

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta, na sednici održanoj 11.06.2020. godine, imenovalo je Komisiju za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „Nutritivna, hemijska i biološka karakterizacija morskih algi *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* i morske trave *Cymodocea nodosa* iz Jadranskog mora“, kandidata dipl. farm. Sanje Milović u sastavu:

1. Prof. dr Ivan Stanković (mentor), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
2. Prof. dr Tatjana Kundaković-Vasović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet
3. Dr Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije
4. Dr Slavica Petović, viši naučni saradnik, Univerzitet Crne Gore, Institut za biologiju mora

Posle izvršene analize priložene doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu sledeći:

**IZVEŠTAJ**

**A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija je napisana na 122 strane kucanog teksta formata A4, fontom Times new Roman, veličine 12 i jednostrukim proredom. Sadrži 30 tabela, 28 slika i 187 literaturnih navoda. Sadržaj teze je izložen u sledećim poglavljima: UVOD (22 strane), CILJ RADA (1 strana), MATERIJALI I METODE (26 strana), REZULTATI I DISKUSIJA (41 strana), ZAKLJUČAK (2 strane) i LITERATURA (16 strana). Na početku doktorske disertacije su priložene: zahvalnica, sažetak/abstract i sadržaj, a na kraju se nalazi kratka biografija kandidata, i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije.

Poglavlje **UVOD** sastoji se iz tri dela. U prvom i drugom delu ovog poglavlja, dat je uvid u biologiju i biodiverzitet morskih algi (pvi deo), morskih trava (drugi deo), a u trećem delu je prikazana je primena morskih algi i morskih trava u ishrani i farmaciji. U prvom delu istaknute su karakteristike morskih algi, opis građe talusa (telo algi), uloga algi u morskom ekosistemu, kao i podela algi na osnovu pigmentata koje poseduju. Takođe, u prvom delu prikazana i klasifikacija zelenih, mrkih i crvenih algi. U okviru ove doktorske disertacije ispitane su dve zelene alge: *Halimeda tuna* i *Codium bursa*, jedna mrka alga, *Cystoseira barbata*, a u okviru prvog dela uvoda, detaljno su opisane morfološke karakteristike navedenih vrsta i njihov biodiverzitet. U drugom delu uvoda prikazane su morfološke karakteristike morskih trava i dat je detaljan prikaz biologije i biodiverziteta morske trave *Cymodocea nodosa* koja je ispitivana u ovoj doktorskoj disertaciji. Treći deo uvoda odnosi se na primenu morskih algi i morskih trava u ishrani i farmaciji. U ovom delu dat je literaturni pregled hemijskog sastava morskih algi i morskih trava i dat je prikaz identifikovanih nutrijenata i sekundarnih metabolita kroz literaturu. Nutritivni sastav je predstavljen kroz prikaz tipova molekula ugljenih hidrata identifikovanih u jestivim algama i morskim travama, kao i kroz prikaz lipidnog, proteinskog, mineralnog i vitaminskog sastava.

Pregled sekundarnih metabolita, identifikovanih u ispitivanim vrstama algi i morske trave, kao i u njima srodnim vrstama, dati su tabelarno. Hemijske strukture, najznačajnijih metabolita, identifikovanih u ispitivanim vrstama algi i morske trave prikazane su grafički. U trećem delu uvoda dat je literaturni pregled bioloških aktivnosti koje su potvrđene kod navedenih vrsta algi i morske trave, kao što su: antioksidativna, antimikrobna, antitumorska, antikoagulantna, hipoholesterolemijska, antikoagulantna i anti  $\alpha$ -glukozidazna aktivnost.

**CILJ RADA** je jasno definisan. Prvi cilj se odnosio na preliminarnu procenu bioloških aktivnosti izolovanih ekstrakata morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*). Jedan od vodećih ciljeva ove doktorske disertacije bio je određivanje nutritivnog potencijala i energetske vrednosti izabranih uzoraka morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*), kao i hemijska karakterizacija i izolacija dominantnih jedinjenja iz ekstrakata i uzoraka morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*), i na kraju i procena potencijalne biološke aktivnosti izolovanih jedinjenja.

U poglavlju **MATERIJALI I METODE** dat je jasan i detaljan prikaz odabranog biljnog materijala i metodologije ispitivanja koja je korišćena. Poglavlje je podeljeno u sedam delova koji se odnose na: 1) biljni materijal; 2) nutritivnu i hemijsku karakterizaciju ispitivanih uzoraka; 3) ispitivanje bioloških aktivnosti izabranih uzoraka algi i morske trave; 4) hemijsku analizu biološki aktivnih ekstrakata; 5) izolaciju jedinjenja semipreparativnom HPLC hromatografijom 6) LC/MS analizu izolovanog jedinjenja iz ekstrakta morske trave *C. nodosa* i deo 7) koji se odnosi na NMR analizu izolovanog jedinjenja. U prvom delu opisan je način uzorkovanja i pripreme morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*) za ispitivanje. Dat je prikaz lokaliteta, datuma uzorkovanja i kataloških brojeva uzoraka iz kataloga Prirodnjačkog muzeja Crne Gore u Podgorici. Takođe je dat tabelarni prikaz metoda koje su sprovedene na ispitivanim uzorcima u zavisnosti od termina ubiranja. U navedenom delu da je prikaz pripreme ekstrakata (dihlormetan:metanolni (1:1) (DME), 70% metanolni (79% Met) i vodeni ekstrakt (AqE)) metodom hladne maceracije u trajanju od 48 sati. U drugom delu dat je detaljan opis primenjenih metoda za određivanje energetske vrednosti testiranih uzoraka (određivanje sadržaja vlage, pepela, ukupnih lipida, proteina, ugljenih hidrata, kao i određivanje celuloze i ukupnih dijetnih vlakana) prema zvaničnim AOAC metodama (Association of Official Analytical Chemists). Hemijska karakterizacija ispitivanih uzoraka sprovedena je kroz: kvalitativnu i kvantitativnu analizu slobodnih aminokiselina (LC-MS), kvalitativnu i kvantitativnu analizu masnih kiselina i sterola (GC-FID/MS), kvalitativnu i kvantitativnu analizu mikro- i makroelemenata metodom ICP-OES i kvantitativnu analizu  $\beta$ -glukana (komercijalnim K-YBGL kitom). Treći deo poglavlja se odnosi na ispitivanja bioloških aktivnosti ekstrakata izabranih morskih algi i morske trave. Ispitivanja koja su izvršena bila su: ispitivanje antimikrobne aktivnosti preko određivanja minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata - MIC (Eloff, 1998), ispitivanje antioksidativne aktivnosti testom neutralizacije DPPH radikala (Marxen i sar, 2007), ispitivanje citotoksične aktivnosti kolorimetrijskim MTT testom (Microculture Tetrazolium Test) po metodi Mosman (1983) uz modifikacije koje su opisali Ohno i Abe (1991) i ispitivanje anti- $\alpha$ -glukozidazne aktivnosti testom inhibicije aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze (Lordan, 2013). Četvrti deo poglavlja se odnosi na hemijsku analizu biološki aktivnih ekstrakata i u okviru njega su opisane: kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina (GC-FID), kvantitativna analiza ukupnih polifenola, metodom po Folin-Ciocalteu i ispitivanje profila polifenolnih jedinjenja LC-MS hromatografijom iz ekstrakata. U petom delu je opisana izolacija jedinjenja, iz biološki najaktivnijeg ekstrakta morske trave *C. nodosa* semipreparativnim HPLC hromatografijom. Šesti deo poglavlja opisuje identifikaciju izolovanog jedinjenja snimanjem masenog spektra visoke rezolucije (*eng.* high resolution mass spectra- HR/MS) na LC-MS instrumentu spregnutim sa Q-TOF (*eng.* quadrupole/time-of-flight) masenim spektrometrom. Sedmi deo poglavlja

MATERIJALI I METODE odnosi se na identifikaciju izolovanog jedinjenja iz morske trave *C. nodosa*, snimanjem jednodimenzionalnog  $^1\text{H}$  NMR spektara.

Poglavlje **REZULTATI I DISKUSIJA** prikazuje originalne rezultate dobijene u okviru ove doktorske disertacije. Navedeno poglavlje je obrađeno kroz tri celine: 1) hemijska karakterizacija izabranih uzoraka algi i morske trave; 2) hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata algi i morske trave i 3) analiza nutritivnog potencijala izabranih algi i morske trave. Dobijeni rezultati u okviru ove doktorske disertacije upoređeni sa dostupnim podacima iz literature.

Završno poglavlje disertacije, **ZAKLJUČAK**, ističe činjenice i zaključke dobijene na osnovu analize rezultata istraživanja.

Poglavlje **LITERATURA** se sastoji iz literaturnih navoda, gde je navedeno 187 referenci, pretežno inostranih autora. Najveći broj referenci je novijeg datuma, što kandidatu daje dobru teorijsku osnovu da na pravi način prikaže diskusiju dobijenih rezultata.

## B. OPIS POSTIGNutih REZULTATA

Najobimniji deo doktorske disertacije je poglavlje **REZULTATI I DISKUSIJA** koje je sačinjeno od tri podpoglavlja. Prvo su istaknuti rezultati dobijeni hemijskom analizom izabranih uzoraka morskih algi i morske trave, a nakon toga, rezultati dobijeni na osnovu biološke i hemijske karakterizacije ekstrakata morskih algi i morske trave. U trećem podpoglavlju data je sumarna analiza dobijenih rezultata, sa nutritivnog aspekta.

U izabranim uzorcima algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*) izvršena je analiza hemijskog sastava nutrijenata, tačnije određivanje sadržaja: proteina, lipida i ugljenih hidrata, a uz njih i određivanje sadržaja vlage, pepela, celuloze i dijetnih vlakana. Sadržaj lipida u ispitivanim uzorcima je bio generalno nizak ( $< 7,1\%$ ), kao i sadržaj proteina ( $< 11,5\%$ ). Nasuprot ovoj činjenici, zbirni sadržaj ukupnih ugljenih hidrata i celuloze je generalno visok u svim uzorcima, a kreće se od  $53,95\%$  kod alge *H. tuna* i  $87,70\%$  kod *C. bursa*. Najveći sadržaj lipida i ukupnih ugljenih hidrata identifikovan je kod zelene alge *C. bursa*, što je u skladu sa najvišom energetsom vrednošću ( $490,4$  kcal/100 g) izračunatom kod navedene alge.

Poznajući činjenicu da je sadržaj mineralnih materija u morskim biljkama izuzetno visok, doktorantinja je izvršila ispitivanje sadržaja mikro- i makroelemenata u izabranim uzorcima. Koncentracije mineralnih materija kod alge *H. tuna* prikazane su opadajućim redosledom: Ca>Na> K> Mg> P> Si> B> Zn> Bi> Ba> Cr> Cu> Li. Sadržaj kalcijuma kod alge *H. tuna* je bio izuzetno visok  $55125$   $\mu\text{g/g}$  tj.  $61\%$  ukupne mineralne mase, što je najviše među svim ispitivanim uzorcima. Kod uzoraka *C. nodosa*, *C. bursa*, i *C. barbata* sadržaj kalijuma kao makroelementa je pokazan na prvom mestu i kreće se od  $17515$   $\mu\text{g/g}$  do  $42420$   $\mu\text{g/g}$ . Opadajući redosled koncentracija minerala kod *C. nodosa* i *C. bursa* je bio sledeći: K> Na> Mg> Ca> P>Si> Zn> Bi> Ba> Cr> Cu> Li. Kod mrke alge *C. barbata* redosled koncentracija minerala u uzorku je bio: K> Na> P> Si> Mg> Bi> In> Zn> Ba> Ag, dok je sadržaj kalcijuma bio ispod limita detekcije. Visoke vrednosti Hg ( $3,4-38$  mg/kg vlažne mase), Pb ( $1,1-5$  mg/kg vlažne mase), i Sr ( $0,387-18,492$  mg/kg suve materije) u ispitivanim uzorcima su zabrinjavajuće i ukazuju na visok stepen kontaminacije sredine i ekosistema Jadranskog mora.

Ispitivanje sadržaja dijetnih vlakana izvršeno je na osnovu činjenice da je sadržaj polisaharida u algama i morskim travama izuzetno visok. Najviši sadržaj ukupnih dijetnih vlakana, TDF (*engl. total dietary fibers*) određen je kod alge *C. barbata* ( $70,05\%$ ). Kod iste alge određen je i najviši sadržaj nerastvornih dijetnih vlakana, IDF (*engl. insoluble dietary fibers*) u

koncentraciji od 58,95%, a kod alge *C. bursa*, određen je najviši sadržaj rastvornih dijetnih vlakana, SDF (*engl. soluble dietary fibers*) od 35,85%. U okviru analize polisaharida prisutnih kod algi i morske trave, ispitan je sadržaj  $\beta$ -glukana. Najviši nivo  $\beta$ -glukana pronađen je kod morske trave *C. nodosa* ( $13,04 \pm 0,42$  g/100g), a najniži sadržaj  $\beta$ -glukana je utvrđen kod zelene alge *C. bursa* ( $2,43 \pm 0,23$  g/100 g).

Iako alge i morske trave nisu bogat izvor lipida, poznato je da su bogate polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA). Najviši sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) među ispitivanim uzorcima algi i morske trave je pokazan kod morske trave *C. nodosa* (7,157 mg/g). U pogledu zasićenih masnih kiselina, u svim ispitivanim uzorcima, palmitinska kiselina (C16:0) je dokazana u najvišoj koncentraciji. Miristinska (C14:0) i stearinska kiselina (C18:0) su dokazane u svim ispitivanim uzorcima. Među mononezasićenim masnim kiselinama (MUFA), najzastupljenija je bila oleinska kiselina (C18:1 n-9 *cis*) u svim ispitivanim uzorcima, a najviši sadržaj oleinske kiseline je detektovan kod morske trave *C. nodosa* (12,768 mg/g). Svi testrani uzorci sadrže značajnu količinu omega-3 masnih kiselina, kao što je  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA), u širokom opsegu koncentracija od 0,029 do 3,291 mg/g. Pored analize masnih kiselina, u uzorcima algi i morskih trava sprovedeno je ispitivanje sadržaja sterola. Kod mrke alge *C. barbata*, fukosterol je detektovan u koncentraciji od  $21,76 \pm 0,1$   $\mu$ g/g. Kampesterol je detektovan u veoma maloj koncentraciji ( $3,78 \pm 0,12$   $\mu$ g/g) kod alge *H. tuna*. Morska trava *C. nodosa*, je sadržala  $\beta$ -sitosterol i  $\beta$ -stigmasterol u koncentracijama od  $5,70 \pm 0,03$  i  $6,04 \pm 0,08$   $\mu$ g/g, respektivno.

Slobodne aminokiseline nisu detektovane u liofilizatima ispitivanih uzoraka, osim kod zelene alge *H. tuna*, gde su identifikovane jedino L-asparaginska kiselina i L-glutaminska kiselina u veoma malom procentu.

U okviru drugog dela opisanih rezultata prikazana je hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata algi i morskih trava. Najizraženije biološke aktivnosti su pokazali DME ekstrakti ispitivanih algi i morskih trava, pa se dalje pristupilo njihovim hemijskim analizama. U okviru ispitivanja sastava masnih kiselina u ekstraktima pokazano je da je najzastupljenija masna kiselina bila je palmitinska (C16:0), u opsegu od 29,41% do 32,6%. Oleinska kiselina (C18:1 n-9) je po sadržaju na drugom mestu u opsegu 6,04% do 21,23%. Najveći sadržaj n-3 masnih kiselina je identifikovan kod morske trave *C. nodosa* ( $\alpha$ -linolenska kiselina, 27,11%), kao i najviši nivo PUFA (44,71%). U DME ekstraktu zelene alge *H. tuna* identifikovan je najveći sadržaj dokozaheksaenske (DHA, C22:6 n-3) i eikozapentaenske (EPA, C 20:5 n-3) masne kiseline (2,83 % i 4,97%). Najzastupljenija n-6 masna kiselina u ispitivanim uzorcima je linolna kiselina (C18:2, n-6) koja je identifikovana u svim ispitivanim ekstraktima u opsegu od 5,28% do 17,6%.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave sprovedeno je testom neutralizacije DPPH radikala, a sadržaj polifenola u ekstraktima je okarakterisan metodom po Folin Ciocalteu. Najbolju *in vitro* antiradikalnu aktivnost pokazao je DME ekstrakt morske trave *C. nodosa* ( $IC_{50} = 112,73 \pm 2,051$   $\mu$ g/ml) što je u skladu sa najvišim sadržajem ukupnih polifenola,  $37,82 \pm 1,23$   $\mu$ g GA/mg DME. *C. barbata* DME je takođe pokazao visoku antiradikalnu aktivnost ( $IC_{50} = 367,21 \pm 3,621$   $\mu$ g/ml) sa sadržajem polifenola od  $14,94 \pm 0,6$   $\mu$ g GA/mg DME. Slabu aktivnost u DPPH testu pokazali su DME ekstrakti algi *H. tuna* ( $IC_{50} = 839,44 \pm 5,482$   $\mu$ g/ml) i *C. bursa* ( $IC_{50} = 1369,72 \pm 7,351$   $\mu$ g/ml) sa niskim sadržajem ukupnih polifenola.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti izvršeno je na sva tri pripremljena ekstrakta (DME, 70%Met, AqE) pri čemu 70% Met i AqE nisu pokazali antimikrobnu aktivnost u sprovedenom testu. DME ekstrakti *H. tuna* i *C. barbata* su ispoljile najbolju antimikrobnu aktivnost protiv

bakterijskog soja *B. subtilis* (MIC 100 µg/ml), a *C. albicans* i *S. aureus* su takođe bile osetljive na DME ekstrakt alge *H. tuna*. Svi ispitivani uzorci ispoljavaju značajnu antifungalnu aktivnost protiv soja gljivice *C. albicans*, a *C. barbata* je bila najaktivnija u navedenom ispitivanju (MIC 200 µg/ml). *C. barbata* je takođe pokazala najbolju antibakterijsku aktivnost (MIC 100 µg/ml) za *S. aureus* i *B. subtilis* (MIC 100 µg/ml).

Citotoksičnost je ispitana na sva tri ekstrakta izabranih uzoraka algi i morskih trava, ali su samo DME ekstrakti ispoljili značajnu aktivnost. *H. tuna* je pokazala najbolju citotoksičnu aktivnost prema LS174 ( $25,34 \pm 2,37$  µg/ml), ćelijama kolorektalnog karcinoma, i visoku citotoksičnu aktivnost na HeLa ( $17,92 \pm 1,54$  µg/ml), ćelije humanog cervikalnog karcinoma. *C. barbata*, pokazala je dobru citotoksičnu aktivnost, pogotovu protiv HeLa i K562 ćelijske linije u navedenom MTT testu. Dobijeni podaci ukazuju da DME ekstrakt morske trave *C. nodosa*, pokazuje značajnu citotoksičnu aktivnost na HeLa (IC<sub>50</sub>=  $13,28 \pm 0,39$  µg/ml) i K562 (IC<sub>50</sub>=  $19,64 \pm 1,55$  µg/ml) ćelijama.

U testu ispitivanja anti- $\alpha$ -glukozidazne aktivnosti, DME ekstrakt mrke alge *C. barbata* je pokazao najbolju aktivnost od IC<sub>50</sub>=  $9,98 \pm 3,34$  µg/ml. Anti- $\alpha$ -glukozidazna aktivnost DME ekstrakta morske trave *C. nodosa* je takođe bila izuzetno visoka ( $11,48 \pm 3,57$  µg/ml). Svi ispitivani DME ekstrakti su pokazali bolju anti  $\alpha$ -glukozidaznu aktivnost u poređenju sa akarbozom, koja je korišćena kao standard ( $59,8 \pm 12,3$  µg/ml).

U morskoj travi su identifikovane 3 supstance: diosmetin-7-sulfat (**1**) (86,992%), kaftarinska kiselina (**2**) (5,801%) i kutarinska kiselina (**3**) (7,207%). Dominantno jedinjenje je bilo jedinjenje br. **1** (86,992%), pa se pristupilo njegovoj detaljnoj analizi. U cilju dobijanja dodatnih podataka, jedinjenje br. **1** je izolovano semipreparativnom HPLC hromatografijom, a dodatni HR-MS spektri su snimljeni na Q-TOF-MS/MS detektoru. Molekulska formula C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>S je dobijena iz deprotonovanog molekula na m/z 379,0155 [M - H]<sup>-</sup> (calcd 379,0167 za [M - H]<sup>-</sup> C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>S,  $\Delta$ ppm = -3,69). Glavni jonski fragment Q-TOF-MS/MS spektra je bio m/z 299,0577 (C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>), dobijen gubitkom SO<sub>3</sub> jona (-80 Da). Manji fragment od m/z 284,0355 (C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), određen je dodatnom demetilacijom deprotonovanog molekula. Nakon hidrolize jedinjenja br. **1**, korišćenjem enzima sulfataze, identifikovan je aglikon diosmetin, koji je takođe potvrđen pomoću komercijalno dostupnog standarda diosmetina. Pozicija sulfatne grupe je pretpostavljena na osnovu UV spektralne analize i na osnovu podataka dobijenih analizom <sup>1</sup>H-NMR spektra.

Specifični podaci identifikovanih jedinjenja u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa* su sledeći: **jedinjenje br. 1 (diosmetin-7-sulfat)**: HPLC-DAD  $\lambda_{max}$  (nm): (band I) 347, (band II) 252, 268 nm (sh); LC-MS-ESI m/z: 379 (M1), 299 (M-1-80, 100%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO): 3,94 (s, OCH<sub>3</sub>); 6,67 (d, J  $\frac{1}{4}$ = 1,67, H-6); 6,69 (s, H-3); 7,08 (d, J  $\frac{1}{4}$ = 1,43, H-8); 7,10 (d, J  $\frac{1}{4}$ = 8,58, H-5'); 7,43 (d, J  $\frac{1}{4}$ = 2,13, H-2'); 7,58 (dd, J  $\frac{1}{4}$ = 8,59 and 2,15, H-6'); HR-MS m/z: 379,0155 [M-H]<sup>-</sup> (calcd 379,0167 za [M-H]<sup>-</sup> C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>S), qTOF-MS/MS (15 eV) m/z (rel. int.): 379,0155 (40), 299,0577 (100), 284,0355 (7); **jedinjenje br. 2 (kutarinska kiselina)**: HPLC-DAD  $\lambda_{max}$  (nm): 314; LC-MS-ESI m/z: 295 (M-1); **jedinjenje br. 3 (kaftarinska kiselina)**: HPLC-DAD  $\lambda_{max}$  (nm): 328; LC-MS-ESI m/z: 311 (M-1).

## C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Iz algi i morskih trava je do sada izolovano preko 10000 metabolita sa izraženom farmakološkim aktivnostima kao što su: antibakterijska, anitifungalna, hipoglikemijska,

citotoksična, neurotoksična, hipolipemijska, antimitotska, antivirusna i antineoplastična aktivnost. U poslednje vreme se ispituju imunosupresivna i antiinflamatorna aktivnost, kao i primena algi u tretmanu Alchajmerove bolesti i u tretmanu oboljenja izazvanog virusom humane imunodefijencije (HIV) (Freeman, 2008; Tierney, 2010; Mohamed, 2012).

U brojnim kulturama, postoji duga tradicija primene algi u ishrani. U zapadnim zemljama, alge su izvor fikokoloida, supstanci za geliranje i učvrćivanje, koje imaju različitu primenu u industriji hrane. Vlada Francuske je 1990. godine objavila izveštaj u kome se alge prihvataju kao povrće i začini, što je uticalo na njihovu povećanu eksploataciju (De La Santé, 2004). Makroalge su bogat izvor proteina, minerala, vitamina, antioksidanasa, polinezasićenih masnih kiselina, neskrobnih polisaharida (kao što su karagenan i alginat) i drugih prirodnih proizvoda (Mohamed, 2012; Miyashita, 2013). Morske alge sadrže visok nivo esencijalnih aminokiselina, a proteinski sadržaj algi je sličan povrću (Mabeau, 1993; Wong, 2003). Alge su dobar izvor minerala, kao što su jod (I), magnezijum (Mg), gvožđe (Fe), cink (Zn) i kalcijum (Ca) (Lange, 2015).

U izabranim uzorcima algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*) izvršena je analiza hemijskog sastava nutrijenata. Najviši sadržaj ukupnih lipida identifikovan je kod alge *C. bursa* (7,1%) što je uporedivo sa literaturnim podacima za sadržaj lipida u algama roda *Codium*, koji je izuzetno varijabilan (7,3- 21,1%) i zavisi od različitih uslova i podneblja u kojima su alge sakupljane (Xu i sar, 1998). Kod alge *C. barbata*, prijavljen je sadržaj ukupnih lipida koji se kretao između 0,66-0,98% računato u odnosu na svežu masu (Ivanova i sar, 2012). Uzevši u obzir da je prinos suve mase uzoraka, odabranih algi i morske trave korišćenih u ovoj disertaciji, bio oko 10% u odnosu na svežu sirovinu, dobijeni rezultat ukupnih lipida za algu *C. barbata* (4,95% u odnosu na suhu materiju), iznosi približno 0,495% u odnosu na svežu masu, što je neznatno niže u odnosu na rezultat navedenih autora, Ivanova i sar (2012). Sadržaj proteina, u uzorcima izabranih algi i morske trave, takođe je bio nizak (< 11,5%) u poređenju sa jestivim algama koje se široko primenjuju u ishrani, kao što je nori (oko 35% u odnosu na suhu masu) i dulse (oko 47% suve mase) (Morgan i sar, 1980; Arasaki i sar, 1983). Zelena alga iz roda *Codium* (*C. bursa*) koja je ispitivana u ovoj doktorskoj disertaciji, u poređenju sa jestivom algom iz roda *Codium* (*C. tomentosum*), pokazala veći sadržaj ukupnih ugljenih hidrata (69,70%) u odnosu na 32,8% određenih kod *C. tomentosum* (Rodrigues i sar, 2015). Sadržaj ukupnih masti kod alge *C. bursa* (7,1%) je takođe bio viši nego kod *C. tomentosum* (3,6%), ali sadržaj proteina kod *C. bursa* (4%) se pokazao značajno niži u poređenju sa *C. tomentosum* (18,8%) (Rodrigues i sar, 2015). Alga *H. tuna* je u ispitivanjima pokazala najnižu energetska vrednost (243,01 kcal/100 g), što je u kombinaciji sa visokim sadržajem celuloze (30%) i visokim sadržajem pepela (30%) ne svrstava u grupu algi koje bi bile hranljive za ljude. Uprkos ovoj činjenici, postoje navodi, da alga *H. tuna* ima prijatan ukus u kombinaciji sa solju i sirćem (Hills-Colinvax i sar, 1980).

Sadržaj mineralnih materija u algama i morskim travama je generalno viši u poređenju sa sadržajem minerala u terestičnim biljkama (Omar i sar, 2015). Uslovi okoline, sezona, fiziološke karakteristike kao i geografsko poreklo morskih biljaka diktiraju mineralni sastav ovih vrsta (Keiji i Hori, 1989). Prema podacima Ministarstva poljoprivrede SAD (*eng.* United States Department of Agriculture) sadržaj pepela u povrću se kreće od 5- 10 g/100 g suve mase, dok se u algama ovaj opseg kreće od preko 30 g/100 g suve mase (Sánchez Machado i sar, 2004). Morske trave, imaju interesantan mineralni sastav, daleko raznovrsniji od terestičnih biljaka, a u ovom radu, morska trava *C. nodosa*, je pokazala visok sadržaj K (17515 µg/g) i Na (12051 µg/g). Immaculate i sar (2018), upoređivali su mineralni sastav 3 morske trave: *Cymodocea serrulata*, *Syringodium isoetifolium* i *Halodule uninervis*. Kod morske trave *C. serrulata* sadržaj magnezijuma je bio visok (1015 mg/100 g), dok su kod *S. isoetifolium* i *H. uninervis* dominantni minerali bili natrijum i kalcijum. Mineralni profil alge *H. tuna*, prikazan u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazuje da je sadržaj Ca dominantan u koncentraciji 55125 µg/g, tačnije 61% u

odnosu na ukupan mineralni sastav i 5,51% u odnosu na suhu materiju, što je oko četiri puta manje nego 22,42% Ca, u odnosu na suhu materiju alge *H. tuna*, prijavljeno u radu Biligin i Ertan (2002). Visok sadržaj Ca kod alge *H. tuna* je očekivan, obzirom da je poznato da je ova alga jedan od glavnih tvoraca sedimenta u tropskim zonama (Johns i Moore, 1988). Kod alge *H. tuna* je takođe primećeno da je sadržaj strncijuma (Sr) trideset puta veći nego kod morske trave *C. nodosa* i četrdesetosam puta veći nego kod *C. bursa*. Visok stepen akumulacije Sr kod *H. tuna* može se objasniti visokim sadržajem Ca i činjenicom da Sr ima visok afinitet za plazma membranske transportere za K i Ca (Jureša i Blanuša, 2003; Fukuda i sar, 2014; Burger i Lichtscheidl, 2019). Kalcijum se generalno u algama nalazi u proseku od 4-7% suve materije. Imajuću u vidu prosečnu količinu od 8 g suve materije algi u porciji, to bi generalno značilo unos od 560 mg Ca. Imajući u vidu dobru iskoristljivost Ca iz algi, u kojima se Ca nalazi u obliku fosfata, i činjenicu da je preporučeni dnevni unos Ca između 800 i 1000 mg, alge predstavljaju značajan izvor ovog mineral u ishrani (Kumar i sar, 2008). U rezultatima Kolsi i sar (2016) kod morske trave *C. nodosa*, Ca i Mg bili su dominantni ( $7000,38 \pm 0,48 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$  i  $3412,53 \pm 0,86 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ , respektivno), dok su u rezultatima ove doktorske disertacije, kod iste morske trave dominantni minerali bili K i Na ( $17515 \mu\text{g/g}$  i  $12051 \mu\text{g/g}$ , respektivno). Sadržaj fosfora kod alge *C. barbata* je bio najviši u poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima ( $15990 \mu\text{g/g}$ ). Fosfor u algama postoji kao organski vezan (u vidu monoestara i diestara) i neorganski vezan (u obliku ortofosfata i pirofosfata). Glavni oblik prisutnog fosfora u algama je organski monoestar,  $\beta$ -glicerofosfat, detektovan u koncentraciji od 22,6% u odnosu na ukupan fosfor (Feng i sar, 2019). Inetresantno je da je glavni izvor fosfora u namirnicama zapravo poreklo m iz fosfatnih konzervanasa koji su sami po sebi štetni, pogotovu kod pacijenata sa renalnim oboljenjima (Sullivan i sar, 2007), pa bi se koristan izvor fosfora mogao potražiti u morskim organizmima. U Pravilniku o maksimalnim količinama određenih kontaminenata u hrani ("Službeni glasnik RS, broj 81/19) nisu jasno definisane referentne vrednosti za maksimalno dozvoljene količine teških metala u morskim algama, pa su za analizu sadržaja žive (Hg) i olova (Pb), korišćene referentne vrednosti date za meso riba i proizvode ribarstva. Maksimalan dozvoljeni sadržaj Hg u proizvodima ribarstva i mesu riba prema gore navedenom Pravilniku je 0,5 mg/kg vlažne mase. Uzevši u obzir prinos suve materije nakon sušenja vlažne mase algi i morske trave od 10%, sadržaj Hg u ispitivanim uzorcima se kreće od 3,4 mg/kg vlažne mase (*C. bursa*) do 38 mg/kg vlažne mase (*C. barbata*) što je značajno više u poređenju sa referentnom vrednošću datom u Pravilniku. Dozvoljeni sadržaj Pb u mesu riba je u Pravilniku definisan kao 0,30 mg/kg vlažne mase, a u ispitivanim uzorcima se kretao od 1,1 mg/kg vlažne mase (*C. barbata* i *H. tuna*) do 5 mg/kg vlažne mase kod *C. bursa*. Takođe, visok sadržaj stroncijuma (Sr) koji je određen u ovoj disertaciji ( $387- 18492 \mu\text{g/kg}$  suve materije), ukazuje na visok stepen zagađenosti Jadranskog mora, što se mora imati na umu ukoliko bi se navedeni uzorci eksploatisali u industriji životnih namirnica (Burger i Lichtscheidl, 2019).

Dokazano je da su morske alge značajan izvor dijetnih vlakana, među kojima dominira sadržaj rastvornih dijetnih vlakana (Lahaye, 1991). Rastvorna dijetna vlakna imaju ulogu prebiotika, povećavaju osećaj sitosti, mogu da budu korisna u redukciji telesne mase, smanjuju rizik od kardiovaskularnih oboljenja, preveniraju razvoj kancera kolona i povoljno deluju u prevenciji konstipacije (Dreher, 1987; Ye i sar, 2015). Rastvorna dijetna vlakna, takođe imaju i hipoholesterolemijsku i hipoglikemijsku ulogu (Mabeau i sar, 1993). U poređenju sa sadržajem dijetnih vlakana u uzorcima jestivih morskih algi sa obale Čilea (Ortiz i sar, 2006), kao što su *Ulva lactuca* i *Durvillaea antarctica*, alga *C. bursa* je pokazala veći sadržaj SDF ( $35,85\%$  u odnosu na  $27,2 \pm 1,2\%$  i  $27,7 \pm 1,2\%$ , respektivno) i niži sadržaj IDF ( $30\%$  u odnosu na  $33,3 \pm 0,3\%$  i  $47,7 \pm 0,3\%$ , respektivno) što ide u prilog njenoj potencijalnoj primeni u ishrani.

Alge i morske trave, generalno nisu bogate lipidima. Uprkos tome, brojni istraživači su u algama i morskim travama pokazali visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) koje

imaju niz povoljnih zdravstvenih efekata (Kumari i sar, 2010). Među mononezasićenim masnim kiselinama (MUFA), najzastupljenija je bila oleinska kiselina (C18:1 n-9 *cis*) u svim ispitivanim uzorcima, a najviši sadržaj oleinske kiseline je detektovan kod morske trave *C. nodosa* (12,768 mg/g). Takođe, svi testrani uzorci sadrže značajnu količinu omega-3 masnih kiselina kao što je  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA) u širokom opsegu koncentracija od 0,029 do 3,291 mg/g. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima Xu i sar (1998), koji su u uzorcima algi roda *Codium*, pokazali da su najzastupljenije masne kiseline bile: palmitinska, oleinska i  $\alpha$ -linolenska masna kiselina. Za masne kiseline kao što su  $\alpha$ -linolenska kiselina, eikozapentaenska (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA) je dokazano da imaju zaštitnu ulogu od kardiovaskularnih oboljenja (Wijendran i Hayes, 2004). Interesantno je da je sadržaj  $\alpha$ -linolenske kiseline pokazan kod morske trave *C. nodosa* (3,291 mg/g tj. 0,33%) viši nego sadržaj iste masne kiseline prijavljen kod jestive alge nori (0,23 %) (Sánchez-Machado i sar, 2004). Takođe, u radu Jeevitha i sar (2013) kod kojih je između 4 ispitivane vrste morskih trava, *Syringodium isoetifolium* pokazala najbogatiji profil masnih kiselina, ispitivani uzorak morske trave *C. nodosa* je pokazala do 3 puta veći sadržaj oleinske (12,768 mg/g u odnosu na 4,1 mg/g) i palmitinske (11,580 mg/g u odnosu na 4,5 mg/g) masne kiseline. *C. barbata*, *C. nodosa* i *C. bursa* sadrže neparne masne kiseline (*eng.* odd chain fatty acids), tj. masne kiseline sa neparnim brojem C atoma, kao što su heptadekanska (C 17:0) i pentadekanska kiselina (C 15:0), a istraživanja su pokazala vezu između ovih masnih kiselina i smanjenog rizika od kardiovaskularnih i metaboličkih oboljenja (Jenkins i sar, 2015). Najzastupljenija masna kiselina među n-6 masnim kiselinama, u ispitivanim uzorcima je bila linolna kiselina (C 18:2 n-6), za koju je poznato da je jedna od glavnih masnih kiselina koja reguliše nivo LDL (*eng.* low density lipoproteins) holesterola u humanom organizmu (Wijendran i Hayes, 2004).

Steroli predstavljaju važnu komponentu membrane eukariotskih ćelija. Imaju ulogu u kontroli membranske propustljivosti i utiču na viskozitet ćelijske membrane (Piironen i sar, 2000). Kod mrke alge *C. barbata*, fukosterol je detektovan u koncentraciji od  $21,76 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ . Prisustvo fukosterola u mrkim algama prvi je dokumentovao Patterson (1971). Relativno nizak sadržaj fukosterola može se pripisati sezoni u kojoj su uzorci sakupljeni (jul), što je u skladu sa istraživanjem Boulom i sar (2014), koji su prijavili da fukosterol i 24-metilenholesterol pokazuju jako visoke vrednosti u algama u zimskom periodu, verovatno kao prirodni mehanizam zaštite od niskih temperatura. Značajno smanjenje 24-metilenholesterola i fukosterola je identifikovano u letnjem periodu (Boulom i sar, 2014). Ispitivanja Honya i sar (1994), podržava činjenicu varijabilnog sadržaja fukosterola u mrkim algama (*Saccharina japonica*), koji dostiže maksimalni sadržaj u zimskim mesecima. Fukosterol je pokazao brojne biološke aktivnosti kao što su: antikancerogena, antioksidativna, antihiperглиkemijska, aktivnost u sniženju nivoa holesterola i aktivnost u prevenciji venske tromboze (Abdul i sar, 2016). Sadržaj sterola, prijavljen u zelenim algama je kompleksniji i razlikuje se značajno u poređenju sa drugim vrstama algi (Patterson, 1997). U obe ispitivane zelene alge (*H. tuna* i *C. bursa*) nađena je značajna količina  $\beta$ -sitosterola. Poznato je da  $\beta$ -sitosterol smanjuje rizik od benigne hiperplazije prostate, da ima ulogu u prevenciji kolorektalnog karcinoma i srčanih oboljenja, kao i ulogu regulaciji imunskog sistema, u tretmanu tuberkuloze, hiperholesterolemije, reumatoidnog artritisa i cervikalnog kancera (Saeidnia, 2014). Kampesterol je detektovan u veoma maloj koncentraciji ( $3,78 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$ ) kod alge *H. tuna*. Postoje brojna istraživanja koja ukazuju na različite biološke aktivnosti kampesterola, a najznačajnije su snižavanje nivoa holesterola i antikancerogeni efekat (Choi i sar, 2007).

Morska trava *C. nodosa*, sadrži  $\beta$ -sitosterol i  $\beta$ -stigmasterol u koncentracijama od  $5,70 \pm 0,03$  and  $6,04 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ , respektivno. Dobijeni rezultati se slažu sa istraživanjem Gillan i sar (1984), koji su ispitivali različite vrste morskih trava i pokazali da se  $\beta$ -sitosterol i  $\beta$ -stigmasterol nalaze u koncentraciji od 60-90% u poređenju sa drugim prisutnim sterolima.  $\beta$ -

Stigmasterol je dobro poznat kao prekursor kortikosteroida i seksualnih hormona (androgena i estrogena), ali i prekursor u sintezi vitamina D<sub>3</sub> (Kaur i sar, 2011). Mnogi naučnici ukazuju na značajne biološke aktivnosti  $\beta$ -stigmasterola, kao što su: citotoksičnost, hipoglikemijska aktivnost, antimitogena, antihiperholesterolemijska, anti-inflamatorna, antioksidativna aktivnost, kao i povoljan uticaj na funkcije CNS-a (Kaur i sar, 2011).

Bobadilla i sar (2013), kod alge *Durvillaea antarctica* ustanovili su značajnu imunomodulatornu aktivnost zbog visokog sadržaja 1,3:1,6- $\beta$ -D-glukana (4-15 g/100 g).  $\beta$ -Glukani, su identifikovani u morskim algama i pokazano je da imaju imunomodulatornu ulogu i ulogu u snižavanju nivoa holesterola u serumu (Davidson i sar, 1991). Laminarin (1,3- $\beta$ -D-glukan) je najviše proučavan polisaharid, izolovan iz mrkih algi, koji je prvenstveno energetska rezerva, lokalizovana u ćelijskim vakuolama algi (Burtin i sar, 2003). Literaturni podaci ukazuju da upotreba mrkih algi (*Laminaria*) u ishrani pozitivno utiče na prevenciju razvoja karcinoma dojke, preko nekoliko mehanizama, a jedan od njih se pripisuje prisustvu 1,3- $\beta$ -D-glukana, koji imaju sposobnost ubrzavanja enzimske aktivnosti fekalne flore, pri čemu dolazi do stimulacije imunog odgovora (Teas, 1982). U ovom istraživanju *C. barbata* je pokazala značajan sadržaj  $\beta$ -glukana ( $5,8 \pm 0,31$  g/100 g), kao i *C. nodosa* ( $13,04 \pm 0,42$  g/100 g), pa bismo na osnovu ovih rezultata mogli da pretpostavimo da navedena dva uzorka mogu da ispolje značajnu imunomodulatornu aktivnost.

U radu Tsekos i sar (1975), koji su ispitivali 39 vrsta morskih algi sa teritorije Grčke, zaključili su da sadržaj slobodnih aminokiselina u algama jako varijabilan, da ne zavisi od podneblja i sezone, nego da rezultati generalno zavise od ubiranja reprezentativnog uzorka (Tsekos i sar, 1975). Od svih ispitivanih uzoraka, jedini su kod zelene alge *H. tuna* identifikovane L-asparaginska kiselina i L-glutaminska kiselina u veoma malom procentu.

Sadržaj masnih kiselina u algama je varijabilan i predstavlja indikator filogenetskog razvoja i trofičke strukture morskih organizama, pa je od izuzetnog značaja za biološka istraživanja morskog ekosistema (Graeve i sar, 2002). Arahidonska kiselina (C 20:4, n-6), esencijalna masna kiselina u humanom organizmu je značajna kao prekursor eikozanoida, za koje je poznato da imaju značajne funkcije kao što su: regulacija vaskularne homeostaze, zaštita gastrične mukoze, agregacija trombocita, regulacija imunopatoloških procesa (remodelovanje tkiva, kancer, astma, reumatoidni artritis i autoimune bolesti) (Smith, 1989; Harizi i sar, 2008). Za PUFA je poznato da imaju brojne zdravstvene efekte, a najznačajnija su saznanja o smanjenju rizika od kardiovaskularnih i inflamatornih oboljenja, kao i poboljšanje cerebralne i mentalne funkcije (Ruxton i sar, 2007). Najveći sadržaj n-3 masnih kiselina je identifikovan kod morske trave *C. nodosa* ( $\alpha$ -linolenska kiselina, 27,11%), kao i najviši nivo PUFA (44,71 %). Visok nivo SFA u hrani je direktan faktor rizika za povećanje ukupog holesterola i LDL holesterola (eng. low density cholesterol) u serumu. Zamena od 3% SFA u ishrani pomoću PUFA ili MUFA snižava nivo LDL holesterola za 2% (Sanders, 2013). Iz navedenog razloga odnos PUFA/SFA bi trebalo da bude što niži (< 1) kako bi se namirnica smatrala korisnom za primenu u ishrani pacijenata sa rizikom od kardiovaskularnih oboljenja i moždanog udara (Yamori i sar, 1994). DME ekstrakt zelene alge *C. bursa* je imao najniži sadržaj zasićenih masnih kiselina u poređenju sa drugim DME ekstraktima (34,92%) i dobar odnos PUFA/SFA (0,97), što ponovo ide u prilog najvećem potencijalu ove alge za primenu u ishrani. U DME ekstraktu zelene alge *H. tuna* identifikovan je najveći sadržaj dokozaheksaenske (DHA, C22:6 n-3) i eikozapentaenske (EPA, C 20:5 n-3) masne kiseline (2,83 % i 4,97%). Poznato je da EPA i DHA poreklom iz riba, mogu da smanje rizik od fatalne koronarne bolesti (Mozaffarian, 2008) i kolorektalnog karcinoma (Roynette i sar, 2004). Najzastupljenija n-6 masna kiselina u ispitivanim uzorcima je linolna kiselina (C18:2 n-6) koja je identifikovana u svim ispitivanim ekstraktima u opsegu od 5,28% do 17,6%. Linolna kiselina je jedna od glavnih masnih kiselina koja reguliše metabolizam lipoproteina niske gustine

(LDL-c), smanjujući sintezu LDL-c i ubrzavajući njihov klirens (Wijendran i sar, 2004). Linolna kiselina takođe može da poveća osetljivost tkiva na insulin, poseduje antimikrobnu aktivnost i citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora (Sagar i sar, 1992).

*C. nodosa* je prepoznata kao dobar izvor fenolkarboksilnih kiselina, koje su i potvrđene u ovoj doktorskoj disertaciji (kaftarinska i kutarinska kiselina), a koje poseduju visoku antioksidativnu aktivnost, što najverovatnije i objašnjava najvišu antiradikalnu aktivnost ( $IC_{50} = 112,73 \pm 2,051 \mu\text{g/ml}$ ) određenu kod ove morske trave (Grignon Dubois i Rezzonico, 2013; Kuda i sar, 2014).

Antimikrobna aktivnost izabranih uzoraka algi i morske trave ispitana je na sva 3 ekstrakta, a samo DME ekstrakti su pokazali aktivnost. DME ekstrakti *H. tuna* i *C. barbata* su ispoljile najbolju antimikrobnu aktivnost protiv bakterijskog soja *B. subtilis* (MIC 100  $\mu\text{g/ml}$ ). *C. albicans* i *S. aureus* su takođe bile osetljive na DME ekstrakt *H. tuna*. Otkriće diterpenskog aldehida, halitunala, koji je ispoljio antivirotsku aktivnost protiv mišjeg korona virusa (Harada i Kamei, 1997), zajedno sa literaturnim dokazima o antibakterijskoj i antifungalnoj aktivnosti dietilearskog ekstrakta *H. tuna* protiv *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* i *C. albicans*, ukazuje da *H. tuna* poseduje veliki antimikrobni potencijal među ispitivanim algama (Mtolera i Semesi, 1996). Istraživanja usmerena ka otkrivanju aktivnih supstanci koje ispoljavaju antimikrobnu aktivnost sugerišu da alginati (Na-alginat i Mg-alginat) mogu biti odgovorni za antimikrobnu aktivnost alge *C. barbata* protiv *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* i *Klebsiela sp.* (Badea i sar, 2009). Ispaljive komponente identifikovane kod alge *C. barbata*, kao što su dokozan i tetratriakontan, nisu pokazala značajnu antimikrobnu aktivnost (Ozdemir i sar, 2006). Rezultat, dobijen u ovoj doktorskoj disertaciji, je u skladu sa istraživanjem u kome je pokazano su diarilheptanoidi, izolovani iz morske trave *C. nodosa*, poseduju antibakterijsku aktivnost protiv multi rezistentnih patogenata kao što su *S. aureus*, *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis* i *M. fortuitum* (Kontiza i sar, 2008). DME ekstrakt *C. bursa* je pokazao nešto slabiju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa drugim ispitivanim uzorcima, a antifungalna aktivnost protiv *C. albicans* je bila ista kao i kod DME ekstrakta *H. tuna* i *C. nodosa* u navedenom ispitivanju (MIC 400  $\mu\text{g/ml}$ ). Pretragom literature, utvrđeno je da u par ispitivanja različitih ekstrakata alge *C. bursa*, navedena alga nije pokazala nikakvu antimikrobnu, niti antifungalnu aktivnost (Salvador i sar, 2007; Ibtissam i sar, 2009).

DME ekstrakti *H. tuna* je pokazala najbolju citotoksičnu aktivnost prema LS174, ćelijama kolorektalnog karcinoma, i visoku citotoksičnu aktivnost na HeLa, ćelije humanog cervikalnog karcinoma. Svetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization, WHO) je objavila da EPA i DHA u kombinaciji, smanjuju rizik od kolorektalnog kancera i smanjuju rizik od raka dojke (Volpato i Hull, 2018). Uzevši u obzir preventivnu ulogu EPA i DHA, koje su identifikovane u DME ekstraktu alge *H. tuna*, kao i ispoljenu citotoksičnu aktivnost navedenog ekstrakta, trebalo bi nastaviti dalja istraživanja antikancerskog potencijala alge *H. tuna*. Kurt i sar, 2014, takođe su pokazali citotoksičnu aktivnost alge *H. tuna* na MCF-7 ćelijsku liniju kancera (Kurt i sar, 2014). *C. barbata*, pokazala je dobru citotoksičnu aktivnost, pogotovu protiv HeLa i K562 ćelijske linije u navedenom MTT testu. Napominjemo da *C. barbata* sadrži pigment fukoksantin za koga je pokazano da ispoljava antitumorsku, antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost (D'Orazio i sar, 2012). Dobijeni podaci ukazuju da DME ekstrakt morske trave *C. nodosa*, pokazuje značajnu citotoksičnu aktivnost na HeLa ( $IC_{50} = 13,28 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ ) i K562 ( $IC_{50} = 19,64 \pm 1,55 \mu\text{g/ml}$ ) ćelijama. Kontiza i sar (2005), dokazali su da diarilheptanoidi identifikovani u morskoj travi *C. nodosa* (cimodienol i cimodien) pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost protiv dve ćelijske linije karcinoma pluća (Kontiza i sar, 2005). Najviši sadržaj linolne kiseline (17,6%) u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa*, takođe može da objasni visoku citotoksičnu aktivnost navedenog ekstrakta protiv HeLa ćelijske linije tumora, obzirom da su

Sagar i sar (1992), dokazali visoku citotoksičnost linolne kiseline protiv HeLa ćelijske linije tumora. U testu ispitivanja anti  $\alpha$ -glukozidazne aktivnosti, DME ekstrakt mrke alge *C. barbata* je pokazalo najbolju aktivnost od  $IC_{50} = 9,98 \pm 3,34 \mu\text{g/ml}$ .

Mrke alge predstavljaju bogat izvor polifenolnih jedinjenja koja se zovu florotanini (oligomeri floroglucinola), koja su pokazala antidijabetičnu aktivnost kroz različite mehanizme inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze, što ukazuje na potencijalnu primenu navedene alge kao funkcionalne hrane koja bi se mogla preporučivati u ishrani ili suplementaciji dijabetičara (Sun i Chen, 2012; Lee i Jeon, 2013). Svi ispitivani DME ekstrakti su pokazali bolju anti  $\alpha$ -glukozidaznu aktivnost u poređenju sa akarbozom, koja je korišćena kao standard. Takođe, u poređenju sa acetonskim ekstraktom jestive alge *Undaria pinnatifida*, čija je anti  $\alpha$ -glukozidazna aktivnost bila  $IC_{50} = 80 \pm 2 \mu\text{g/ml}$  (Zaharudin i sar, 2019), uzorci korišćeni u navedenom ispitivanju su pokazali od 4 do 8 puta izraženije aktivnosti.

U morskoj travi *C. nodosa*, identifikovane su 3 supstance: diosmetin-7-sulfat (1) (86,992%), kaftarinska kiselina (2) (5,801%) i kutarinska kiselina (3) (7,207%). Pozicija sulfatne grupe je pretpostavljena na osnovu UV spektralne analize i na osnovu podataka dobijenih analizom  $^1\text{H-NMR}$  spektra, a skladu sa podacima objavljenim u radu Enerstvedt i sar (2016), koja je analizirala sulfonovane heterozide luteolina. U navedenoj publikaciji, UV apsorpcioni spektar luteolin-7-sulfata i luteolina su bili relativno slični, dok je značajno hipsohromno pomeranje uočeno za UVmax luteolin-7,3-sulfata, što izričito ukazuje na prisustvo sulfatnih grupa na položajima 3'- ili 4'- u B prstenu aglikona luteolina. Uvođenje sulfatne grupe u A prsten flavonoida ne dovodi do značajnih promena u UV spektru u odnosu na aglikon, a uvođenje sulfatne grupe na položaje 3'- ili 4'- u B prstenu, bi izazvalo veliko hipsohromno pomeranje u traci I (eng. band I), a traka II (eng. band II) bi se pojavila kao jedan pik. U rezultatima ove doktorske disertacije, jedinjenje br. 1 je imalo UV spektar relativno sličan spektru diosmetina, a uz traku II se javlja dodatni maksimum (engl. shoulder) što je karakteristično za diosmetin. Hipsohromno pomeranje na traci I nije uočeno (HPLC-DAD  $\lambda_{\text{max}}$  (band I) 347 nm (band II) 252 nm, 268 nm (sh)). U skladu sa navedenim, predpostavili smo da je navedeno jedinjenje br. 1, diosmetin-7-sulfa.  $^1\text{H-NMR}$  podaci za jedinjenje br. 1 su u korelaciji sa rezultatima objavljenim u radu Grignon Dubois i Rezzonico, 2018, za diosmetin-7-sulfat. Kaftarinska i kutarinska kiselina su prethodno identifikovane kod morske trave *C. nodosa* (Grignon Dubois i Rezzonico, 2013), a diosmetin-7-sulfat je detektovan jedino kod morskih trava roda *Zostera*, kao što je *Zostera noltei* (Grignon Dubois i Rezzonico, 2012) i *Zostera subg. Zostera marina* (Enerstvedt i sar, 2016), tako da je ovo prvi izveštaj o prisustvu diosmetin-7-sulfata u morskoj travi *C. nodosa*. Ispitivanje citotoksične aktivnosti jedinjenja br. 1 je izvršeno direktno na HeLa tumorskoj ćelijskoj liniji i aktivnost jedinjenja je bila izuzetno slaba ( $IC_{50} = 631,42 \mu\text{g/ml}$ ), uprkos činjenici da su pojedini derivati diosmetina (diosmetin-7-O- $\beta$ -D-acetilgalaktozid, 7-O-prenildiosmetin i 7-O-farnesil-3'-O-metildiosmetin) ipak pokazali umerenu citotoksičnu aktivnost (Cai i sar, 2012).

## LITERATURA

- Abdul QA, Choi RJ, Jung HA, Choi JS. Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *J Sci Food Agric* 2016; 96: 1856–1866.

- Arasaki S, Arasaki T. Low calorie, high nutrition vegetables from the sea to help you look and feel better. Japan Publications, Tokyo, 1983

- Badea V, Balaban DP, Rapeanu G, Maria C, Badea CF. The antibacterial activity evaluation of *Cystoseira barbata* biomass and some agents upon bacteria from oropharyngeal cavity. *Rom Biotech Lett* 2009; 14(6): 4851-4857.

- Bobadilla F, Rodriguez-Tirado C, Imarai M, Galotto MJ, Andersson R. Soluble  $\beta$ -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydr Polym* 2013; 92: 241–248.
- Boulom S, Robertson J, Hamid N, Ma Q, Lu J. Seasonal changes in lipid, fatty acid,  $\alpha$ -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem* 2014; 161: 261–269.
- Biligin Ş, Ertan ÖO. Selected chemical constituents and their seasonal variations in *Flabellia petiolata* (Turra) Nizam. and *Halimeda tuna* (Ellis & Sol.) JV Lamour. in the gulf of Antalya (North-eastern Mediterranean). *Turk J Bot* 2002; 26(2): 87-90.
- Burger A, Lichtscheidl I. Strontium in the environment: Review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. *Sci Tot Environ* 2019; 653: 1458-1512.
- Burtin P. Nutritional value of seaweeds. *Elect J Env Agricult Food Chem* 2003; 2(4): 498-503.
- Cai SL, Wu Z, Wu J, Wang Q, Shan Y. Synthesis and biological activities of natural flavonoid diosmetin and its derivatives. *Chin J Org Chem* 2012; 32: 560-566.
- Choi JM, Lee EO, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Shim BS, Kim N, Song MC, Baek NI, Kim SH. Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytother Res* 2007; 21: 954– 959.
- Davidson MH, Dugan LD, Burns JH, Bova J, Story K, Drennan KB. The hypocholesterolemic effects of  $\beta$ - glucan in oatmeal and oat bran: a dose-controlled study. *JAMA Network* 1991; 265: 1833–1839.
- De La Santé DG. Avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, section des maladies transmissibles, relatif à la conduite à tenir devant un sujet atteint de pédiculose du cuir chevelu (séance du 27 juin 2003). *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 2004; 131: 1122-1124.
- D'Orazio N, Gemello E, Gammone M, Girolamo M, Ficoneri C, Riccioni G. Fucoxantin: a treasure from the sea. *Mar Drugs* 2012; 10 (3): 604–616.
- Dreher Ml. Handbook of dietary fiber. Dekker M. and Basel Inc, New York, 1987.
- Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64(8): 711-713.
- Enerstvedt KH, Jordheim M, Andersen Ø. Isolation and identification of flavonoids found in *Zostera marina* collected in Norwegian coastal waters. *Am J Plant Sci* 2016; 7: 1163–1172.
- Feng W, Li C, Zhang C, Liu S, Song F, Guo W, He Z, Li T, Chen H. Characterization of phosphorus in algae from a eutrophic lake by solution  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Limnology* 2019; 20(2): 163-171.
- Freeman BC, Beattie GA. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Health Instr* 2008; 226(1): 1-12.
- Fukuda SY, Iwamoto K, Atsumi M, Yokoyama A, Nakayama T, Ishida KI, Inouye I, Shiraiwa Y. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. *J Plant Res* 2014; 127: 79–89.

- Graeve M, Kattner G, Wiencke C, Karsten U. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. *Mar Ecol Prog Ser* 2002; 231: 67-74.
- Grignon Dubois M, Rezzonico B. First phytochemical evidence of chemotypes for the seagrass *Zostera noltei*. *Plants* 2012; 1(1): 27-38.
- Grignon Dubois M, Rezzonico B. The economic potential of beach-cast seagrass-*Cymodocea nodosa*: a promising renewable source of chicoric acid. *Bot Mar* 2013; 56(4): 303-311.
- Grignon Dubois M, Rezzonico B. Phenolic chemistry of the seagrass *Zostera noltei* Hornem. Part 1: First evidence of three infraspecific flavonoid chemotypes in three distinctive geographical regions. *Phytochemistry* 2018; 146: 91-101.
- Gillan FT, Hogg RW, Drew EA. The sterol and fatty acid compositions of seven tropical seagrasses from North Queensland, Australia. *Phytochemistry*, 1984; 23(12): 2817-2821.
- Harada H, Noro T, Kamei Y. Selective antitumor activity *in vitro* from marine algae from Japan coasts. *Biol Pharmacol Bull* 1997; 20(5): 541-546.
- Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 2008; 14(10): 461-469.
- Hills-Colinvaux L, Baxter JHS, Russell Frederick S, Yonge M. Ecology and Taxonomy of Halimeda: Primary Producer of Coral Reefs. *Adv Mar Biol* 1980; 17: 17- 18.
- Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K. Seasonal variation in the lipid content of cultured *Laminaria japonica*: fatty acids, sterols,  $\beta$ - carotene and tocopherol. *J App Phycol* 1994; 6: 25–29.
- Ibtissam C, Hassane R, Jose M, Francisco DSJ, Antonio GVJ, Hassan B, Mohamed K. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr J Biotechnol* 2009; 8(7): 1258-1262.
- Ivanova V, Stancheva M, Merdzhanova A. Fatty acids composition of macroalgae from Bulgarian Black Sea coast. *Analele Stiint Univ* 2012; 23(1): 35-40.
- Immaculate JK, Lilly TT, Patterson J. Macro and micro nutrients of seagrass species from Gulf of Mannar, India. *MOJ Food Process Technol* 2018; 6(4): 391-398.
- Jeevitha M, Athiperumalsami T, Kumar V. Dietary fibre, mineral, vitamin, amino acid and fatty acid content of seagrasses from Tuticorin Bay, Southeast coast of India. *Phytochemistry* 2013; 90: 135-146.
- Jenkins B, West JA, Koulman A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease. *Molecules* 2015; 20: 2425–2444.
- Johns DH, Moore C. Reef to basin sediment transport using *Halimeda* as a sediment tracer, Grand Cayman Island, West Indies. *Coral Reefs* 1988; 6: 187-193.
- Jureša D, Blanuša M. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* 2003; 20: 241–246.
- Kaur N, Chaudhary J, Jain A, Kishore L. Stigmasterol: a comprehensive review. *Int J Pharm Sci Res* 2011; 2: 2259-2265.

- Keiji I, Hori K. Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Rev Int* 1989; 5: 101–144.
- Kolsi RB, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, Blecker C, Allouche N, Belghith H, Belghith K. Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea nodosa* sulfated polysaccharide. *Carbohydr Polym* 2016; 151: 511-522.
- Kontiza I, Stavri M, Zloh M, Vagias C, Gibbons S, Roussis V. New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron* 2008; 64(8): 1696-1702.
- Kuda T, Goto H, Yokovama M, Fujii T. Fermentable dietary fiber in dried products of brown algae and their effects on cecal microflora and levels of plasma lipid in rats. *Fish Sci* 1998; 64(4): 582-588.
- Kurt O, Özdal Kurt F, Tuğlu MI, Akçora CM. The cytotoxic, neurotoxic, apoptotic and antiproliferative activities of extracts of some marine algae on the MCF-7 cell line. *Biotec Histochem* 2014; 89(8): 568-576.
- Kumar CS, Ganesan P, Suresh PV, Bhaskar N. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. *J Food Sci Tech* 2008; 45(1): 1-13.
- Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. Tropical marinemacroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem* 2010; 120: 749–757.
- Lahaye M. Marine algae as sources of fibres. Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J Sci Food Agric* 1991; 54: 587-594.
- Lange KW, Hauser J, Nakamura Y, Kanaya S. Dietary seaweeds and obesity. *Food Science and Human Wellness* 2015; 4(3): 87-96.
- Lee SH, Jeon YJ. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia* 2013; 86: 129-136.
- Lordan S, Smyth JT, Soler-Vila A, Stanton C, Ross RP. The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts, *Food Chem* 2013; 141: 2170-2176.
- Mabeau S, Fleurence J. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Tech* 1993; 4(4): 103-107.
- Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze Ruser A, Hansen UP, Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors* 2007; 7(10): 2080-2095.
- Miyashita K, Mikami N, Hosokawa M. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: a review. *J Funct Foods* 2013; 5(4): 1507- 1517.
- Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Tech* 2012; 23(2): 83-96.
- Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.

- Morgan KC, Wright JLC, Simpson FJ. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmate* (Dulse). *Econ Bot* 1980; 34: 27-50.
- Mozaffarian D. Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(6): 1991S-1996S.
- Mtolera MS, Semesi A. Antimicrobial Activity of Extracts from Six Green Algae from Tanzania. *Curr Trends Mar Bot Res East Afr* 1996. Reg pp: 211-217.
- Ohno M, Abe T, Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods* 1991; 145(1-2): 199-203.
- Omar HH, Abdullatif BM, Al Kazan MM, El Gendy AM. Various applications of seaweed improves growth and biochemical constituents of *Zea mays* L. and *Helianthus annuus* L. *J Plant Nutr* 2015; 38: 28–40.
- Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernández J, Bozzo C, Rios A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem* 2006; 99(1): 98-104.
- Ozdemir G, Horzum Z, Sukatar A, Karabay Yavasoglu NU. Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris membranaceae* and *Cystoseira barbata* from the coast of Izmir, Turkey. *Pharm Biol* 2006; 44(3): 183-188.
- Patterson GW. The distribution of sterols in algae. *Lipids* 1971; 6: 120– 127.
- Piironen V, Linsday DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 939–966.
- Rodrigues D, Ana CF, Leonel P, Teresa APRS, Marta WV, Mariana R, Luís MRA, Ana MPG, Armando CD. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chem* 2015; 183: 197-207.
- Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr* 2004; 23(2): 139-151.
- Ruxton C, Reed S, Simpson M, Millington K. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet Subsets* 2007; 20(3): 275-285.
- Saeidnia S. The story of beta-sitosterol – a review. *Eur J Med Plants* 2014; 4: 590-609.
- Salvador SN, Gómez GMA, Lavelli L, Ribera SMA. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci Mar* 2007; 71: 101-113.
- Sánchez Machado DI, López Cervantes J, Lopez Hernandez J, PaseiroLosada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem* 2004; 85(3): 439-444.
- Sanders TA. Reappraisal of SFA and cardiovascular risk. *P Nutr Soc* 2013; 72(4): 390-398.
- Sagar PS, Das UN, Koratkar R, Ramesh G, Padma M, Kumar GS. Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical carcinoma (HeLa) cells: relationship to free radicals and lipid peroxidation and its modulation by calmodulin antagonists. *Canc Lett* 1992; 63(3): 189-198.

- Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989; 259(2): 315-324.
- Sullivan CM, Leon JB, Sehgal AR. Phosphorus-containing food additives and the accuracy of nutrient databases: implications for renal patients. *J Ren Nutr* 2007; 17(5): 350-354.
- Sun Z, Chen F. Evaluation of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* for management of diabetes. *J Food Drug Anal* 2012; 20: 246-249.
- Teas J. The dietary intake of Laminaria, a brown seaweed, and breast cancer prevention. *Nutr Cancer* 1982; 4: 217– 222.
- Tierney MS, Croft AK, Hayes M. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Bot Mar* 2010; 53(5): 387-408.
- Tsekos I, Margaris NS, Haritonidis S. Pools of free amino acids in Greek marine algae. *Biochem Physiol Pflanz* 1975; 167(2): 165-172.
- Volpato M, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastat Rev* 2018; 37(2-3): 545-555.
- Wijendran V, Hayes KC. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 597–615.
- Wong KH, Cheung PC. Effect of fiber-rich brown seaweeds on protein bioavailability of casein in growing rats. *Int J Food Sci Nutr* 2003; 54(4): 269-279.
- Xu XQ, Tran VH, Kraft G, Beardall J. Fatty acids of six *Codium* species from southeast Australia. *Phytochemistry* 1998; 48(8):1335-1339.
- Yamori Y, Nara Y, Mizushima S, Sawamura M, Horie R. Nutritional factors for stroke and major cardiovascular diseases: international epidemiological comparison of dietary prevention. *Health Rep* 1994; 6(1): 22-27.
- Ye Z, Arumugam V, Haugabrooks E, Williamson P, Hendrich S. Soluble dietary fiber (Fibersol-2) decreased hunger and increased satiety hormones in humans when ingested with a meal. *Nutr Res* 2015; 35(5): 393-340.
- Zaharudin N, Staerk D, Dragsted LO. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. *Food Chem* 2019; 270: 481-486.

#### **D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

Do sada, Sanja Milović, je publikovala 2 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M23) i 1 rad u časopisu nacionalnog značaja (K50). Na skupovima nacionalnog i međunarodnog značaja prezentovala je 4 rada (štampani su u izvodu).

##### **Rad publikovan u časopisu međunarodnog značaja (M20):**

1. **Milović S.**, Kundaković T., Mačić V., Stanković J. A., Grozdanić N., Đuričić I., Stanković, I., Stanojković, T. (2017). Anti  $\alpha$ -glucosidase, antitumour, antioxidative, antimicrobial activity, nutritive and health protective potential of some seaweeds from the Adriatic coast of Montenegro. *Farmacia*, 65(5), 731-740. (M23; IF 1,507)

**2. Milović S.,** Stanković I., Nikolić D., Radović J., Kolundžić M., Nikolić V., Stanojković T., Petović S., Kundaković-Vasović T. (2019). Chemical Analysis of Selected Seaweeds and Seagrass from the Adriatic Coast of Montenegro. *Chemistry and Biodiversity*, doi: 10.1002/cbdv.201900327. (M23; IF2018 1,449)

**Rad publikovan u časopisu nacionalnog značaja (K50):**

1. Stanojković, T., **Milović**, S., Matić, I., Grozdanić, N., Kljajić, Z. (2015), *In vitro* ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakta sušera *Acanthella acuta*, *Lekovite sirovine*, 2015, br. 35, str. 89-101. (M52)

**Radovi saopšteni na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja štampani u izvodu:**

1. Šobajić S, Vidović B, Timić J, **Milović S**, Đuričić I, Ivanović N, Todorović V, Čakar U. Nutritional status and dietary habits among pharmacy students in Serbia. ISSN: 0250-6807, *Annals of nutrition and metabolism*, 2013, vol. 63: 1102-1102. (M34)

2. **Milović S**, Stanojković T, Kundaković T, Mačić V, Đuričić I, Šobajić S, Stanković I. Fatty acid composition of some seaweed from Adriatic Coast of Montenegro. Book of Abstracts, 13<sup>th</sup> Congress of Nutrition- CONU, 2016, 211. (M34)

3. **Milović S**, Stanojković T, Kundaković T, Mačić V, Antić Stanković J, Grozdanić N, Stanković I. Anti-a-glucosidase, antitumor, antioxidative, antiicrobial activity and nutritive potential of some seaweed from Adriatic Coast of Montenegro, Book of Abstracts, 13<sup>th</sup> Congress of Nutrition- CONU, 2016,251-252. (M34)

4. Slavković J., Šobajić S., Kundaković T., **Labudović S**. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u povrću, III Kongres o dijetetskim suplementima, 25-26. novembra, Beograd, Srbija, 2011, str. 56-59.

## **E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Na osnovu prikaza eksperimentalno dobijenih rezultata, njihove analize i diskusije, kandidatkinja je u posebnom poglavlju- ZAKLJUČAK, jasno definisala i nedvosmisleno iznela više zaključaka o nutritivnom potencijalu, hemijskom sastavu i biološkim aktivnostima ispitivanih morskih algi (*C. bursa*, *H. tuna* i *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*).

Uprkos brojnim ispitivanjima na ovom polju, alge i morske trave koje su široko zastupljene u Jadranskom moru još uvek nisu dovoljno istražene. Ispitivane alge i morska trava predstavljaju bogat izvor ugljenih hidrata, dijetnih vlakana i minerala, sa generalno niskim sadržajem masti, pri čemu bi mogle da nađu primenu u ishrani ljudi na energetski redukovanom režimu ishrane.

Zelena alga *C. bursa* je pokazala manje značajne vrednosti u testovima bioloških aktivnosti, ali je zato pokazala najvišu energetska vrednost i najoptimalniji nutritivni sastav sa aspekta humane ishrane. Kod alge *C. bursa* identifikovan je najviši sadržaj ukupnih ugljenih hidrata, ukupnih lipida i dijetnih vlakana, kao i najoptimalniji odnos Na/K, što omogućava potencijalnu upotrebu ove alge u ishrani osoba sa hipertenzijom. Zbog visokog sadržaja  $\beta$ -sitosterola trebalo bi razmotriti primenu navedene alge u tretmanu hiperholestolemije i hiperглиkemije, kao i za smanjenje rizika od razvoja benigne hiperplazije prostate.

Zelena alga *H. tuna* je u navedenim ispitivanjima imala najnižu energetska vrednost, što u kombinaciji sa visokim sadržajem celuloze i najvišim sadržajem Ca, čini ovu algu najmanje

primenljivom za humanu ishranu. Ipak, visok sadržaj  $\beta$ -sitosterola, odlična antimikrobna aktivnost protiv *B. subtilis*, *C. albicans* i *S. aureus*, najbolja citotoksičnu aktivnost protiv LS174 ćelijske linije tumora i visoka citotoksičnost protiv HeLa ćelijske linije tumora, navodi na zaključak da je navedena alga značajna za uključivanje u dalja ispitivanja i detaljniju analizu hemijskog sastava i identifikacije biološki aktivnih sekundarnih metabolita.

Sa nutritivnog aspekta, zaključeno je da mrka alga *C. barbata*, može biti značajna u suplementima namenjenim redukciji nivoa glukoze u serumu, obzirom na najbolju anti  $\alpha$ -glukozidaznu aktivnost DME ekstrakta ove alge. U prilog hipoglikemijskom potencijalu navedene alge, ide i visok sadržaj ukupnih dijetnih vlakana, kao i prisustvo fukosterola. DME ekstrakt *C. barbata* je pokazao i najbolju antimikrobnu aktivnost protiv *S. aureus* i *B. subtilis*, kao i najbolju antifungalnu aktivnost protiv *C. albicans*.

Morska trava *C. nodosa* je u navedenom ispitivanju imala nisku energetska vrednost, međutim, sadržaj nenutritivnih, bioprotektivnih polifenolnih supstanci u navedenom uzorku je bio najviši, a i biološke aktivnosti su bile izražene. DME ekstrakt *C. nodosa* je pokazao najbolju citotoksičnu aktivnost protiv HeLa i K562 ćelijskih linija tumora, što je navelo da se navedeni ekstrakt uključi u dalja istraživanja hemijskog sastava, pri čemu su identifikovana 3 jedinjenja: diosmetin-7-sulfat, kutarinska i kaftarinska kiselina. Dominantno jedinjenje u DME ekstraktu je bio diosmetin-7-sulfat, koji nije ispoljio značajnu citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora. Dalja istraživanja bi svakako mogla ići u pravcu identifikacije i karakterizacije citotoksičnih jedinjenja iz morske trave *C. nodosa*.

Ispitivane alge i morska trava predstavljaju veliki prirodni potencijal Jadranskog mora u cilju iznalaženja novih bioaktivnih jedinjenja koja će imati primenu u farmaciji, medicini, ishrani i suplementaciji. Dalja istraživanja bi mogla ići u pravcu identifikacije kompleksnih struktura molekula prisutnih u *C. nodosa*, *C. bursa*, *H. tuna* i *C. barbata*, kao i ka iznalaženju veze između njihove strukture i biološkog svojstva.

## F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za Similarity index iznosi 13% i ovaj stepen podudarnosti posledica je podudarnosti reči korišćenih u opisu metodologije, naziva korišćenih reagenasa i opreme, uobičajenih fraza koje se koriste u opisu rezultata istraživanja (npr. Tabela), kao i publikovanih rezultata doktorantovih istraživanja, koji su proistekli iz rezultata ove doktorske disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Shodno tome, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata dipl. farm. Sanje Milović originalno naučno delo.

## G. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu pregleda i analize rezultata doktorske disertacije koju je podnela dipl. farm. Sanja Milović, kao i poređenjem prihvaćenih i ostvarenih ciljeva istraživanja, Komisija konstatuje da su predviđena istraživanja uspešno obavljena, kao i da je disertacija samostalan i originalan naučni rad. Kandidatkinja, dipl. farm. Sanja Milović je veoma uspešno realizovala eksperimentalni deo rada. Svi rezultati istraživanja su obrađeni i prikazani u okviru preglednih slika i tabela, koje logično prate tekst. Analiza rezultata je jasna i precizna, dok posebnom kvalitetu doprinose podaci iz literature koji su dobro uklopljeni u celinu rada, tako da se tekst lako prati i razume. Ovom doktorskom disertacijom dobijeni su odgovori na neka do sada otvorena pitanja, a stečena su brojna saznanja koja predstavljaju dobru osnovu za dalja istraživanja u ovoj oblasti. Imajući u vidu sve navedeno, Komisija pozitivno ocenjuje urađenu doktorsku disertaciju dipl. farm. Sanje Milović pod nazivom „**Nutritivna, hemijska i biološka karakterizacija morskih algi *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* i morske trave *Cymodocea nodosa* iz Jadranskog mora**“ i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovu pozitivnu ocenu i uputi navedenu doktorsku disertaciju Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu u cilju dobijanja saglasnosti za javnu odbranu.

U Beogradu, 10.07.2020.

**Dr sc. Ivan Stanković (mentor)**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

**Dr sc. Tatjana Kundaković-Vasović**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

---

**Dr sc. Tatjana Stanojković**, viši naučni saradnik  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

---

**Dr sc. Slavica Petović**, viši naučni saradnik  
Univerzitet Crne Gore, Institut za biologiju mora

---