika 14.)

Skupina derivata masnih kiselina je najizraženija u svježem uzorku (8,68 %), malo manje u uzorku sušenom u sjeni (6,97 %) dok znatno manje u uzorku sušenom u pećnici (2,89 %) i u liofiliziranom uzorku (2,41 %). Razlog većeg udjela u svježem uzorku su dva spoja, heksil-2-metilpropanoat i butil-heksanoat, koji su detektirani jedino u svježem uzorku (3,65 % i 3,93 %) Već je poznato da postupak sušenja algi može promijeniti sastav masnih kiselina. U osušenim algama nalazi se smanjeni udio polinezasićenih masnih kiselina, što sugerira da su te komponente podložne oksidaciji. (Tablica 1.).

4. ZAKLJUČAK

Praćen je utjecaj sušenja na gubitak isparljivih organskih spojeva smeđe alge *Cystoseira compressa*. Alga je sušena na tri načina: 10 dana na sobnoj temperaturi u sjeni, 24h na 60 °C u ventiliranoj pećnici i 2 dana u liofilizatoru. Uzorak svježe alge je korišten kao kontrolni uzorak. Mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi ekstrahirane su vršne pare uzoraka na DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB vlaknima radi potpunijeg profila vršnih para. Uzorci su analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa.

Udio ukupno identificiranih isparljivih organskih spojeva je od 88,39 % (liofilizirani uzorak) do 94,83 % (svježi uzorak) za DVB/CAR/PDMS vlakno i od 91,28 % (uzorak sušen u sjeni) do 97,50 % (svježi uzorak) za PDMS/DVB vlakno.

Nezasićeni alifatski spojevi bili su najzastupljenija skupina spojeva u sva četiri uzorka koristeći oba vlakna. Važno je uočiti da nakon sušenja dolazi do povećanja udjela skupine nezasićenih ugljikovodika, od 1,5-1,6 puta.

Udio identificiranih nezasićenih alifatskih spojeva je od 31,79 % (svježi uzorak) do 46,97 % (uzorak sušen u pećnici) za DVB/CAR/PDMS vlakno i od 32,76 % (svježi uzorak) do 51,45 % (liofilizirani uzorak) za PDMS/DVB vlakno.

Spoj okt-1-en-3-ol bio je najzastupljeniji spoj u uzorku sušenom u sjeni, uzorku sušenom u pećnici i liofiliziranom uzorku za oba vlakna.

Slijedeća najzastupljenija skupina je skupina alifatskih zasićenih spojeva, koje je predvodio spoj oktilciklopropan. Na oba vlakna je prevladavao u sličnom udjelu u svježem uzorku i uzorku sušenom u pećnici, dok ga je bilo 2 do 3 puta manje u ostalim uzorcima.

Derivati benzena su slijedeća značajna skupina čiji je udio bio najviši za oba vlakna u liofiliziranom uzorku i glavni razlog tome je bio spoj dibutil-ftalat, jer je jedino detektiran u liofiliziranom uzorku na oba vlakna.

Kod norizoprenoida uočen je najveći utjecaj sušenja na omjer postotka spojeva između uzoraka, a glavni razlog tomu je spoj β -jonon. Naime, on je najzastupljeniji spoj u svježem uzorku za DVB/CAR/PDMS vlakna, a nakon sušenja njegov udio pada od 5,9 – 6,9 puta. Na PDMS-DVB vlaknu udio nakon sušenja pada od 3 – 3,5 puta

Derivat masnih kiselina su za oba vlakna bili najzastupljeniji u svježem uzorku i uzorku sušenom u pećnici, dok ih je bilo 2 do 3 puta manje u ostalim uzorcima.

Postupak sušenja utječe na sastav i koncentraciju bioaktivnih spojeva u uzorcima algi. Svježi uzorak u odnosu na sušene uzorke sadrži veći udio terpena, norizoprenoida i alifatskih zasićenih spojeva, dok ima znatno manje alifatskih nezasićenih spojeva. Ukupni identificirani postotak isparljivih organskih spojeva se nije previše razlikovao s obzirom na metodu sušenja, dok do razlike dolazi kod udjela strukturnih skupina. Najveća razlika je uočena kod skupine alifatskih zasićenih spojeva, skupine derivata benzena i skupine derivata masnih kiselina. Uzorak sušen u pećnici sadrži veći udio alifatskih zasićenih spojeva od druga dva sušena uzorka. Skupina derivata benzena čini veći udio u liofiliziranom uzorku, a skupina derivata masnih kiselina u uzorku sušenom u sjeni u odnosu na preostala dva načina sušenja.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

GC-MS - plinska kromatografija-spektrometrija mase - gas chromatography–mass spectrometry

DVB/CAR/PDMS - divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksanom - divinylbenzene/carboxen/ polydimethylsiloxane

PDMS/DVB - polidimetilsiloksan/divinilbenzen - polydimethylsiloxane/divinylbenzene

HS-SPME - mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi - headspace-solid phase microextraction

EU - Europska unija - European **u**nion

HIV- virus humane imunodeficijencije - human immunodeficiency virus -

FMAHD - fokusirana hidrodestilacija mikrovalovima – focused microwave-assisted hydrodistillation

SHS - statička izolacija vršnih para - static headspace

DHS - dinamička izolacija vršnih para - dynamic headspace

SPME - mikroekstrakcija na čvrstoj fazi - solid phase microextraction

GC - plinska kromatografija - gas chromatography

MS - spektrometrija masa - mass spectrometry

CO₂- ugljikov dioksid - carbon dioxide

Ω-3 – omega 3

δ-oktalakton – delta oktalakton

β-jonon – beta jonon

Na/K – natrij / kalij - sodium/potassium

He – helij - helium

PTFE – politetrafluoroetilen - polytetrafluoroethylene

SvCC - svježi uzorak alge *C. Compressa* - fresh sample of the alga *C. compressa*

SjCC - uzorak alge *C. compressa* sušen u sjeni na sobnoj temperaturi u vremenskom razdoblju od 10 dana - sample of the alga *C. compressa* dried in shade at room temperature over a period of 10 days

PeCC - uzorak alge *C. compressa* sušen u pećnici na 60°C u trajanju od 24 h - sample of the alga *C. compressa* dried in an oven at 60°C for 24 hours

LiCC - liofilizirani uzorak alge *C. compressa*, trajanje liofilizacije 2 dana - lyophilized (freeze-dried) sample of the alga *C. compressa*, lyophilization duration 2 days

6. LITERATURA

1. O. Berteau, B. Mulloy, Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, Vol. 13, Issue 6, 2003, str. 13, 29–40, doi: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg058>.
2. F. Gianni, F. Bartolini, L. Airoidi, E. Ballesteros, P. Francour, P. Guidetti, Conservation and restoration of marine forests in the Mediterranean Sea and the potential role of marine protected areas. s.l. : *Adv. Oceanogr. Limnol.* Vol. 4, Issue 2 2013, str. 83–101, doi: <https://doi.org/10.4081/aiol.2013.5338>.
3. United Nations Environment Programme (UNEP), Available online, in: Convention for the Protection of the Marine Environment and the Coastal Region of the Mediterranean and Its Protocols. Mediterranean Action Plan-Barcelona Convention Secretariat, 2019, p. 153, https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/31970/bcp2019_web_eng.pdf. (Accessed 26 September 2023).
4. Council of Europe, Bern Convention/Convention de Berne: Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats/Convention Relative a ` la Conservation Dela Vie Sauvage et du Milieu Naturel de l'Europe; Appendix/Annexe I, 19.IX.1979, Council of Europe, Strasbourg, France, 1979.
5. H. Directive, Council directive 92/43/EEC of 21 may 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora, *Off. J. Eur. Union* 206 (1992) 7–50.
6. O. López-Pérez, A. Picon, M. Nuñez, Volatile compounds and odour characteristics of seven species of dehydrated edible seaweeds. *Food Res Int.*, Vol. 99, Part 3, 2017, str. 1002-1010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.013>.
7. N.E. Awad, H.M. Motawe, M.A. Selim, A.A. Matloub, Volatile Constituents of the Brown Algae *Padina pavonia* (L.) Gaill and *Hydroclathrus clathratus* (C. Agardh) Howe and their Antimicrobial Activity. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2009, str. 12-15.
8. S. M. Adl, Alastair G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot Microbiol.* Vol. 52, Issue 5, 2005, str. 52, 399-451, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>.
9. D. J. McHugh, A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 2003, str. 441, 1-98.
10. O. McConnell, W. Fenical, Halogen chemistry of the Red algae *Asparagopsis*. s.l. : *Phytochemistry*, Vol. 16, Issue 3, 1977, str. 367-374, doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)80067-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80067-8).
11. AM. Cikoš, M. Jurin, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis, and Bioactivity. Vol. 17, Issue 9, *Mar Drugs*, 2019, str. 537, doi: <https://doi.org/10.3390/md17090537>.

12. R.E. Lee, *Phycology*, Cambridge University Press, 2008.
13. A. A. El-Gamal, Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Vol. 18, Issue 1, 2010, str. 18, 1–25, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>.
14. L.E. Graham, J.M. Graham, L.W. Wilcox, *Algae*. Benjamin Cummings, 2009.
15. F.E. Round, *The Ecology of Algae*. Cambridge University Press, 1981.
16. C. B. de Sousa, K. N. Gangadhar, J. Macridachis, M. Pavão, T. R. Morais, L. Campino, J. Varela, J. Henrique G. Lago, Cystoseira algae (Fucaceae): update on their chemical entities and biological activities. *Tetrahedron Asymmetry*, Vol. 28, Issue 11, 2017, str. 18.
17. V. Gressler, N. Yokoya, M. Fujii, P. Colepicolo, J. Mancini Filho, R. Torres, E. Pinto, Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*, Vol. 120, Issue 2, 2010, str. 585-590, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.028>
18. LA. Tziveleka, M.A. Tammam, O. Tzakou, V. Roussis, E. Ioannoum, Metabolites with Antioxidant Activity from Marine Macroalgae, *Antioxidants*, Vol. 10, Issue 9, 2021, str: 10, 1431, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10091431>.
19. K. W. Oum, M. J. Lakin, D. O. De Haan, T. Brauers, B.J. Finlayson-Pitts, Formation of molecular chlorine from the photolysis of ozone and aqueous sea-salt particles, *Science*, Vol 279, Issue 5347, 1998, str. 74-77, doi: <https://doi.org/10.1126/science.279.5347.74>.
20. J. W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H. Munro, M.R. Prinsep, *Marine natural products*, s.l. : Nat. Prod. Rep. 2016, str. 382-431.
21. X. Zhang, L. Lai, G. Xu, X. Zhang, J. Shi, Z. Xu, Effects of pyruvate kinase on the growth of *Corynebacterium glutamicum* and L-serine accumulation. *Process Biochemistry*, Vol. 55, 2017, str. 55, 32–40, doi: <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0313-6>.
22. Z. Zuo, L. Yang, S. Chen, C. Ye, Y. Han, S. Wang, Effects of nitrogen nutrients on the volatile organic compound emissions from *Microcystis aeruginosa*, *Ecotoxicol Environ Saf.*, Vol 161, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.095>.
23. S. Suurnäkki, G. V. Gomez-Saez, A. Rantala-Ylinen, J. Jokela, D.P. Fewer, K. Sivonen, Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, *Water Res.*, Vol. 68, 2015, str. 68, 56–66, doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.037>.
24. S. B. Watson, F. Jüttner, O. Köster, *Daphnia* behavioural responses to taste and odour compounds: ecological significance and application as an inline treatment plant monitoring tool. *Water Sci Technol.*, Vol. 55, Issue 5, 2007, str. 55, 23–31, doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2007.158>.
25. Z. Zuo, Why Algae Release Volatile Organic Compounds—The Emission and Roles. *Front Microbiol*. Vol. 10, 2019, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00491>.

26. AM. Cikoš, S. Jokić, D. Šubarić, I. Jerković, Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae, *Mar. Drugs*, Vol. 16, Issue 10, 2018, str. 348, <https://doi.org/10.3390/md16100348>.
27. AM. Cikoš, M. Jurin, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis and Bioactivity, *Mar. Drugs*, Vol. 17, Issue 9, 2019, str. 537, doi: <https://doi.org/10.3390/md17090537>.
28. N. C. Afonso, M. D. Catarino, A. M. S. Silva, S. M. Cardoso, Brown Macroalgae as Valuable Food Ingredients, *Antioxidants (Basel)*, Vol. 8, Issue 9, 2019, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8090365>.
29. P. Rupérez, F. Saura-Calixto, Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds, *European food research and technology*, 2001, str. 349-354, doi: <https://doi.org/10.1007/s002170000264>.
30. A. Gomez-Zavaglia, M.A. Prieto Lage, C. Jimenez-Lopez, J.C. Mejuto, J. Simal-Gandara, The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value, *Antioxidants*, Vol. 8, Issue 9, 2019, str. 838, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8090406>.
31. J.C.C. Chan, P.O. Cheung, Comparative Studies on the Effect of Three Drying Methods on the Nutritional Composition of Seaweed *Sargassum hemiphyllum*, s.l. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, str. 3056–3059, doi: <https://doi.org/10.1021/jf9701749>.
32. I. Jerković, *Kemija Aroma*, Split : an., 2011.
33. V. Gresslera, P. Colepicolo, E. Pinto, Useful Strategies for Algal Volatile Analysis, *Current Analytical Chemistry*, Vol. 5, Issue 3, 2009, str. 271-292, doi: <https://doi.org/10.2174/157341109788680255>.
34. A. Nongonierma, P. Cayot, J.L. Le Quéré, M. Springett, A. Voilley, Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters, s.l. : *Food Reviews International*, Vol. 11, Issue 1, 2006, str. 51-94, doi: <https://doi.org/10.1080/87559120500379951>.
35. B. Marongui, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, E. Sanjust, M. Meli, F. Sollai, P. Zucca, A. Rescigno, Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical characterization and antityrosinase activity, s.l. : *J. Agric. Food Chem.*, 2007, str. 22-27,50, doi: <https://doi.org/10.1021/jf071938f>.
36. R.K. Houck, Automated supercritical fluid extraction system, s.l. : *PCT Int. Appl*, 1994.
37. D. Tholl, W. Boland, A. Hansel, F. Loreto, U. S. R. Röse, J-P. Schnitzler, Practical approaches to plant volatile analysis, s.l. : *Plant J.*, Vol. 45, Issue 4, 2006, str. 540-560, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02612.x>.
38. A.G. Vitenberg, Equilibrium model in the description of gas extraction and headspace analysis, s.l. : *J. Anal. Chem*, 2003, str. 58(1), 2-15.
39. B. Kolb, Headspace sampling with capillary columns, s.l. : *J. Chromatogr. A*, Vol. 842, Issue 1-2, 1999, str. 842, 163-205.

40. A. Nongonierma, P. Cayot, J.C. Le quéré, M. Springett, A. Voilley, Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters, s.l. : Food Rev. Int., Vol. 22, Issue 1, 2006, str. 22, 51-94, doi: <https://doi.org/10.1080/87559120500379951>.
41. M.C. Diaz-Maroto, M.S. Pérez-Coello, M.D. Cabezucto, Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile components of spices, s.l. : Chromatographia, 2002, str. 55, 729-35, doi: <https://doi.org/10.1007/BF02491788>.
42. H.M. McNair, J.M. Miller, N.H. Snow, Basic gas chromatography, John Wiley & Sons, 2019.
43. URL. <https://docplayer.cz/docs-images/26/7300261/images/37-0.png>. [26.9.2023.]
44. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Zagreb: an., 2016.
45. DC. Turner, M. Schäferm, S. Lancaster, I. Janmohamed, A. Gachanja, J. Creasey, Gas Chromatography–Mass Spectrometry, s.l. : Royal Society of Chemistry, 2019.
46. K. Sutherland, Gas chromatography/mass spectrometry techniques for the characterisation of organic materials in works of art, s.l. : Physical Sciences Reviews., 2018.
47. C.B. de Sousa, K. N. Gangadhar, J. Macridachis, M. Pavão, T. R. Morais, L. Campino, J. Varela, J. Henrique G. Lago, Cystoseira algae (Fucaceae): update on their chemical entities and biological activities, Tetrahedron: Asymmetry, Vol. 28, Issue 11, 2017, str. 18.
48. V. Gouveia, A.M. Seca, M.C. Barreto, D.C. Pinto, Cytotoxic meroterpenoids from the macroalga Cystoseira abies-marina, Mini-Rev Med Chem., Vol. 6, Issue 4, 2013, str. 13,1150, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.07.012>.
49. S. De Rosa, Z. Kamenarska, K. Seizova, C. Iodice, A. Petrova, D. Nedelcheva, K. Stefanov, S. Popov, Volatile and polar compounds from Geodia cydonium and two Tedania species, Bulg.Chem. Commun., Vol. 40 , Issue 1. 2008, str. 48-53.
50. I. Jerković, S. Radman, S. Jokić, Distribution and Role of Oct-1-en-3-ol in Marine Algae. Compounds, Vol. 1, Issue 3, 2021, str. 125–133, doi: <https://doi.org/10.3390/compounds1030011>.
51. H. Drexler, P. Spiekermann, A. Meyer, F. Domergue, T. Zank, P. Sperling, A. Abbadi, E. Heinz, Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: Strategies, problems and first results, J Plant Physiol., Vol. 160, Issue 7, 2003, str. 160, 779–802, doi: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01025>.
52. V. Gouveia, A.M. Seca, M.C. Barreto, D.C. Pinto, Di- and sesquiterpenoids from cystoseira genus: structure, intra-molecular transformations and biological activity, Mini Rev Med Chem., Vol. 13, Issue 8, 2013, str. 1150–1159, doi: <https://doi.org/10.2174/1389557511313080003>.
53. I. Jerković, A.M. Cikoš, S. Babić, L. Čižmek, K. Bojanović, K. Aladić, N. V. Ul'yanovskii, D. S. Kosyakov, A. T. Lebedev, R. Což-Rakovac, P. Trebše, S. Jokić, Bioprospecting of Less-Polar Constituents from Endemic Brown Macroalga Fucus virsoides J. Agardh from the Adriatic Sea and Targeted Antioxidant Effects In Vitro and In Vivo (Zebrafish Model), Mar. Drugs, Vol 19, Issue 5, 2021, str. 235, doi: <https://doi.org/10.3390/md19050235>.
54. I. Jerković, AM. Cikoš, S. Babić, L. Čižmek, K. Bojanić, K. Aladić, N. V. Ul'yanovskii, D. S. Kosyakov, A. T. Lebedev, R. Což-Rakovac, P. Trebše, S. Jokić. Bioprospecting of Less-Polar

Constituents from Endemic Brown Macroalga *Fucus virsoides* J. Agardh from the Adriatic Sea and Targeted Antioxidant Effects In Vitro and In Vivo (Zebrafish Model). *Mar. Drugs*, Vol 19, Issue 5, 2021, str. 5, doi: <https://doi.org/10.3390/md19050235>.

55. A. Schirmer, M. A. Rude, X. Li, E. Popova, S. B. Del Cardayre, Microbial biosynthesis of alkanes, *Science*, Vol. 329, Issue 5991, 2010, str. 329, 559–562, doi: <https://doi.org/10.1126/science.1187936>

56. J. Sohrabipour, R. Rabiei, K. Pirian, Fatty Acids Composition of Marine Macroalgae, *Journal of Phycological Research*, Vol. 3, Issue 2, 2019 str. 348-367, doi: <https://doi.org/10.29252/JPR.3.2.348>.

57. F.D. Mancuso, S. D'Hondt, A. Willems, L. Airoidi, O. De Clerck, Diversity and temporal dynamics of the epiphytic bacterial communities associated with the canopy-forming seaweed *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff and Nizamuddi, *Front. Microbiol., Sec. Aquatic Microbiology*, Vol. 7, 2016, str. 476, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00476>.

58. M. Namikoshi, T. Fujiwara, T. Nishikawa T, K. Ukai, Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algaem *Mar. Drugs*, Vol. 4, Issue 4, 2006, str. 290-297, doi: <https://doi.org/10.3390/md404290>.

59. I. Jerković, A.-M. Cikoš, S. Babić, L. Čižmek, K. Bojanić, K. Aladić, N. V. Ul'yanovskii, D. S. Kosyakov, A. T. Lebedev, R. Čož-Rakovac, P. Trebše, S. Jokić, Bioprospecting of Less-Polar Constituents from Endemic Brown Macroalga *Fucus virsoides* J. Agardh from the Adriatic Sea and Targeted Antioxidant Effects In Vitro and In Vivo (Zebrafish Model), *Mar. Drugs*. Vol 19, Issue 5, 2021, str. 19. doi: <https://doi.org/10.3390/md19050235>.

60. S. Radman, A.-M. Cikoš, I. Flanjak, S. Babić, L. Čižmek, D. Šubarić, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, In Vivo and In Vitro Antioxidant Activity of Less Polar Fractions of *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser 1898 and the Chemical Composition of Fractions and Macroalga Volatilome, *Pharmaceuticals*, Vol. 15, Issue 6, 2021, str. 14, 944, doi: <https://doi.org/10.3390/ph15060743>.

61. S. Radman, L. Čižmek, S. Babić, A. Cikoš, R. Čož-Rakovac, S. Jokić, I. Jerković, Bioprospecting of Less-Polar Fractions of *Ericaria crinita* and *Ericaria amentacea*: Developmental Toxicity and Antioxidant Activity, *Mar. Drugs*. Vol. 20, Issue 1, 2022, str. 20,57, doi: <https://doi.org/10.3390/md20010057>.

62. J. Boatright, F. Negre, X. Chen, C. M. Kish, B. Wood, G. Peel, I. Orlova, D. Gang, D. Rhodes, N. Dudareva, Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in *Petunia* Petal Tissue, *Plant Physiol.*, Vol. 135, Issue 4, 2004, str. 135, 1993–2011, doi: <https://doi.org/10.1104/pp.104.045468>.

63. S.Radman, M. Zekić, I. Flanjak, A.M. Cikoš, I. Jerković, 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*, Vol. 63, 2022, str. 12, doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102653>.

64. XQ. Xu, VH. Tran, G. Kraft, J. Beardall, Fatty acids of six *Codium* species from southeast Australia, *Phytochemistry*, Vol. 48, Issue 8, 1998, str. 1335–1339, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00115-0).

65. A. Synytsya, W.J. Kim, S.M. Kim, R. Pohl, A. Synytsya, F. Kvasnicka, J. Copikova, J. Park, Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 81, Issue 1, 2010, str. 81, 41-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.052>.
66. J. A. Maschek, B. J. Baker, *The Chemistry of Algal Secondary Metabolism*, *Algal Chemical Ecology*, 2008, str. 1-24.
67. M. T. Cabrita, C. Vale, A. P. Rauter, Halogenated Compounds from Marine Algae, *Mar. Drugs*, 2010, str. 2301–2317, doi: <https://doi.org/10.3390/md8082301>.
68. A. M. Rhoda, D. B. Harper, W. C. McRoberts, M.J. Dring, Volatile bromocarbons produced by *Falkenbergia* stages of *Asparagopsis* spp. (Rhodophyta), *Limnology and Oceanography*, Vol. 44, Issue 5, 1999, str. 44, 1348-1352, doi: <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.5.1348>.
69. X. Guo, S. Mitra, On-line membrane extraction liquid chromatography for monitoring semi-volatile organics in aqueous matrices, *Journal of Chromatography A*, Volume 904, Issue 2, 2000, str. 189-196. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00931-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00931-6).
70. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz Organske kemije*, Split : an., 2009.
71. A., Silić, Glukozinolatni profil u biljkama *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiolaincana* (L.) BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima. *Diplomski rad*, Split : an., 2018.
72. K.M. Zia, M. Zuber, M. Ali, K.M. Zia, M. Zuber, M. Ali, *Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, biotechnology and material science*. 2017.
73. URL: <https://bioterra.hr/blog-zdravog-zivljenja/zdrav-zivot/afa-alge-ili-klamatske-alge-zasto-su-toliko-dobre-za-mozak>. [26.9.2023]
74. M.J. Dring, *The biology of marine plants*, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1982.