

Utjecaj sezonskog rasta i metode ekstrakcije na antioksidacijski potencijal alge *Halopteris scoparia*

Šiljić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:275103>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Marija Šiljić

**UTJECAJ SEZONSKOG RASTA I METODE EKSTRAKCIJE NA
ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL ALGE *HALOPTERIS SCOPARIA***

Diplomski rad

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

INFLUENCE OF SEASONAL GROWTH AND EXTRACTION
METHODS ON THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ALGAE
HALOPTERIS SCOPARIA

Diplomski rad

Predmet: Ocjena kakvoće proizvoda mora

Mentor:

Prof. dr. sc. Vida Šimat

Student:

Marija Šiljić

Split, rujan 2023.

ZAHVALA

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici prof. dr. sc. Vidi Šimat na uloženom vremenu, strpljenu i osiguranim uvjetima tijekom izrade ovog rada. Također zahvaljujem se i dr. sc. Martini Čagalj na savjetima, razumijevanju i pomoći.

Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta "BIOPROMEDFOOD - Bio-protective cultures and bioactive extracts as sustainable combined strategies to improve the shelf-life of perishable Mediterranean food (projekt ID 1467) financiranog od Europske Unije, a pod vodstvom prof. dr. sc. Vide Šimat.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

**UTJECAJ SEZONSKOG RASTA I METODE EKSTRAKCIJE NA
ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL ALGE *HALOPTERIS SCOPARIA***

Marija Šiljić

Sažetak

Smeđe alge (Phaeophyta) su višestanični eukariotski organizmi široko rasprostranjeni u umjerenim i hladnim morima. Do danas je identificirano 1836 vrsta u prosječno 285 rodova. Većina ih obitava u morskom okolišu u kojem imaju važnu ulogu, dok ih manje od 1% obitava u slatkovodnim staništima. Nedavna istraživanja pokazala su kako su smeđe alge bogati izvori bioaktivnih spojeva s izvrsnom prehrambenom vrijednošću te se smatraju funkcionalnom hranom koja djeluje blagotvorno na zdravlje ljudi. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti antioksidacijski potencijal smeđe alge *Halopteris scoparia*. Uzorci alge su prikupljeni na području otoka Čiovo kroz period sezone rasta alge od svibnja do rujna. Ekstrakti algi pripremljeni su ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE), mikrovalovima (MAE) te kombinacijom obje metode. Ekstraktima je određen sadržaj fenolnih spojeva uz pomoću spektrofotometrijske metode po Folin- Ciocalteu. Također je istražen i antioksidacijski potencijal alge *H. scoparia* primjenom metoda: DPPH (engl. 2,2,- *Diphenyl-picrylhydrazyl assay*), FRAP (engl. *Ferric- reducing antioxidant power*) i ORAC (engl. *Oxygen radical absorbing capacity*). Iz rezultata je vidljivo da da sezona rasta ima utjecaja na antioksidacijski potencijal alge. *Halopteris scoparia* prikupljena u svibnju i estrahirana korištenjem MAE metode ima najveći sadržaj ukupnih fenola ($631,67 \pm 44,81$ mg ekvivalenata galne kiseline/L) i najbolji antioksidacijski potencijal, s rezultatom od $42,23 \pm 0,78\%$ inhibicije mjereno DPPH metodom, $386,54 \pm 37,17$ μ M ekvivalenata troloksa mjereno FRAP metodom i $96,19 \pm 2,00$ μ M ekvivalenata troloksa mjereno ORAC metodom.

(44 stranice, 21 slika, 2 tablice, 78 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Halopteris scoparia*, smeđe alge, fenoli, antioksidansi, DPPH, FRAP, ORAC

Mentor: Prof. dr. sc. Vida Šimat

Ocjenjivači: 1. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza
2. Prof. dr. sc. Vida Šimat
3. Prof. dr. sc. Svjetlana Krstulović Šifner

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Marine Fishery

MSc Thesis

**INFLUENCE OF SEASONAL GROWTH AND EXTRACTION METHODS ON THE
ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ALGAE *HALOPTERIS SCOPARIA***

Marija Šiljić

Abstract

Brown algae (Phaeophyta) are multicellular eukaryotic organisms widely distributed in temperate and cold seas. To date, 1,836 species have been identified in approximately 285 genera. Most of them live in the marine environment where they play an important role, while less than 1% live in freshwater. Recent research has shown that brown algae are rich source of bioactive compounds with excellent nutritional value and are considered functional food with beneficial effect on human health. The aim of this thesis was to investigate the antioxidant potential of brown alga *Halopteris scoparia*. Algae samples were collected in the area of Čiovo island during the period of the alga growth season from May to September. Seaweed extracts were prepared using ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), and a combination of both methods. The content of phenolic compounds in the extracts was determined using the spectrophotometric method by Folin-Ciocalteu. The antioxidant potential of *H. scoparia* algae was also investigated using the following methods: DPPH (2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl assay), FRAP (Ferric-reducing antioxidant power) and ORAC (Oxygen radical absorbing capacity). The results showed that the growing season influenced the antioxidant potential of this alga. *Halopteris scoparia* collected in May and extracted using the MAE method had the highest content of total phenolic compounds (631.67 ± 44.81 mg gallic acid equivalents/L) and the best antioxidant potential, with a result of $42.23 \pm 0.78\%$ inhibition measured by the DPPH method, 386.54 ± 37.17 μ M trolox equivalents measured by the FRAP method and 96.19 ± 2.00 μ M trolox equivalents measured by the ORAC method.

(44 pages, 21 pictures, 2 tables, 78 references, original in: Croatian)

Keywords: *Halopteris scoparia*, brown algae, phenols, antioxidants, DPPH, FRAP, ORAC

Supervisor: Vida Šimat, PhD / Full Professor

Reviewers:

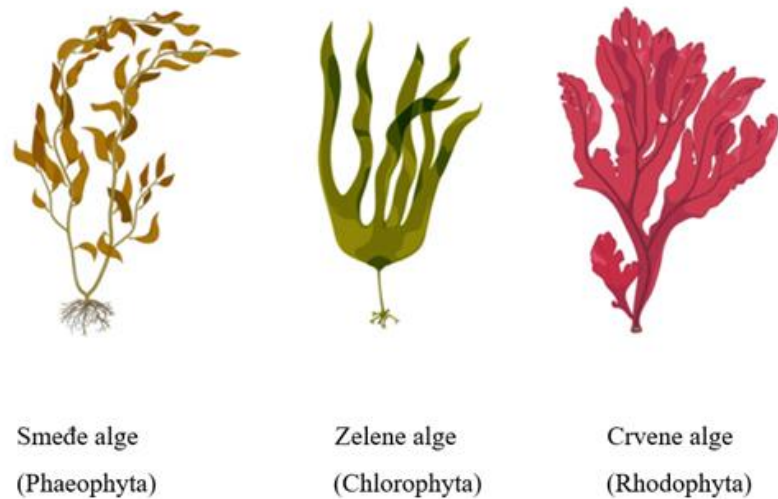
1. Danijela Skroza, PhD / Associate Professor
2. Prof. dr. sc. Vida Šimat
3. Svjetlana Krstulović Šifner, PhD / Full Professor

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. <i>Halopteris scoparia</i>	2
1.2. Biološki potencijal smeđih algi	3
1.2.1. Fenoli	3
1.2.2. Slobodni radikali	5
1.2.3. Antioksidansi i oksidativni stres	5
1.3. Metode ekstrakcije	8
1.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	10
1.5. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti	12
1.5.1. FRAP	12
1.5.2. DPPH	13
1.5.3. ORAC metoda	15
1.6. Dosadašnja istraživanja	18
1.7. Svrha i ciljevi rada	20
2. MATERIJALI I METODE	20
2.1. Aparatura i laboratorijski pribor	21
2.2. Priprema ekstrakata	23
2.3. Metode određivanja sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti	25
2.3.1. Folin – Ciocalteu metoda	25
2.3.2. FRAP metoda	27
2.3.3. DPPH metoda	27
2.3.4. ORAC metoda	28
3. REZULTATI	29
3.1. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola	29
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti	30
4. RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Morske alge ili makroalge višestanični su fotosintetski organizmi slični biljkama koji rastu uglavnom u morima i oceanima. U posljednjih nekoliko godina pridobile su veliku pozornost u zadovoljavanju prehrambenih i zdravstvenih potreba rastuće ljudske populacije. Kategorizirane su na temelju pigmentacije i kemijskog sastava na zelene alge (Chlorophyta), smeđe alge (Phaeophyta) i crvene alge (Rhodophyta) (Slika 1). Crvene makroalge su najveća skupina koja sadrži oko 7300 poznatih vrsta algi, a slijede ih zelene i smeđe s 6700 i 1836 identificiranih vrsta. Razred smeđih algi sadrži oko 285 rodova; otprilike 95% ovih vrsta su morski organizmi koji su najzastupljeniji u hladnim do umjerenim vodama (Van den Hoek i sur., 1995). Obitavaju u plitkom kamenitom obalnom području, a veličinom variraju od malih nitastih oblika do velikih tj. divovskih složenih morskih algi. Morske alge se ističu kao organizmi bogati aktivnim kemijskim spojevima koji se koriste u različite svrhe kao što je proizvodnja hrane i dodataka prehrani, lijekova i kozmetike. Sve je uspješnija primjena algi i u medicini.



Slika 1. Glavna podjela morskih algi (prema Perera i Al-Zahrani, 2022).

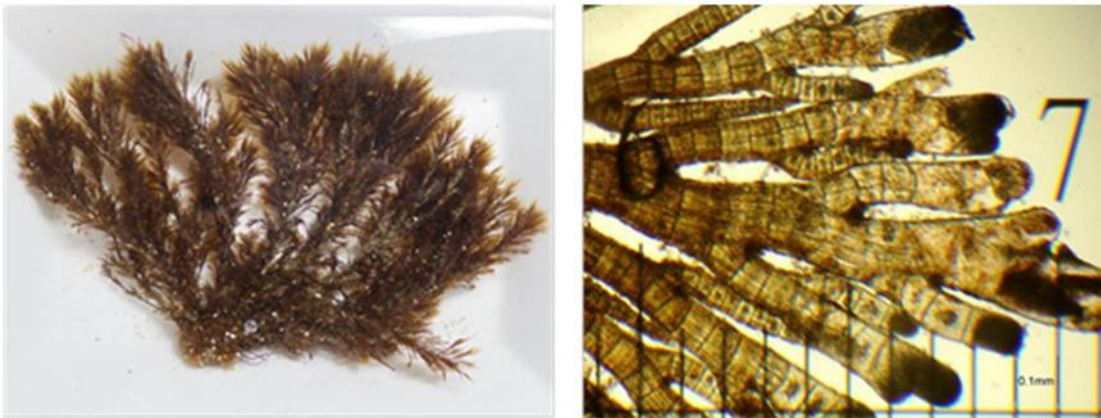
Smeđe su alge bogate alginatima i sulfatiranim polisaharidima poput fukoidana i laminarina. Pigmenti, a posebno fukoksantin, odgovorni su za karakterističnu zelenkasto-smeđu boju po čemu su ove alge i dobile naziv. Poznato je da sadrže fenolne spojeve kao što su florotanini koji posjeduju jaku biološku aktivnost. Predstavljaju gospodarski važan prirodni izvor vrijednih spojeva, široko su dostupne i njihov potencijal kao sirovine za hranu ne bi trebao biti zanemaren, posebno u kontekstu aktualnog globalnog problema kao što su rastući broj svjetske populacije te nedostatna proizvodnja hrane (Matos i sur., 2021). Prirodni spojevi algi imaju veliki potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji, kozmetici i farmaceutskim proizvodima (Wang i sur., 2010). Osim toga, alge se koriste i u proizvodnji gnojiva, stočne hrane, a i za proizvodnju biogoriva, čime se unapređuje gospodarstvo. Mnoga su istraživanja potvrdila doprinos makroalgi kao obnovljivih i ekonomičnih izvora u rješavanju pitanja klimatskih promjena (Kolet i sur., 2020).

1.1. *Halopteris scoparia*

Halopteris scoparia (Linnaeus) Sauvageau, 1904) pripada razredu smeđih morskih algi, obitelji Stypocaulacea (Güner i sur., 2019) (Slika 2). Vrste koje pripadaju ovom redu obično narastu od 3 do 20 cm, a nastanjuju donju priobalnu zonu i sublitoral u umjerenim regijama. Kozmopolitska je vrsta, uobičajena u toplim i hladnim umjerenim vodama diljem Europe (Lawson i John, 1982; Van Reine, 1982). Tolerira temperaturne raspone od 2 do 16 °C na Baltiku koji predstavlja sjevernu granicu rasprostranjenosti ove vrste. Južna granica rasprostranjenosti obuhvaća temperaturni raspon od 24 °C do 28 °C te je zabilježena na području Nigerije (Novaczek i sur., 1989). Zastupljena je i na području Atlantskog oceana te je prisutna tijekom cijele godine u kopnenom dijelu Portugala te na arhipelazima Açores, Madeira i Kanari. Raste na stijenama te ima maslinasti do tamnosmeđi ili crvenkastosmeđi talus (Guiry, 2023).

Ova smeđa alga posebno se ističe spojevima kao što su ugljikohidrati, proteini, pigmenti (karotenoidi, klorofili, ksantofili i fikobilini), višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA), minerali, amini i amidi, zbog čega joj se pripisuje visok biološki potencijal (Mena i sur., 2021). Navedeni visoko vrijedni spojevi od davnina se primjenjuju u liječenju arterioskleroze, reumatskih procesa, hipertenzija, gušavosti, astme, čireva, menstrualni poremećaja, sifilisa, kožnih bolesti i drugih (Gupta i Abu-Ghannam, 2011). Biokemijski sastav morskih algi ovisi o okolišnim uvjetima (salinitet, područje rasta, dubina, promjena temperature, hranjive tvari, razdoblje prikupljanja, izloženost UV zračenju, prisutnost predatora ili zagađivača) te raznim

biotskim čimbenicima (vrsta, životni stadij alge, starost ili reproduktivni status) (Jimenez-Lopez i sur., 2021). Svi navedeni čimbenici mogu utjecati na proizvodnju sekundarnih metabolita koji su pokazali širok raspon bioloških svojstava. Dokazano je da među polifenolnim spojevima algi florotanini imaju visoka antioksidativna svojstva zbog svojih visoko hidrofilnih komponenti i prisutnosti hidroksilnih ($-OH$) skupina koje mogu formirati vodikove veze s vodom. Imaju širok raspon molekulskih veličina između 126 i 650 kDa i mogu se pojaviti u različitim koncentracijama (0,5 - 20%) u smeđim algama (Begum i sur., 2021). Dosadašnje studije o smeđim algama ističu njihovu razinu fenola te izuzetno visoku biološku aktivnost, a samim time i viši sadržaj te aktivniji antioksidacijski potencijal u odnosu na zelene i crvene alge.



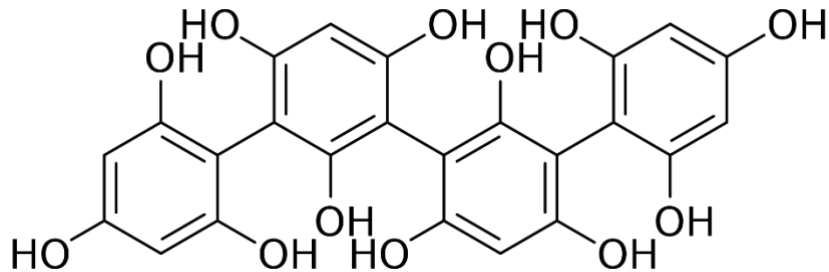
Slika 2. *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau, 1904 (izvor: Fenwick, 2004).

1.2. Biološki potencijal smeđih algi

1.2.1. Fenoli

Fenolni spojevi predstavljaju jednu od najzastupljenijih skupina sekundarnih metabolita. Imaju značajnu funkciju u rastu i razvoju biljaka, a definirani su kao aromatski spojevi s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina izravno na aromatski prsten, uključujući njihove funkcionalne derivate. Do danas je otkriveno više od 8000 različitih struktura ovih spojeva, a velika većina ih je izolirana upravo iz morskih izvora, odnosno makroalgi. Ove fitokemikalije pokazuju široku raznolikost struktura koja varira od jednostavnih spojeva do polimera velike molekularne težine. Nastaju iz dva glavna primarna sintetska puta; shikimatni put i acetatni put (Shahidi i Naczk, 2004). Visoke koncentracije fenolnih spojeva u algama

doprinosu povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti, čime se algama pripisuju izvanredna antioksidacijska svojstva. Fenolni spojevi iz morskih makroalgi variraju od jednostavnih molekula (fenolne kiseline) do vrlo složenih spojeva zvanih florotanini (PHT) (Slika 3).



Slika 3. Kemijska struktura tetrafukola A, primjera florotanina koji se nalazi u smeđim algama (izvor: Wang i sur., 2008).

Riječ je o sekundarnim metabolitima ograničenima na smeđe morske alge za koje se zna da postoje u topivim oblicima. Postojeći podaci o florotaninima temelje se isključivo na njegovim topivim oblicima pohranjenim u fizodama, koje su vrlo pokretljive organele u citoplazmi algalnih stanica. Florotanini imaju važnu funkciju u smeđim algama, kako na staničnoj razini tako i na razini organizma (Holdt i Kraan, 2011). Također su od iznimne važnosti od ranih razvojnih stadija alge pa sve do odraslih jedinki. Kao i svi drugi fenoli, florotanini predstavljaju heterogenu skupinu spojeva visoke molekularne težine, s udjelom do 20% u suhim algama (Balboa i sur., 2013). Imaju istaknutu ulogu prilikom obrane od biljojeda, bakterija i organizama koji obraštaju alge, a istodobno imaju i sposobnost apsorbiranja štetnog UV zračenja te su na taj način uključeni u zaštitu od oksidativnog oštećenja (Li i sur., 2017). Iako se fizode mogu pojaviti u većini tkiva smeđih algi, brojni su autori primijetili posebno obilje fizoda u vanjskim tkivima (epidermalne, vanjske kortikalne, apikalne i meristematske stanice) što ukazuje na to da fenolni spojevi imaju istaknutu ulogu u zaštiti talusa od prekomjernog zračenja i oštećenja UV zračenjem (Salgado i sur., 2007). Morske alge su izložene nepovoljnim uvjetima okoliša, uključujući ekstremne razlike u temperaturi, salinitetu, visokim koncentracijama kisika, UV zračenju i dostupnosti hranjivih tvari, koji ih potiču na stvaranje oksidacijskih sredstava, poput slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta. Raznovrsna istraživanja dokazala su značajna pozitivna svojstva florotanina kao i njihovu eventualnu upotrebu u različitim industrijama (prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj) (Gupta i Abu-Ghannam, 2011; Holdt i Kraan, 2011; Chakraborty i sur., 2017). Polifenoli imaju

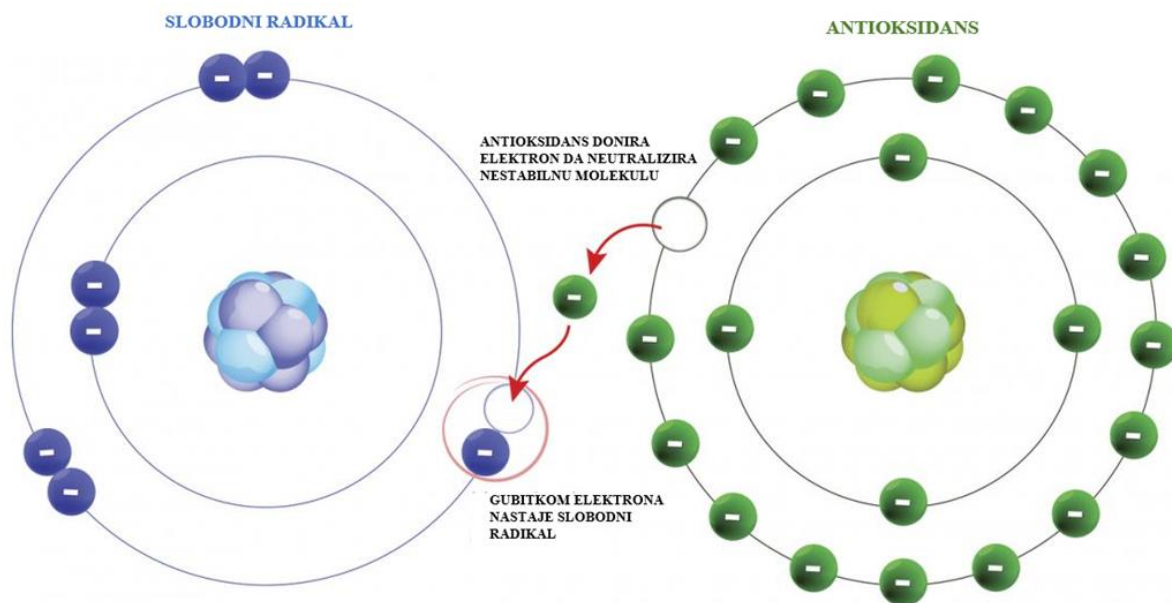
višestruku ulogu tijekom života biljke od njenog rasta i reprodukcije, do formiranja staničnih stijenki i pigmentacije. Unatoč sudjelovanju u raznim kritičnim događajima, njihova osnovna zadaća u biljkama je zaštita od ultraljubičastog zračenja i raznolikih infekcija (Balboa i sur., 2013). Sve je više dokaza da konzumacija raznih fenolnih spojeva prisutnih u hrani može smanjiti rizik od zdravstvenih poremećaja zbog njihove izrazite antioksidativne aktivnosti (Li i sur., 2017).

1.2.2. Slobodni radikali

Slobodni radikal je bilo koja vrsta molekule sposobna za neovisno postojanje koja sadrži nespareni elektron u atomskoj orbitali. Slobodni radikali nastaju kao posljedica lančanih kemijskih reakcija koje se odvijaju u tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija. Obzirom na izvor nastanka razlikujemo egzogene i endogene slobodne radikale. Oni koji nastaju u ljudskom organizmu kao posljedica metabolizma kisika, fagocitoze, koagulacije i hipoksije nazivaju se endogeni radikali, dok oni koji dolaze iz ljudske okoline (UV zračenjem, lijekovima, namirnicama) nazivamo egzogenim radikalima. Mnogobrojni radikali su nestabilni i vrlo reaktivni. Oni mogu ili donirati elektron ili prihvatiti elektron od drugih molekula, zato funkcioniraju kao oksidansi ili reducensi (Cheeseman i Slater, 1993). Vrlo reaktivne vrste, poput superoksidnog anionskog radikala, vodikovog peroksida, hidroksilnog radikala, hipoklorita, kisikovog singleta, radikala dušikovog oksida i radikala peroksinitrita, su sposobne u membranama stanica i u jezgri oštetiti biološki relevantne molekule poput DNA (mijenjajući genetski materijal), RNA, proteina, ugljikohidrata i lipida (Young i Woodside, 2001). Među slobodnih radikala uključuju sve vrste molekula u tijelu, a među glavnima su lipidi, nukleinske kiseline i proteini uslijed čega dolazi do oštećenja stanica i poremećaja homeostaze. Slobodni radikali se kontinuirano stvaraju u stanicama kao posljedica enzimskih i neenzimskih reakcija. Ljudsko tijelo ima nekoliko mehanizama za suzbijanje oksidativnog stresa proizvodnjom antioksidansa, koji se ili prirodno proizvode na licu mjesta ili se unose izvana putem hrane i dodataka prehrani.

1.2.3. Antioksidansi i oksidativni stres

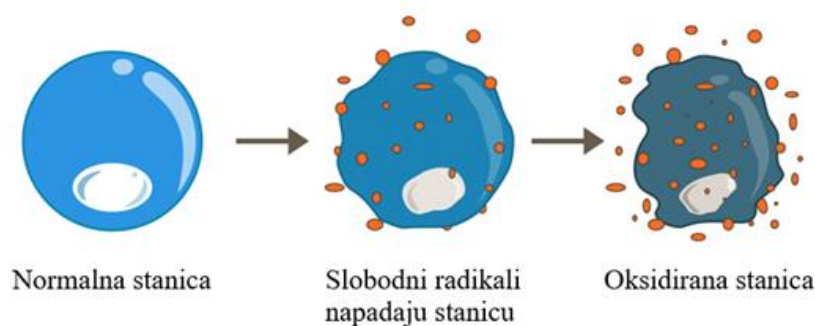
Antioksidans predstavlja dovoljno stabilnu molekulu koja je sposobna donirati elektron slobodnom radikalu i neutralizirati ga pri čemu se smanjuje njegova sposobnost oštećenja (Slika 4). Time odgađaju ili inhibiraju oštećenje stanica uglavnom svojim svojstvom „hvatanja“ slobodnih radikala (Whayne i sur., 2016). Među morskim algama, smeđe morske alge i njihove bioaktivne tvari pokazale su izvrsna antioksidativna svojstva.



Slika 4. Djelovanje antioksidansa (izvor: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/318652>).

Oksidativni stres je široko uključen u razvoj mnogih bolesti poput kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, malignih, raznih upala, dijabetesa, pretilosti te mnogih bolesti starije životne dobi (Lin i sur., 2006). Antioksidansi su jedine terapijske molekule koje mogu blokirati oksidativni stres svojom izvrsnom aktivnošću vezivanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) uz nisku ili nikakvu toksičnost (Sies, 1986). Oni optimiziraju ljudsku fiziološku funkciju koja pomaže u zaštiti od bolesti ili od progresije bolesti, kao i održavanju zdravog stanja (Li i Kim, 2011). Endogeni antioksidansi prisutni su u našem tijelu, dok se dodatni egzogeni antioksidansi mogu dobiti iz različitih prirodnih izvora i kemijski sintetskih antioksidansa kao što su butilirani hidroksianizol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT) i tert-butilhidrokinon (TBHQ) (Begum i sur., 2021). Međutim, studije su pokazale da su kemijski sintetizirani

antioksidansi toksični i kancerogeni, dok su prirodni antioksidansi sigurni, učinkovitiji i lakše se apsorbiraju (Kahl i Kappus, 1993). Antioksidansi imaju najveću obrambenu ulogu u zaštiti stanice od oksidativnog oštećenja. Također, imaju vitalnu ulogu u održavanju optimalnih staničnih funkcija te sustavnog zdravlja i dobrobiti. Međutim, u uvjetima oksidativnog stresa, endogeni antioksidansi kod ljudi, iako vrlo učinkoviti, nisu dovoljni da zaštite stanicu od štetnih učinaka ROS-a (Wilson i sur., 2017). Stoga su prehrambeni antioksidansi potrebni za održavanje optimalnih staničnih obrambenih funkcija. Općenito, oksidativni stres je neravnoteža između proizvodnje ROS-a i vlastitog antioksidativnog obrambenog sustava tijela (Slika 5). ROS, koji se obično stvara kroz razne izvanstanične i unutarstanične procese, uključen je u stanični rast, diferencijaciju, progresiju i staničnu smrt, kao i u staničnu signalizaciju (Zhang i sur., 2013). Pretjerana proizvodnja ROS-a uzrokuje oksidativni stres i modificira strukturu staničnih makromolekula. Posljedično, stanične i biološke funkcije su inaktivirane modifikacijom stanične signalizacije.



Slika 5. Prikaz oksidativnog stresa (izvor: <https://kuczdravlja.hr/kako-antioksidansi-djeluju-na-proces-starenja-koze/>).

Nekoliko je studija pokazalo da su među raznim prirodnim morskim izvorima antioksidansa morske alge postale potencijalni izvor antioksidansa zbog svojih bioaktivnih spojeva. Većina metaboličkih bolesti uzrokovana je oksidativnim stresom, a opće je poznato da antioksidansi imaju ključnu ulogu u liječenju raznovrsnih bolesti. Nedavna istraživanja otkrila su potencijalnu aktivnost morskih algi kao komplementarne medicine, koja ima terapeutska svojstva za zdravlje i upravljanje bolestima (Begum i sur., 2021). Spojevi dobiveni iz smeđih morskih algi mogu poboljšati bolesti izazvane oksidativnim stresom, uključujući neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne poremećaje (Gómez-Guzmán i sur., 2018) i

pretilost (Wang i sur., 2019), kao i smanjiti rizik od raka (Galasso i sur., 2019). Dokazano je kako smeđe morske alge imaju veća antioksidativna svojstva u odnosu na zelene i crvene alge (El-Sheekh i sur., 2023). Smeđe alge sadrže jedan od najzastupljenijih pigmentnih karotenoidnih spojeva, fukoksantin. Fukoksantin ima veliku antioksidativnu aktivnost kao i protuupalna, antidijabetička i neurozaštitna svojstva (Kim i Pangestuti, 2011).

1.3. Metode ekstrakcije

Kao odgovor na nedostatke konvencionalnih metoda ekstrakcije (dugo vrijeme ekstrakcije, niska učinkovitost, velika porošnja otapala) s vremenom su se počele istraživati mnoge druge metode s ciljem povećanja brzine i učinkovitosti ekstrakcija. U takve metode ubrajaju se i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE, engl. *ultrasound assisted extraction*) te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE, engl. *microwave assisted extraction*). Generalno, obje metode pokazuju bolju učinkovitost izolacije bioaktivnih spojeva i manji utrošak energije, otapala te vremena ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama. Kao važno poboljšanje, razvijena je ekstrakcija potpomognuta i ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE), odnosno integracija UAE s MAE. Riječ je o prikladnoj i sigurnoj tehnici za poboljšanje kvalitativne i kvantitativne ekstrakcije bioaktivnih spojeva (Mahdi i sur., 2019).

Tijekom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom UAE koriste se zvučni valovi visokih frekvencija (>20 kHz). Ultrazvuk omogućuje bolje prodiranje otapala u matricu i brzu difuziju otopljenih tvari. Kruto-tekuće suspenzije stvaraju asimetrične mjehuriće, para iz otapala biva zarobljena unutar mjehurića, što dovodi do implozije i generiranja mehaničke energije kroz mikroturbulencije, koje razbijaju stanične stijenke algi i pojačavaju učinkovitost ekstrakcije. Parametri koji mogu utjecati na proces ekstrakcije uključuju tlak, temperaturu, intenzitet i frekvenciju valova, površinsku napetost i viskoznost otapala (Bordoloi i sur., 2020). UAE poboljšava prinos ekstrakcije i smanjuje ekstrakcijsko vrijeme. Riječ je o učinkovitoj, ekološki prihvatljivoj, jednostavnoj i jeftinoj tehnologiji ekstrakcije u usporedbi s drugim metodama ekstrakcije (Matos i sur., 2021). Istraživanja ekstrakcije spojeva pomoću UAE, koja se uglavnom odnose na fenole, proteine i polisaharide iz algi, pokazuju obećavajuće rezultate. Kadam i sur. (2014) su pokazali kako ekstrakcija laminarina korištenjem UAE metode povećava njegov prinos i antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s konvencionalnim metodama

ekstrakcije. Glavni nedostatak je činjenica da UAE treba značajan početni kapital za industrijsku primjenu zbog korištenja električne energije i troškova opreme, stoga je upotreba ove metode još uvijek ograničena (Kadam i sur., 2014). Može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim metodama (Matos i sur., 2021).

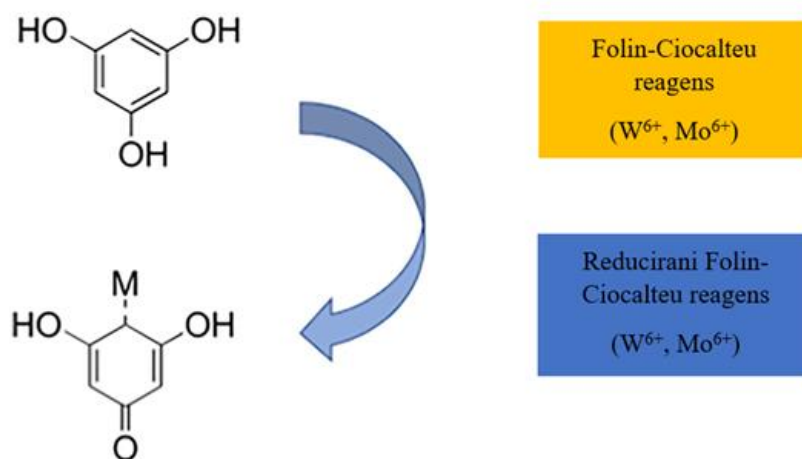
Tijekom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) koristi se mikrovalno zračenje, stvarajući izravno toplinu unutar matrice kroz sudare i trenja između molekula, što rezultira bržim zagrijavanjem kroz nekoliko minuta (Matos i sur., 2021). Frekvencijski spektar kreće se između 300 MHz i 300 GHz. Mikrovalovi mogu izazvati dva različita procesa, rotaciju dipola i ionsku kondukciju, ovisno o temperaturi izazivaju niz strukturnih promjena unutar matrice uslijed kojih otopina stvara otpor, a rezultat je trenje zbog kojeg dolazi do zagrijavanja otopine (Sadeghi i sur., 2017). Frekvencija zračenja odgovara rotacijskom gibanju molekula. Pucanje vodikovih veza posljedica je mikrovalne ekstrakcije što dovodi do migracije otpuštenih iona te dolazi do povećanog prodiranja otapala u matricu. Na ovakav se način olakšava ekstrakcija željenih spojeva. Rotacija dipola temelji se na dipolarnoj frakciji poravnavanja uzoraka s električnim poljem koje stvaraju mikrovalovi, sudarajući se međusobno i stvarajući toplinu. Ionska kondukcija temelji se na kretanju nabijenih iona zbog utjecaja elektrostatskog polja koje stvaraju mikrovalovi, a trenje tih pokreta stvara toplinu (Nesic i sur., 2023). Važni faktori koje treba uračunati uključuju frekvenciju, snagu, vrijeme ekstrakcije, tlak ekstrakcije, omjer krutina/tekućina, koncentraciju otapala, svojstva otapala, karakteristike matrice, temperaturu i broj ciklusa ekstrakcije (Matos i sur., 2021). MAE ima mnoge prednosti, kao što su postojanost, učinkovitost, sposobnost grijanja matrice selektivno i lokalno, poboljšani prijenos mase i razbijanje tkiva, smanjeno vrijeme ekstrakcije, manja potrošnja energije i otapala, niska cijena, visoka brzina ekstrakcije i visoka kvaliteta proizvoda. MAE se može primijeniti izravno u svježoj matrici i trenutno se koristi za ekstrakciju različitih biospojeva (tj. polisaharida, fenola itd.) iz smeđih, crvenih i zelenih algi (Bordoloi i sur., 2020). Međutim, zbog brzog stvaranja topline ove tehnologije i poteškoća u preciznoj kontroli temperature, vrlo je teško ekstrahirati neke termolabilne spojeve (tj. masne kiseline, pigmente i proteine). Dvije su vrste sustava za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima: otvoreni i zatvoreni sustav. Zatvoreni sustav se koristi pri višem tlaku i temperaturi, te postoji mogući rizik od eksplozije. Otvoreni sustav je jeftiniji, potpuno automatski i koristi se pod atmosferskim tlakom, čime se rješava problem eksplozije. Otvoreni sustav manje je precizan, ne može primiti više uzoraka istodobno i zahtijeva duže vrijeme ekstrakcije u usporedbi sa zatvorenim sustavom (Matos i sur., 2021). MAE metoda nije idealna za ekstrakciju bioaktivnih spojeva koji imaju izraženu

osjetljivost na toplinu što se smatra glavnim nedostatkom ove metode (Kadam i sur., 2013). Osnovni parametri koje bi trebalo uzeti u obzir su utjecaj vremena, temperature, snage mikrovalova i utjecaj otapala.

Uzastopna ili istodobna primjena nekoliko konvencionalnih i novih tehnologija nedavno je istražena za povećanje učinkovitosti i prinosa visokovrijednih spojeva dobivenih tijekom procesa ekstrakcije. Moguća je uporaba ultrazvuka u sinergiji s mikrovalnim zračenjem. Osnovna namjera takve kombinacije je povećavanje stupnja iskorištenja (Angoy i sur., 2018). Ultrazvuk je jedna od industrijski najkorištenijih metoda za poboljšanje fenomena prijenosa mase, s druge strane ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima brzo zagrijava ekstrakte i značajno ubrzava proces ekstrakcije (Lou i sur., 2012). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i mikrovalovima spaja prednosti UAE i MAE. Ovakva metoda trebala bi generirati veće prinose spojeva u usporedbi s UAE i MAE metodama zasebno.

1.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Algalni fenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji se bitno razlikuju po svojoj kemijskoj strukturi. Do danas ih je poznato preko 8 000, a variraju od jednostavnih fenola do složenijih molekula. Zastupljeni su u skoro svim vrstama algi. Fenolni se spojevi ovisno s strukturi dijele na monofenole i polifenole. Ukupni fenoli mogu se odrediti spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965; Amerine i Ough, 1980). Riječ je o najpoznatijoj i najkorištenijoj kolorimetrijskoj metodi. Razvili su je Folin i Ciocalteu 1927. godine, a zasniva se na reakcijama oksidacije i redukcije prilikom kojih dolazi do kolorimetrijske reakcije fenola s Folin-Ciocalteu reagensom i do promjene obojenja reakcijske smjese iz žute u tamnoplavu (Slika 6).



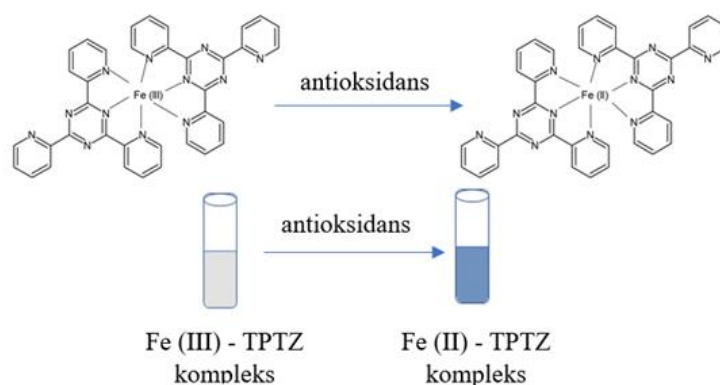
Slika 6. Prikaz reakcije između polifenola i Folin-Ciocalteu reagensa tijekom koje dolazi do promjene boje i formiranja plavog kompleksa (fosfovolfram-fosfomolibden kompleks) (izvor: Ford i sur., 2019).

Riječ je o spektrofotometrijskoj metodi koja se bazira na oksidaciji fenolnih grupa uz dodatak Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. Potrebno je zadovoljiti uvjet koji nalaže da medij bude lužnat, odnosno da pH otopine bude 10, što se ostvaruje uz dodatak natrijevog karbonata (Na_2CO_3). FC reagens se sastoji od dvije kiseline. Oksidacijom fenolne grupe nastaju nezasićeni ciklički diketoni (kinoni) koji se dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona reduciraju što se očituje pojavom plavog obojenja. Fenoli disociraju proton te se transformiraju u fenolat anion, koji je naposljetku sposoban reducirati FC reagens. Nereducirani FC reagens žute je boje dok reducirani poprima stabilnu plavu boju. Jačina novonastalog obojenja mjeri se pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 765 nm te je razmjerna udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Galna kiselina obično se koristi za izradu standardne krivulje te se rezultati najčešće iskazuju u mg ekvivalentima galne kiseline (GAE) po gramu ili litri uzorka. Ova metoda ima mnogo prednosti, poput jednostavnosti, ponovljivosti, preciznosti i ekonomičnosti. Najveći nedostatak ove metode je nespecifičnost reagensa kojeg mogu reducirati i drugi prisutni spojevi što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Osim toga, u istraživanjima znanstvenici koriste različite standardne spojeve za izražavanje rezultata što uzrokuje probleme u usporedbi rezultata (Generalčić Mekinić i sur., 2019).

1.5. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

1.5.1. FRAP

FRAP (engl. *Ferric reducing antioxidant power*) analizu kreirali su Benzie i Strain (1996) za potrebe izračunavanja redukcijske moći željeza u ljudskoj plazmi, dok su Pulido i sur. (2000) prilagodili ovu metodu za kvantificiranje antioksidativne moći biljnih ekstrakata. Riječ je o analizi reducirajuće antioksidativne snage željeza (FRAP) koja je široko korištena metoda i koristi antioksidanse kao reducente u kolorimetrijskoj reakciji vezanoj za redoks, pri čemu se Fe^{3+} TPTZ (željezo(III)-2,4,6-tripiridil-S-triazin) reducira u Fe^{2+} TPTZ (Slika 7). Redukcija Fe^{2+} iona pri niskom pH uzrokuje stvaranje obojenog kompleksa (apsorpcija na 593 nm). Askorbinska kiselina i otopina željezovog sulfata ili Trolox standardni su antioksidansi koji se upotrebljavaju prilikom uporabe ove metode. Ovaj test pruža brz, osjetljiv i jednostavan način za mjerenje antioksidativnog kapaciteta raznih bioloških uzoraka. Mehanizam antioksidativne snage koja reducira željezo temelji se na prijenosu elektrona (Prior i sur., 2005). Provodi se pri kiselom pH (3,6) s ciljem da se održi topljivost željeza. Niska pH vrijednost smanjuje ionizacijski potencijal koji aktivira prijenos atoma vodika te na taj način uvećava redoks potencijal (Hegerman i sur., 1998).

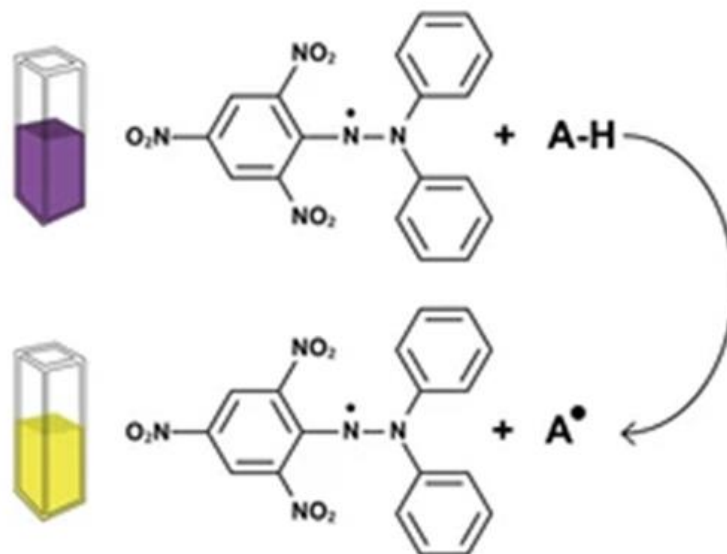


Slika 7. Redukcija Fe^{3+} te stvaranje plavo obojenog kompleksa s Fe^{2+} (izvor: Wojtunik-Kulesza, 2020).

FRAP test je praktičan, efikasan i isplativ te ne traži specijaliziranu opremu za izvođenje. Njegova upotreba je proširena za procjenu antioksidativne aktivnosti u biološkim tekućinama, hrani i biljnim ekstraktima. Nepoželjna strana ove metode je mogućnost lažno uvećanih rezultata zbog redukcije željeza iz feri u fero oblik te se na taj način povećava FRAP vrijednost uzorka (Karadag i sur., 2009; Flanjak, 2013).

1.5.2. DPPH

DPPH (α -difetil- β -pikrilhidrazil) metoda, tj. inhibiranje ovog sintetskog radikala, nudi prvi pristup za procjenu antioksidativnog potencijala spoja, ekstrakta ili pak drugih bioloških izvora. Riječ je o najjednostavnijoj spektrofotometrijskoj metodi u kojoj se ekstrakt miješa s DPPH otopinom te se nakon određenog vremenskog razdoblja bilježi apsorbancija. Napretkom i sofisticiranošću instrumentalnih tehnika, metoda je doživjela različite modifikacije kako bi odgovarala određenim zahtjevima, iako je osnovni pristup ostao isti (Kedare Sagar i Singh, 2011). Godine 1958. Blois je razvio metodu s ciljem da se na identičnom principu odredi antioksidacijska aktivnost korištenjem stabilnog slobodnog radikala α,α -difetil- β -pikrilhidrazila (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,33$). DPPH je jedna od neizostavnih metoda prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakta ili čistih spojeva. DPPH radikal jedan je od nekoliko relativno stabilnih i tržišno raspoloživih organskih dušikovih radikala (Kedare Sagar i Singh, 2011). Princip reakcije antioksidansa s DPPH radikalom zasniva se na doniranju H atoma DPPH radikalima koji se potom reducira te nastaje DPPH-H i radikal antioksidansa. Mehanizam reakcije s antioksidansima je promjena boje od tamnoljubičaste do blijedožute nakon reakcije s peroksilnim radikalima (Bondet i sur., 1997) (Slika 8).



DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

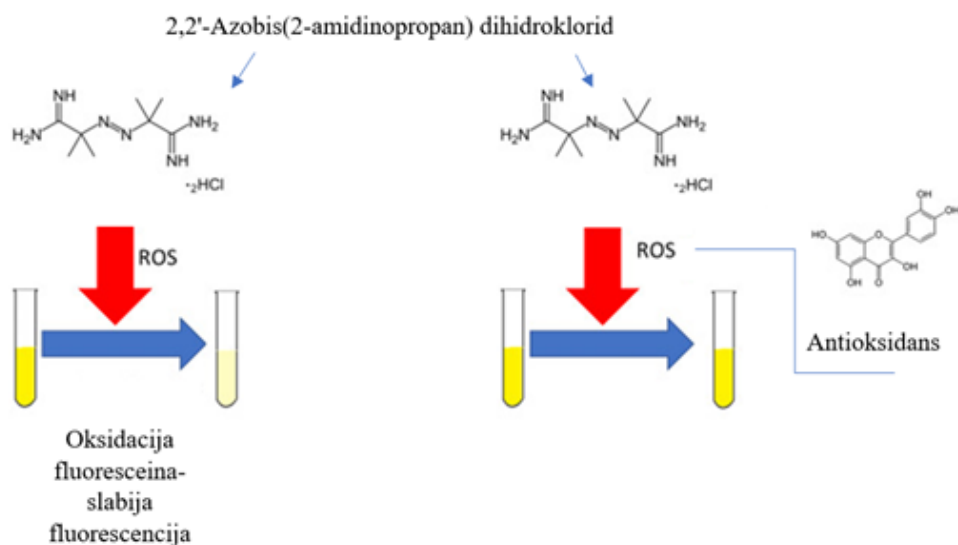
Slika 8. Mehanizam reakcije DPPH radikala sa antioksidansima rezultira promjenom boje od tamnoljubičaste do svjetložute (izvor: <https://www.shutterstock.com/image-illustration/dpph-22diphenyl1picrylhydrazyl-molecule-used-antioxidant-evaluation>).

DPPH je prisutan kao monomer koji se može otapati u organskim otapalima poput metanola i etanola te reagirati sa slobodnim radikalima koji nisu topljivi u vodi. Sadržaj vode u uzorku treba biti ispod 60% da ostane dobra topljivost radikala. Test se temelji na mjerenju sposobnosti antioksidansa za inhibiciju ovog slobodnog radikala. Neparni elektron atoma dušika u DPPH reducira se primanjem atoma vodika iz antioksidansa u odgovarajući hidrazin (Contreras-Guzman i Strong, 1982). DPPH je klasificiran kao stabilan slobodni radikal zahvaljujući delokalizaciji rezervnog elektrona preko cijele molekule, odnosno molekule ne dimeriziraju, kao većina drugih slobodnih radikala. Delokalizacija također dovodi do tamnoljubičaste boje, s apsorpcijom u otopini etanola na oko 520 nm. Reducirani oblik nastaje miješanjem DPPH otopine sa supstancom koja može donirati atom vodika što rezultira gubitak ljubičastog obojenja (Huang i sur., 2005). Metoda je jedinstvena u provođenju reakcije uzorka s DPPH u metanolu ili etanolu/vodi, što olakšava ekstrakciju antioksidativnih spojeva iz uzorka. Analiza antioksidansa drugim metodama može biti ograničena na one spojeve topive u odabranim otapalima. Značajna prednost ove metode je u tome što DPPH reagira s cijelim uzorkom, a dovoljno vremena omogućuje ovom radikalu da sporo reagira čak i sa slabim

antioksidansima (Prakash, 2001). DPPH metoda može se primijeniti u vodenim i nepolarnim organskim otapalima te se može koristiti za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa (Prior i sur., 2005). DPPH analiza smatra se vjerodostojnom, praktičnom i ekonomičnom metodom za procjenu sposobnosti antioksidansa za hvatanje radikala, budući da je DPPH stabilan spoj i ne mora se stvarati. Da bi se eliminirao rizik od toplinske degradacije testiranih molekula učinkovitost antioksidansa mjeri se na sobnoj temperaturi (Bondet i sur., 1997). Među svim dostupnim metodama, DPPH metoda je široko primjenjivana za procjenu antioksidativne aktivnosti. Također se može koristiti za kvantificiranje antioksidansa u složenim biološkim sustavima, za čvrste ili tekuće uzorke (Prakash, 2001).

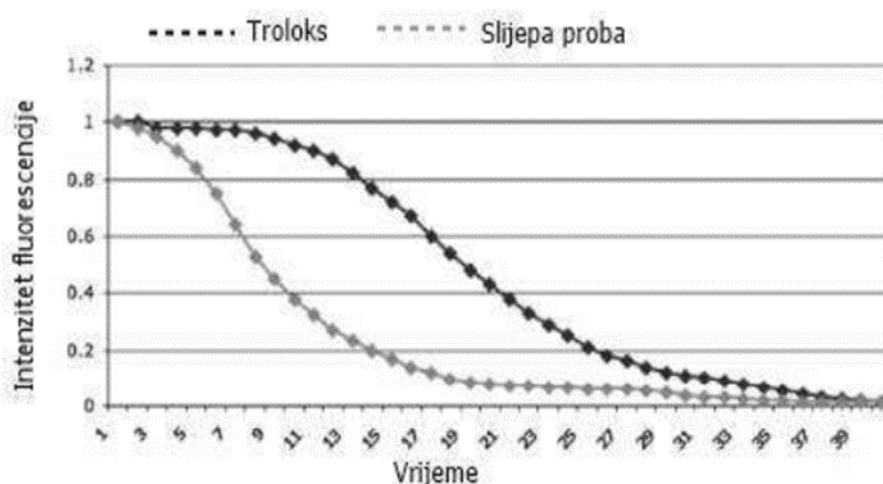
1.5.3. ORAC metoda

Metoda ispitivanja kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) služi za mjerenje antioksidativnog kapaciteta tvari. Bazira se na doniraju protona antioksidansa (AH) peroksilnom radikalu s namjerom da ga neutraliziraju. ORAC test mjeri fluorescentni signal iz sonde koja je ugašena u prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Dodatak antioksidansa apsorbira generirani ROS, dopuštajući da fluorescentni signal opstane. Novonastali radikal stupa u reakciju s fluoresceinom prilikom čega nastaje nefluorescentni produkt te na taj način dolazi do pada fluorescencije. Odnosno, test se temelji na ideji da spoj koji stvara kisikove radikale AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) proizvodi ROS, koji mogu oksidirati fluorescein. Ovo je vrlo fluorescentni spoj, dok njegov produkt oksidacije ima vrlo slabu fluorescenciju. Zbog te činjenice, fluorescencija otopine opada s vremenom jer ROS oksidira fluorescein. Ako se testu doda antioksidans, antioksidans reagira s ROS-om, što stoga odgađa oksidaciju fluoresceina do upotrebe antioksidansa. Za kalibraciju sustava, uglavnom se koristi Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), sintetski analog vitamina E (Slika 9) (Prior i sur., 2003).



Slika 9. Princip analize kapaciteta apsorbancije kisikovih radikala (ORAC) (prema Borlinghaus i sur., 2020).

ORAC metoda ima zadaću odrediti mogućnost uzorka da ograniči oksidaciju fluorescentnog reagensa poput fluoresceina. Oksidacija fluoresceina je popraćena smanjenjem fluorescencije mjerene tijekom vremena na valnoj duljini ekscitacijskog spektra od 485 nm i valnoj duljini emisijskog spektra od 520 nm. Ova promjena fluorescencije izravno je povezana s brojem slobodnih radikala. Prisutnost antioksidansa dovodi do inhibicije slobodnih radikala koji oštećuju fluorescentni spoj. Nastali slobodni radikali brzo „gase“ fluorescenciju ukoliko dođe do nedostatka inhibitora. Promatrajući vremenski period kroz koji dolazi do gubitka fluorescencije (bez dodatka uzorka i uz dodani uzorak) određuje se antioksidacijska aktivnost. Antioksidacijska aktivnost je jača s većom razlikom u brzini reakcija između fluorescentne probe i peroksilnog radikala te peroksilnog radikala i antioksidansa (Prior, 2015). Također je moguće antioksidacijski kapacitet iskazati preko ukupne površine ispod krivulje promjene fluorescencije izražene u %. U zavisnosti o vremenu izraženom u minutama, odnosno kao razlika površine ispod krivulje za slijepu probu i ispitivani uzorak (Slika 10).



Slika 10. Izražavanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću krivulje (izvor: Garrett i sur., 2010).

Trolox je je snažan antioksidans koji se koristi u biokemijskim primjenama za smanjenje oksidativnog stresa i standardni je antioksidans koji se koristi u testovima antioksidativnog kapaciteta. Upotrebljava se kao standard po kojem se uspoređuju svi nepoznati antioksidansi. Modifikacije ORAC testa uključuju upotrebu fluoresceina kao fluorescentne sonde (ORACFL) ili odvajanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa kako bi se dobio ukupni antioksidativni kapacitet. Što je ORAC indeks veći, kvantitativno posjeduje više antioksidativnih svojstava. Rezultati su izraženi kao molarnost Troloksa po molarnosti ili masi ispitanog uzorka. ORAC je vrijedan alat za procjenu antioksidativnog kapaciteta hrane. ORAC test je relevantan za mjerenje antioksidativnog kapaciteta u akademskim istraživanjima kao i u industrijske svrhe. Negativni aspekti ove metode su nužno korištenje uređaja spektrofluorimetra. Iako posjeduje sposobnost da mjeri istovremeno veliki broj uzoraka, potrebno vrijeme za određivanje ORAC vrijednosti je 1 h i 20 min, dok je tijekom analize nužno termostatiranje na 37 °C (Garrett i sur., 2010).

1.6. Dosadašnja istraživanja

Halopteris scoparia (Linnaeus) Sauvageau, 1904 ranije je bila poznata pod nazivom *Stypocaulon scoparium* te je jedna od vrsta algi visokog biološkog potencijala, a posebice su dokazane njena antimikrobna i antifungalna aktivnost. Također je poznata kao obećavajući medicinski i izuzetno moćni agens te pokazuje širok raspon primjene u kulinarstvu, posebice u zemljama Dalekog istoka (Holdt i Kraan, 2011). Dosadašnje studije istaknule su kako upravo zbog prisutnosti bioaktivnih spojeva *H. scoparia* posjeduje antioksidativna i protuupalna svojstva (Hadj Ammar i sur., 2015). Široka primjenu ove smeđe alge uočava se i u kozmetičkoj industriji. Dokazano djelovanje protiv stvaranja bora je itekako pospješilo njeno korištenje u njezi kože (Remya i sur., 2022). Posljednja istraživanja ukazuju i na mogućnost antikancerogenog djelovanja ekstrakata *H. scoparia* što bi uvelike pomoglo u kemoprevenciji raka te velikom unaprijeđenju medicine (Güner i sur., 2019). Osim primjene u farmaceutske i medicinske svrhe, uspješno se koristi i u prehrambenoj industriji. Aktivni metaboliti također su poznati kao biogeni spojevi, kao što su halogenirani spojevi, alkoholi, aldehidi i terpenoidi, proizvode ih različite vrste morskih algi, a imaju antibakterijska, antialgalna i antigljivična svojstva te su učinkoviti u sprječavanju bioobraštanja (Kolanjinathan i sur., 2014). Steroli su glavna nutritivna komponenta morskih algi. Različite vrste imaju različite vrste sterola, a smeđe alge sadrže pretežno fukosterol, kolesterol i brasikasterol (Sánchez-Machado i sur., 2004). Navedena svojstva čine morske alge potencijalnijim izvorom blagodati iskoristivih u prehrani ili za ekstrakciju spojeva. Godinama je poznata primjena algi u prehrambenoj industriji. Karagenan, alginat i agar prirodni su biljni produkti dobiveni iz algi te se upotrebljavaju kao zgušnjivači, emulgatori za umake, stabilizatori i sredstva za želiranje (Leandro i sur., 2019). Također, riječ je o raznolikim skupinama organizama koji igraju važnu ulogu u morskom ekosustavu (Kolanjinathan i sur., 2014).

Čagalj i sur. (2022a) proučavali su sezonske varijacije u kemijskom sastavu i antioksidativnom djelovanju ekstrakata smeđe morske alge *Padina pavonica*. Vrijeme uzorkovanja je također bilo od svibnja do rujna, u razdoblju kada njen talus raste. Talus se svake zime odvoji i ponovno izraste u proljeće. Najviša vrijednost sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost određena je uz pomoć FC, FRAP, DPPH i ORAC metoda te je zabilježena za ekstrakt alge sakupljen u lipnju. Time je utvrđeno da kemijski sastav i biološka aktivnost morskih algi variraju ovisno o sezoni, fazi rasta i drugim čimbenicima okoliša. U radu

je također istaknuto kako je od velike važnosti odabrati pravu metodu ekstrakcije zbog dobivanja veće količine bioaktivnih spojeva čime bi se ujedno postigla i jača biološka aktivnost.

Garcia-Vaquero i sur. (2021) određivali su kemijske, fitokemijske i mineralne profile triju komercijalno značajnih smeđih algi (*Laminaria digitata*, *L. hyperborea* i *Ascophyllum nodosum*). Alge su se sakupljale svake sezone, kroz vremenski period od dvije godine na području zapadne obale Irske. Prethodno su svi uzorci očišćeni od epifita, osušeni u pećnici (50 °C) u razdoblju od 9 dana te mljeveni pomoću električnog mlinca i prosijani do veličine čestica od 1 mm. Uzorci morskih algi zatim su vakuumski pakirani i pohranjeni na sobnoj temperaturi za svrhe daljnje analize. Svi analizirani spojevi, masne kiseline i minerali značajno su varirali ovisno o vrsti makroalgi, sezoni i godini sakupljanja. U ovoj studiji postojala je jaka negativna korelacija između nakupljanja bjelančevina i ugljikohidrata. Općenito, razine bjelančevina bile su visoke tijekom zime i/ili proljeća te su pale na minimum tijekom ljeta i/ili jeseni, dok su razine ugljikohidrata pratile suprotan trend. Pozitivne korelacije također su identificirane u svim makroalgama između njihovog sadržaja fenola i antioksidativnih svojstava (DPPH i/ili FRAP). Štoviše, može se pretpostaviti kako sunčevo zračenje i isparavanje objašnjavaju razine TPC i FRAP u makroalgi *A. nodosum*. Za određivanje TPC i antioksidativne aktivnosti makroalgi, uzorci makroalgi prethodno su obrađeni u 80% metanolu (1:10, w/v) i stavljeni u vortex na 170 okretaja u minuti na sobnoj temperaturi. Metanolni ekstrakti su filtrirani, ispareni, osušeni smrzavanjem i pohranjeni na -20 °C prije daljnjih analiza antioksidansa. TPC makroalgi određen je korištenjem Folin-Ciocalteu fenolnog reagensa. Razine TPC i FRAP u *A. nodosum* bile su općenito niske tijekom zime, povećavajući se tijekom proljeća i ljeta i opadajući tijekom jeseni. Ovi rezultati upućuju na povećanu proizvodnju antioksidativnih spojeva u stanicama makroalgi u razdobljima povećanog oštećenja uzrokovanog oksidativnim stresom kod vrsta makroalgi koje se nalaze na gornjoj srednjoj obali u usporedbi s vrstama koje rastu u nižim obalama ili područjima ispod plime.

Obzirom na to da je već dobro poznata uporaba smeđih algi u kozmetičke svrhe, Freitas i sur. (2020) u svom su istraživanju proučavali starenje kože kao posljedicu izlaganja UV zračenju što dovodi do povećavanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Ekološki prihvatljivi proizvodi za kožu od velike su važnosti, a pokazalo se kako su prirodni spojevi ekstrahirani iz smeđih morskih algi dobri kandidati zbog svog širokog spektra bioaktivnosti, posebice kao antioksidansi. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti dermo-kozmetički potencijal različitih frakcija dobivenih iz smeđe morske alge *Fucus spiralis*. Određen je TPC, DPPH, FRAP te ORAC. Iako su gotovo sve frakcije pokazale antioksidativne učinke, frakcija u etil acetatu

pokazala je najveću antioksidacijsku sposobnost (IC₅₀ od 38,5 µg/mL, DPPH test) i pokazala snažan učinak kao inhibitor kolagenaze (0,037 µg/mL) i elastaze (3,0 µg/mL). Štoviše, ova je frakcija također bila najsnažnija u smanjenju proizvodnje ROS-a potaknute H₂O₂ (IC₅₀ od 41,3 µg/mL) i UVB (IC₅₀ od 31,3 µg/mL). Ove biološke aktivnosti mogu se pripisati visokom sadržaju florotanina, čime se pojačava potencijal alge *F. spiralis* za daljnje dermatološke primjene.

1.7. Svrha i ciljevi rada

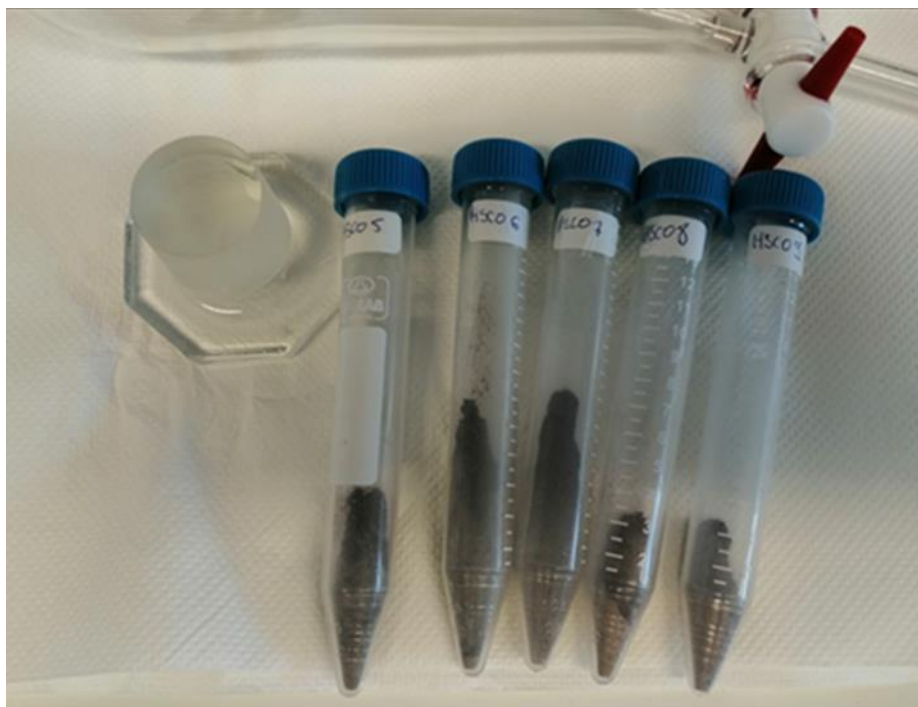
Svrha ovog diplomskog rada bila je utvrditi utjecaj sezone rasta (od svibnja do rujna) i metode ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta kombiniranim postupkom koji koristi i ultrazvuk i mikrovalove) na antioksidacijski potencijal alge *H. scoparia*.

Ciljevi rada bili su sljedeći:

- analizirati ekstrakte smeđe alge *H. scoparia* prikupljene kroz sezonu rasta pripremljene različitim ekstrakcijskim metodama.
- Dobivenim ekstraktima odrediti sadržaj ukupnih fenola Folin-Ciocalteu (FC) metodom, i antioksidacijski potencijal pomoću FRAP, DPPH i ORAC metoda s ciljem određivanja najbolje metode ekstrakcije i mjeseca branja tijekom sezone rasta za dobivanje ekstrakta najjače biološke aktivnosti.

2. MATERIJALI I METODE

Smeđa alga *H. scoparia* prikupljena je tijekom sezone rasta od svibnja do rujna 2020. godine na području otoka Čiovo. Prije početka rada uzorci su isprani vodom te su otklonjene sve nečistoće i epifiti. Alge su smrznute i liofilizirane. Prije provođenja ekstrakcija liofilizirane alge su samljevene pomoću električnog mlinca. Samljevene alge su odvagane u epruvete te označene (naziv i mjesec uzorkovanja) (Slika 11). Uzorcima je dodan 50% etanol u omjeru 1:10 (alga : otapalo). Potom su provedene UAE, MAE te UMAE. Dobiveni ekstrakti su potom filtrirani te korišteni za određivanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog potencijala.



Slika 11. Samljeveni i odvagani uzorci alge *Halopteris scoparia* kroz sezonu rasta (svibanj-rujan).

2.1. Aparatura i laboratorijski pribor

Korišteni uređaji, laboratorijski pribor, posuđe i kemikalije su prikazani u Tablicama 1., 2. i 3.

Tablica 1. Popis uređaja korištenih u analizi

Naziv uređaja	Model i proizvođač
---------------	--------------------

liofilizator	FreeZone 2.5, Labconco, SAD
električni mlinac	Joy Delimano, Hrvatska
analitička vaga	Kern, Model ALS 120-4, Kingston, UK
ultrazvučna kupelj	Ultrasonic Cleaner, Digital Pro+, UK
laboratorijska centrifuga	Tehtnica Centric 150, DOMEL d.o.o., Slovenia
uređaju za mikrovalnu ekstrakciju	Ethos™ X, Milestone, Italija
spektrofotometar	Tecan MicroPlates Reader, model SUNRISE, Tecan Group Ltd., Mannedorf, Švicarska
spektrofluorimetar	Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTekInstruments, Inc., Švicarska
spektrofotometar	SPECORD 200 Plus, Edition 2010; Analytik Jena AG, Jena, Njemačka

Tablica 2. Popis kemikalija korištenih u analizi.

Naziv	Kemijska formula
-------	------------------

Folin - Ciocalteu reagens	$C_{10}H_5NaO_5S$
20 %- tna topina natrijeva karbonata	Na_2CO_3
galna kiselina (otopina standarda za određivanje fenola)	$C_7H_6O_5$
acetatni pufer, $c = 300$ mmol/L, $pH = 3,6$	$C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$
klorovodična kiselina $c = 40$ mmol/L, $0,1$ M	HCl
TPTZ (2, 4, 6 – tripiridil – s – triazin), $Mr =$ 10 mmol/L	$C_{18}H_{12}N_6$
željezov (III) klorid, $c (Fe^{3+}) = 20$ mmol/L	$FeCl_3$
fosfatni pufer, $pH = 7$, $c = 0,2$ M	$H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$
fosfatni pufer, $pH = 7,4$, $c = 0,075$ M	$H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$
florescein, $c = 4,2$ mM	$C_{10}H_{12}O_5$
AAPH (2,2-azobis (2-metilpropionamid)– dihidroklorid), , $c = 0,15$ mol/L	$C_8H_{20}Cl_2N_6$
otopina standarda – Trolox (6–hidroksi– 2,5,7,8–tetrametilokroman– karboksilna kiselina); $Mr = 250,29$ g/mol, 97% čistoće	$C_{14}H_{18}O_4$
DPPH (2,2–difetil–1– pikrilhidrazil)	$C_{18}H_{22}N_5O_6$
etanol 96%	C_2H_6O
destilirana voda	H_2O

2.2. Priprema ekstrakata

U 1 g liofiliziranog i samljevenog uzorka algi dodano je 10 mL 50%-tnog etanola. Uzorci su postavljeni u ultrazvučnu kupelj kako bi se provela UAE. Tijekom ekstrakcije potpomognute ultrazukom korištena je jačina ultrazvuka od 40 Hz, ekstrakcija je trajala jedan sat, dok je temperatura ekstrakcije bila 60 °C (Slika 12).

MAE se provela pomoću uređaja za mikrovalnu ekstrakciju. Tijekom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima korišteni su mikrovalovi snage 200 W i temperatura od 60 °C u trajanju od 15 minuta (Slika 13).

Za testiranje kombinacije ovih dviju ekstrakcijskih metoda, korištena je UMAE, pri čemu su uzorci prvo ekstrahirani pomoću ultrazvuka, a zatim i pomoću mikrovalova pri već navedenim parametrima.

Nakon ekstrakcije ekstrakti su filtrirani i skladišteni u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C do trenutka provođenja spektrofotometrijskih analiza.



Slika 12. Ultrazvučna kupelj s uzorcima.



Slika 13. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju.

2.3. Metode određivanja sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola upotrebljena je Folin – Ciocalteu metoda (Singleton i Rossi, 1980; Amerine i Ough, 1980). FRAP, DPPH i ORAC metode su korištene za istraživanje antioksidacijskog potencijala ekstrakata alge *H. scoparia*.

2.3.1. Folin – Ciocalteu metoda

U kivete veličine 10 mm otpipetirano je 25 μL uzorka, 1,5 ml destilirane vode te 125 μL reagensa Folin-Ciocalteu (FC). FC reagens je dostupan kao već pripravljena kemikalija. Pripravljena otopina se dobro promiješa te se nakon vremenskog perioda od jedne minute dodaje 375 μL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3) i 475 ml destilirane vode. Otopina se ostavi da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, potom se očita apsorbancija na spektrofotometru (valna dužina 765 nm) (Slika 14). Otopina natrijevog karbonata pripravlja se otapanjem 200 g bezvodnog natrijevog karbonata u 1 litri vode. Za pripremu matične otopine standarda za određivanje sadržaja ukupnih fenola odvagalo se 0,5 g galne kiseline u odmjernu tikvicu od 100 mL te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do baždarene oznake.



Slika 14. Spektrofotometar.

Usljed reakcije fenola s FC reagensom dolazi do promjene obojenja iz žutog u tamnoplavu (Slika 15.). Rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline (GAE) obzirom da se za izradu standardne krivulje koristila galna kiselina (koncentracija otopine od 50 do 500 mg/L). Analiza je provedena u 3 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost.



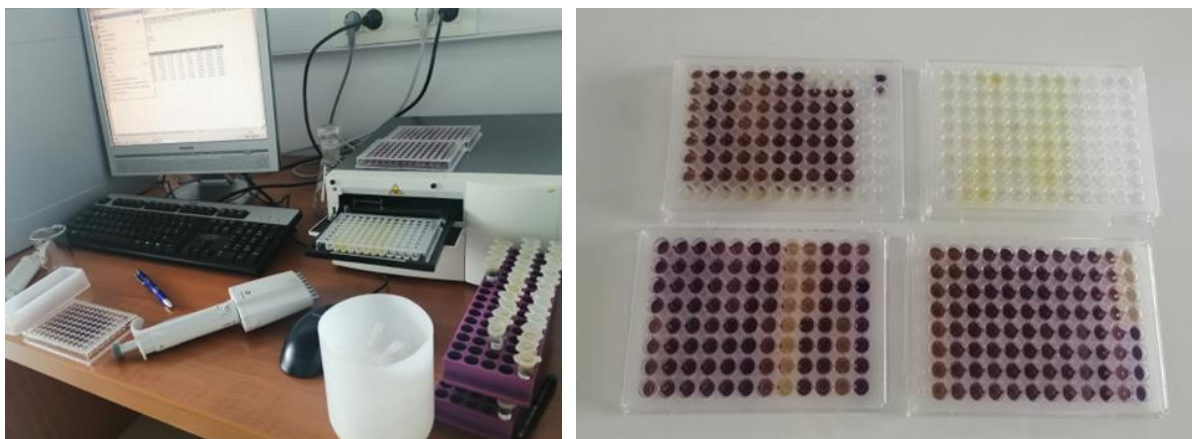
Slika 15. Promjena boje iz žute u plavu tijekom određivanja sadržaja ukupnih fenola.

2.3.2. FRAP metoda

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata FRAP metodom određena je u mikrotitarskim pločicama. Kemikalije koje su potrebne za izradu ove metode su: acetatni pufer, natrijev acetat, glacijalna octena kiselina, otopina klorovodične kiseline, otopina TPTZ-a i otopina željezovog (III) klorida. FRAP reagens se priprema od 25 mL acetatnog pufera ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$, molarne koncentracije $c = 300 \text{ mmol/L}$ te pH vrijednosti 3,6), 2,5 mL otopine TPTZ reagensa (u 50 ml otopine klorovodične kiseline otopi se 159,4 mg TPTZ-a) i 2,5 mL otopine $FeCl_3$ (odvaži se 551,6 mg željezova (III) klorida i otopi u 100 ml destilirane vode). Svježe pripravljena otopina FRAP reagensa (300 μL) pipetira se u mikrotitarske pločice te se očita apsorbancija otopine pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 592 nm. Zatim se u reagens doda 10 μL ekstrakta te se prati promjena apsorbancije nakon 4 minute. Razlika između konačne vrijednosti apsorbancije reakcijske smjese nakon proteklog vremena (4 min) i apsorbancije FRAP reagensa prije dodavanja uzorka daje promjenu apsorbancije (Benzie i Strain, 1999). Standard koji se upotrebljava je Troloks, a analiza se provela u 4 ponavljanja. Rezultati su izraženi kao μM Troloks ekvivalenti (TE).

2.3.3. DPPH metoda

Antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzoraka ekstrakta alge *H. scoparia* određena je mjerenjem sposobnost inhibicije DPPH radikala (Gadow i sur., 1997). Otopina DPPH radikala priprema se od 4 mg radikla koji se otopi u 100 mL etanola prilikom čega nastaje intenzivno ljubičasta otopina. Neposredno prije mjerenja pripravlja se radni DPPH reagens. Otopina DPPH radikala razrijedi se etanolom dok se ne postigne apsorbancija otopine od 1,2 pri 492 nm. U mikrotitarske pločice otpipetira se volumen od 290 μL radne otopine DPPH radikala te se očita apsorbancija prije dodavanja ekstrakta. Potom se u otopinu DPPH radikala doda 10 μL ekstrakta. Promjena apsorbancije se bilježi nakon 30 i 60 minuta, a sve analize napravljene su u četiri ponavljanja. Gašenje DPPH radikala manifestira se promjenom obojenja iz ljubičastog u žuto (Slika 16).



Slika 16. Promjena obojenja iz ljubičaste u žutu kao posljedica gašenja DPPH radikala.

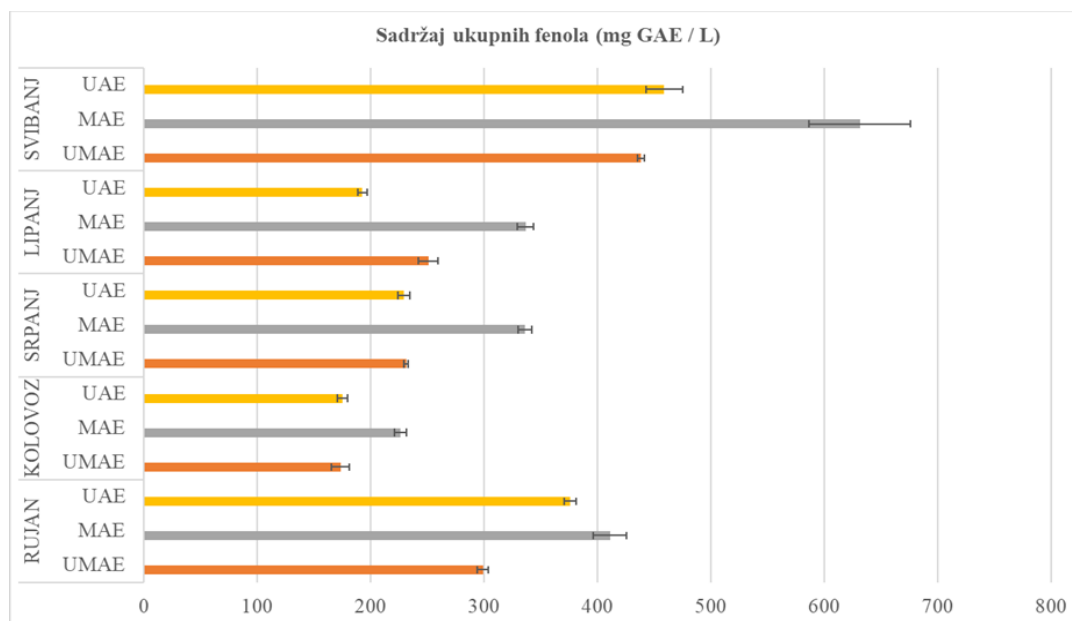
2.3.4. ORAC metoda

Potrebno je pripremiti fosfatni pufer ($c = 0,2 \text{ M}$) na način da se odvaži 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) te se otopi u 200 mL destilirane vode. U 200 mL destilirane vode otopi se i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). U odmjerne tikvici volumena 200 mL se pomiješa 61 mL otopine Na_2HPO_4 i 39 mL otopine $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ te se ista nadopuni destiliranom vodom do baždarene oznake. Pripremi se fosfatni pufer ($c = 0,075 \text{ M}$) tako što se u odmjernu tikvicu od 100 mL doda 37,5 mL otopine fosfatnog pufera (0,2M) te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake. Stock otopina fluoresceina (4,2 mM) priprema se otapanjem 15 mg fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M). Radna otopina fluoresceina (0,08 μM) pripremi se tako što se 1,9 μL stock otopine nadopuni s 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M). Za svaku analizu se pripravljaju svježja razrjeđenja otopina fluoresceina. Zatim slijedi priprema AAPH, za 5mL otopine potrebno je izvagati 0,207 g AAPH te ga otopiti u 5 mL fosfatnog pufera (0,075 M). Početna otopina troloks standarda koncentracije 0,02 M se priprema otapanjem 0,25 g troloksa u 50 mL fosfatnog pufera (0,075M). Od 0,02 M otopine troloksa pripreme se razrjeđenja (6,25-50 μM). Uređaj je prije mjerenja potrebno termostatirati na temperaturi od 37 °C. U otvorene mikrotitarske pločice doda se 150 μL fluoresceina i 25 μL uzorka. Prethodno se za slijepu probu doda fosfatni pufer (0,075 M) te otopina standarda Troloksa za izradu baždarnog pravca te se sve otopine termostatiraju u vremenskom periodu od 30 minuta pri temperaturi od 37 °C. Nakon termostatiranja dodaje se 25 μL AAPH te se mjeri promjena inteziteta fluorescencije svake minute pri valnim duljinama $\lambda_{\text{eks}} = 485 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

3. REZULTATI

3.1. Rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola

Utjecaj sezone rasta i korištene metode ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenola prikazan je na Slici 17. Za uzorke prikupljene u svibnju zabilježena je najveća vrijednost sadržaja ukupnih fenola i to primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Kod uzoraka ekstrahiranih pomoću ultrazvuka najvišu vrijednost sadržaja ukupnih fenola također je imala alga prikupljena u svibnju ($458,89 \pm 16,19$ mg GAE/L), dok je ekstrakt algi prikupljenih u kolovozu imamo najmanju vrijednost ($175,00 \pm 4,41$ mg GAE/L). Alge pripremljene uz pomoć MAE i prikupljene kroz mjesec svibanj pokazuju najveću koncentraciju ukupnih fenola ($631,67 \pm 44,81$ mg GAE/L). Najmanja koncentracija sadržaja ukupnih fenola za MAE zabilježena je za uzorke prikupljene u kolovozu ($226,11 \pm 5,36$ mg GAE/L). Prilikom kombinacije ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE) najviša vrijednost ukupnih fenola također je zabilježena u svibnju ($438,61 \pm 3,15$ mg GAE/L), ali je dobivena vrijednost niža u usporedbi s uzorcima pripremljenim pomoću MAE i UAE.

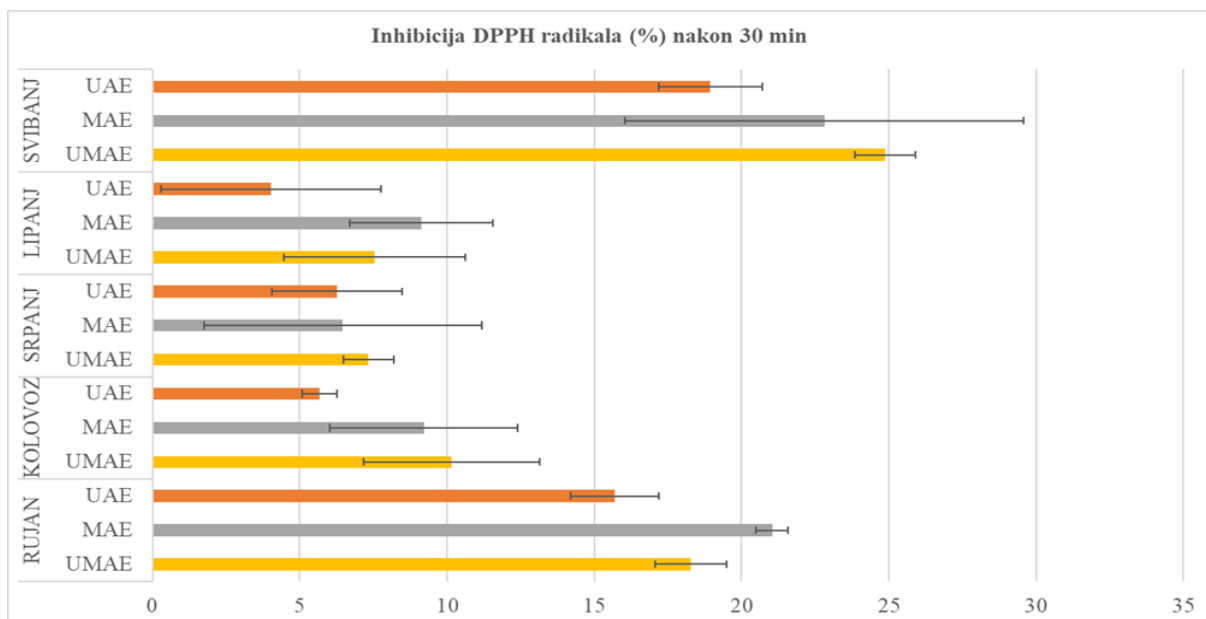


Slika 17. Prikaz sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima alge *H. scoparia* kroz sezonu rasta (svibanj – rujan) dobivenih različitim metodama ekstrakcije (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) te kombinacija ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE)).

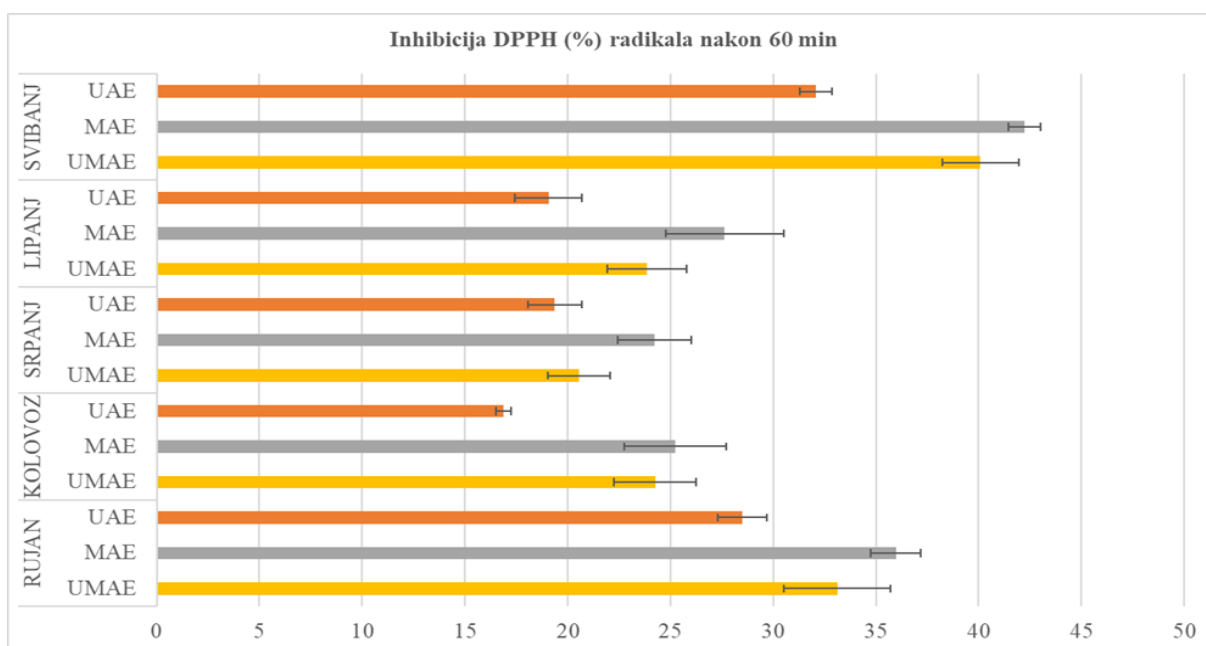
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnost

Rezultati inhibicije DPPH radikala nakon 30 min su prikazani na Slici 18. Najveća inhibicija zabilježena je za ekstrakt alge *H. scoparia* prikupljene u svibnju pripremljen MAE metodom ($24,88 \pm 1,04\%$ inhibicije). Za uzorke ekstrahirane pomoću MAE najveća vrijednost je također zabilježena u svibnju ($22,81 \pm 6,77\%$) kao i za uzorke ekstrahirane pomoću UAE ($18,94 \pm 1,76\%$).

Nakon sat vremena rezultati su ponovo očitani i prikazani na Slici 19. Najviša vrijednost inhibicije nakon 60 minuta je zabilježena za uzorke prikupljene u svibnju ekstrahirane pomoću MAE ($42,23 \pm 0,78\%$). Druga najviša vrijednost je zabilježena također za uzorke prikupljene u svibnju, ali ekstrahirane pomoću UMAE ($40,09 \pm 1,86\%$). Najniža sposobnost hvatanja slobodnih radikala zabilježena je nakon 30 min za UAE metodu i alge prikupljene u mjesecu lipnju ($4,03 \pm 3,74$) te nakon 60 min UAE metodom za alge prikupljene u mjesecu kolovoza ($16,88 \pm 0,37$). Može se uočiti kako su za sve tri metode najmanje vrijednosti zabilježene u periodu od lipnja do kolovoza. Najveća inhibicija za uzorke ekstrahirane UAE metodom zabilježena je u svibnju ($32,08 \pm 0,78\%$) i rujnu ($28,51 \pm 1,19\%$), a manje vrijednosti su zabilježene u lipnju, srpnju i kolovoza ($19,07 \pm 1,63\%$, $19,37 \pm 1,30\%$, $16,88 \pm 0,37\%$). Za MAE metodu vrijedi isto, najveća vrijednost zabilježena je u svibnju ($42,23 \pm 0,78\%$), vrijednosti su se smanjile tijekom lipnja, srpnja i kolovoza ($27,63 \pm 2,87\%$, $24,22 \pm 1,78\%$, $25,23 \pm 2,50\%$) te su se ponovno povećale u rujnu ($35,97 \pm 1,22\%$). UMAE metoda najveće vrijednosti također bilježi u svibnju ($40,09 \pm 1,86\%$), a potom slijedi pad tijekom lipnja, srpnja i kolovoza ($23,86 \pm 1,91\%$, $20,54 \pm 1,53\%$, $24,25 \pm 1,98\%$) te u rujnu ponovno doseže visoku vrijednost ($33,12 \pm 2,59\%$). Najmanje vrijednosti zabilježene su u periodima kada je temperatura mora najveća (lipanj-kolovoz).

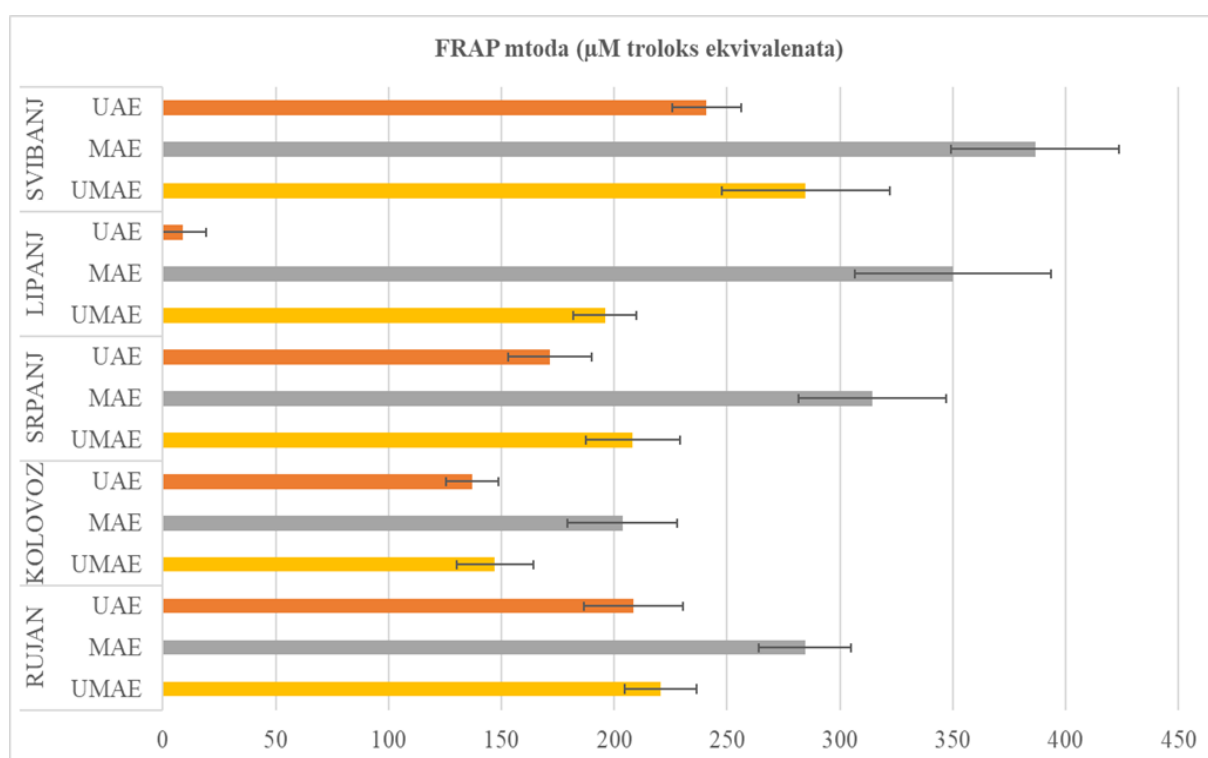


Slika 18. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti, uporabom DPPH metode nakon 30 min, ekstrakata pripremljenih različitim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) te kombinacija ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE)).



Slika 19. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti, određeni DPPH metodom nakon 60 min, ekstrakata pripremljenih različitim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) te kombinacija ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE)).

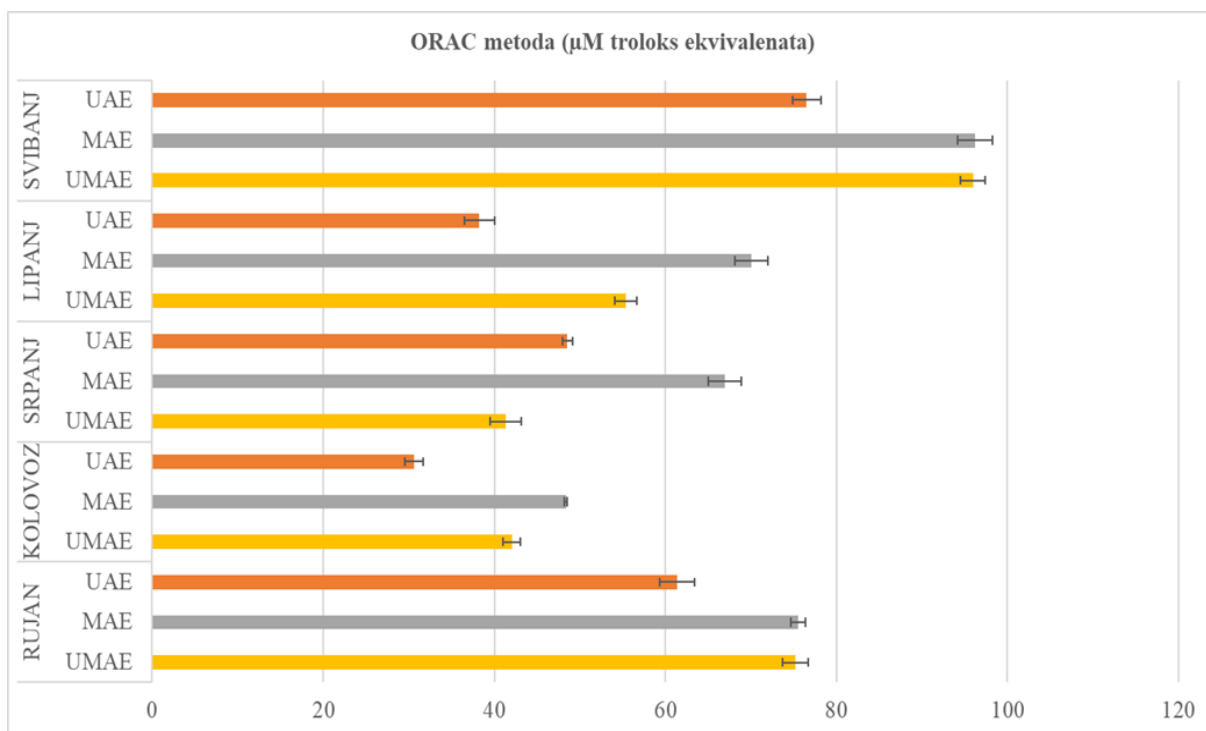
Na Slici 20 prikazani su rezultati dobiveni FRAP metodom. Najviša redukcijska aktivnost zabilježena je za algu *H. scoparia* prikupljenu u svibnju, ekstrahiranu pomoću MAE ($386,54 \pm 37,17 \mu\text{M TE}$). Između uzoraka pripremljenih UAE metodom, uzorci prikupljeni u svibnju imali su najvišu FRAP vrijednost od $240,96 \pm 15,40 \mu\text{M TE}$. Uzorci pripremljeni pomoću UMAE pokazali su veću redukcijsku sposobnost od uzoraka pripremljenih pomoću UAE. Najniže FRAP vrijednosti zabilježene su za ekstrakt *H. scoparia* pripremljen pomoću MAE od algi prikupljenih u kolovozu ($203,65 \pm 24,37 \mu\text{M TE}$), ekstrakt pripremljen pomoću UAE iz lipnja ($127,69 \pm 10,49 \mu\text{M TE}$) i za ekstrakt pripremljen pomoću UMAE iz kolovoza ($147,12 \pm 16,90 \mu\text{M TE}$).



Slika 20. Rezultati određivanja antioksidacijske sposobnosti, uporabom FRAP metode, ekstrakata pripremljenih različitim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) te kombinacija ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE))

Rezultati antioksidacijske aktivnosti dobiveni ORAC metodom prikazani su na Slici 21. Korišteno je razrjeđenje ekstrakata od 1:100. Najveća antioksidacijska vrijednost zabilježena je za algu prikupljenu u svibnju i ekstrahiranu pomoću MAE ($96,19 \pm 2,00 \mu\text{M TE}$), dok je

najmanju antioksidacijsku sposobnost pokazao ekstrakt alge prikupljene u kolovozu pripremljen pomoću UAE ($30,59 \pm 1,08 \mu\text{M TE}$). Za ekstrakte pripremljene pomoću UAE, najveća antioksidacijska vrijednost je zabilježena u uzorku prikupljenom u svibnju ($76,51 \pm 1,64 \mu\text{M TE}$), kao i za ekstrakte alge pripremljene pomoću UMAE ($95,96 \pm 1,43 \mu\text{M TE}$). Za UMAE metodu najmanja vrijednost zabilježena je u mjesecu srpnju ($41,35 \pm 1,84 \mu\text{M TE}$).



Slika 21. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti, uporabom ORAC metode, ekstrakata pripremljenih različitim metodama (ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) te kombinacija ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom i mikrovalovima (UMAE)).

4. RASPRAVA

Morske alge istaknute su kao obećavajući izvori novih molekula i bioaktivnih spojeva. Imaju sposobnost da se prilagode ekstremnim uvjetima okoliša proizvodnjom molekula poput polisaharida, fenolnih spojeva, vitamina i minerala. U zadnjih nekoliko godina, povećao se interes za ekstrakciju ovih spojeva za njihovu upotrebu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

U mnogim dosadašnjim istraživanjima ispitivan je sadržaj ukupnih fenola u smeđim algama. Garcia-Vaquero i sur. (2020), u svom radu opisuju utjecaj ultrazvuka, mikrovalova te kombinaciju ultrazvučno-mikrovalnih metoda na smeđu algu *Ascophyllum nodosum* kao cilj povećavanja ekstrakcije bioaktivnih spojeva i antioksidansa. Koristili su nove metode ekstrakcije, kao što je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima. Kombinacija obje metode (UMAE) koristila se kako bi se iz makroalgi ekstrahiralo više bioaktivnih spojeva. Stoga je upotreba UAE procesa s drugim tehnologijama ekstrakcije pokazala obećavajuće prednosti pri ekstrakciji polisaharida kao što su FSP (fukozo-sulfatirani polisaharidi) glukani i drugi antioksidativni spojevi iz makroalgi. Najveći prinos fenolnih spojeva zabilježili su korištenjem 50% amplitude sonikacije tijekom 5 minuta ($2340,54 \pm 65,55$ mg GAE/100 g suhe alge). Istodobna primjena mikrovalova i ultrazvuka utjecala je na značajan učinak prinosa ekstrakcije FSP-a i ukupnih topivih ugljikohidrata. Ovo je prva studija koja se fokusira na istovremenu primjenu mikrovalova i ultrazvuka za ekstrakciju visokovrijednih spojeva iz makroalgi. Kao konačni rezultat dokazano je kako su prinos spojeva i njihova antioksidacijska aktivnost poboljšani korištenjem MAE u usporedbi s UAE metodom. Količine FSP dobivene korištenjem MAE bile su približno 10 puta veće od maksimalnih količina dobivenih korištenjem UAE. Primjenom MAE također su postignuti visoki prinosi ostalih ispitivanih spojeva: ukupnih topivih ugljikohidrata ($3317,39 \pm 54,91$ mg ekvivalenata glukoze/100 g suhe alge) i fenolnih spojeva ($1790,93 \pm 112,11$ mg ekvivalenata galne kiseline/100 g suhe alge). Istovremena primjena ultrazvuka i mikrovalova od strane UMAE poboljšala je prinose ekstrahiranih spojeva u usporedbi s korištenjem samih UAE i MAE, što nije slučaj u ovom diplomskom radu, gdje su najbolji rezultati zabilježeni uz primjenu MAE metode ekstrakcije. Uz to vrsta algi i sezona sakupljanja imaju važnu ulogu kada se uspoređuje ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Stoga su Parys i sur. (2009) utvrdili sezonske varijacije u kvantitativnom i kvalitativnom sadržaju fenolnih spojeva iz alge *A. nodosum*, koji je bio na svom maksimumu u srpnju, dok je u našem istraživanju za smeđu algu *H. scoparia* sadržaj fenolnih spojeva bio najviše izražen tijekom mjeseca svibnja.

Proteklih su godina znanstvena istraživanja usmjerena na pronalaženje važnih bioaktivnih spojeva s antioksidativnim djelovanjem, posebice kad je riječ o prirodnim izvorima kao što su morski organizmi (Corsetto i sur., 2020). Poznato je da su oksidacijski potencijali spojeva u korelaciji s njihovom antioksidativnom aktivnošću, tj. uzorci s manje pozitivnim oksidacijskim potencijalom imaju veću aktivnost hvatanja radikala (Hotta i sur., 2002). Vjerojatno se cijeli biološki potencijal ove alge može povezati s mjesecom kada je ubrana, temperaturom, lokalitetom i reproduktivnim ciklusom. Primjerice, u studiji Novaczek i sur. (1989), za populacije *H. scoparia* s različitih lokacija pokazalo se da imaju različite gornje temperaturne letalne granice i stope rasta, naime kanadski izolati imaju veće stope rasta između 10 i 15 °C, a europski izolati rastu bolje između 15 i 25 °C. Dokazano je da ova alga može rasti na nekoliko temperatura (10, 15 i 20 °C). Novija istraživanja ukazuju da različite vrste algi posjeduju visoku antioksidacijsku aktivnost, premda je moguća promjenjivost rezultata uslijed utjecaja okoliša (stanište algi, blizina uzgajališta, prisutnosti bioaktivnih spojeva), ali i zbog različitih uvjeta i metoda ekstrakcije (Frazzini i sur., 2022).

Prethodno navedeno istraživanje koje su proveli Čagalj i sur. (2022a) na algi *P. pavonica* navodi rezultate gdje je najveća vrijednost TPC-a određena za ekstrakt dobiven od algi ubranih u lipnju. Rezultati su varirali između $11,88 \pm 0,51$ i $26,69 \pm 1,86$ mg GAE/g uz napomenu da TPC može varirati zbog sezonskih varijacija saliniteta, temperature mora i intenziteta svjetlosti, različitih geografskih položaja i bioloških čimbenika (kao što su životni ciklus algi, veličina, starost i prisutnost predatora). Najniži TPC utvrđen je za uzorak iz svibnja. Ukupan sadržaj fenola pokazao je najveće vrijednosti u mjesecu svibnju, a najniže u kolovozu. Antioksidativna aktivnost ekstrakata alge *P. pavonica* mjerena je također metodama FRAP, DPPH i ORAC. Rezultati FRAP-a pokazali su vrijednosti u rasponu od $221,54 \pm 13,41$ do $352,82 \pm 15,41$ $\mu\text{mol TE/L}$. Najveća redukcijska aktivnost zabilježena je u uzorcima iz lipnja, a zatim u uzorcima iz rujna. Naši rezultati provedeni na algi *H. scoparia* najviše vrijednosti pokazali su u mjesecu svibnju, a potom u rujnu. Najniže FRAP vrijednosti nađene su u kolovozu. Ekstrakti *P. pavonica* iz lipnja imali su najveću inhibiciju DPPH i najviše rezultate ORAC. Inhibicija DPPH radikala varirala je od $21,70 \pm 1,34\%$ do $52,51 \pm 2,81\%$. Najniža inhibicija zabilježena je za uzorak iz kolovoza, koji je pokazao dvostruko niže vrijednosti od najvišeg rezultata inhibicije. U ovom diplomskom radu inhibicija DPPH radikala najvišu je razinu dosegla u mjesecu svibnju, dok su najniže vrijednosti dobivene kroz mjesec srpanj. Vrijednosti ORAC bile su u rasponu od $21,81 \pm 0,71$ do $76,45 \pm 1,47$ $\mu\text{mol TE/L}$. Najniža

ORAC vrijednost također je utvrđena u uzorku iz kolovoza. Najviše ORAC vrijednosti za algu *H. scoparia* uočavaju se u svibnju, a najmanje u mjesecu kolovoza.

Čagalj i sur. (2022b) proučavali su učinak sezonskog rasta (od svibnja do rujna) na smeđoj algi *Cystoseira compressa* koja je prikupljena u Srednjem Jadranu. Cilj istraživanja bio je istražiti kemijski sastav alge *C. compressa*, jedne od najrasprostranjenijih algi u Jadranskom moru, ekstrahirane pomoću MAE kako bi se utvrdile promjene u njezinoj antioksidativnoj i antimikrobnoj aktivnosti tijekom sezonskog rasta (svibanj – rujna). Ekstrakti morskih algi ispitani su na ukupni sadržaj fenola (TPC), ukupni sadržaj tanina (TTC) i antioksidacijsku aktivnost mjerenu pomoću FRAP, DPPH i ORAC metoda. Inhibicija DPPH radikala bila je najviša za ekstrakt iz svibnja (90,2%), dok je ekstrakt iz kolovoza imao najmanju inhibiciju (77,3%). Aktivnost ostalih ekstrakata bila je slična, oko 85%. Rezultati su uspoređeni s temperaturom mora i salinitetom kroz sezonu rasta. U vegetacijskoj sezoni temperatura mora bila je najniža u svibnju (18,3 °C) i rasla je svaki mjesec do kolovoza kada je dosegla svoj maksimum (26,9 °C). Konačno, u rujnu je zabilježen pad temperature za 2,2 °C. U ovom istraživanju, rezultati DPPH inhibicije su pokazali sličan trend, najviše vrijednosti zabilježene su također u mjesecu svibnju, dok su najmanje vrijednosti zabilježene u kolovoza. FRAP vrijednosti bile su u rasponu od $1,0 \pm 0,0$ do $2,7 \pm 0,1$ mM TE. Najveći FRAP rezultat dobiven je za lipanj, pokazujući reducirajuću aktivnost od $>2,5$ mM TE što se može usporediti s rezultatima dobivenima u ovom diplomskom radu, gdje su najveće vrijednosti zabilježene tijekom svibnja i lipnja i to za uzorke ekstrahirane MAE metodom. Rezultati ORAC metode pokazali su kako je među istraživanim uzorcima najveća ORAC vrijednost od $72,1 \pm 1,2$ μM TE utvrđena za ekstrakt iz kolovoza, dok su ekstrakti iz svibnja imali drugu najvišu vrijednost. Ekstrakti algi iz lipnja i srpnja imali su najniže ORAC vrijednosti, više od 3 puta niže u odnosu na one iz kolovoza. U ovom radu dobiveni rezultati pokazuju najveće ORAC vrijednosti u svibnju, dok je najniža antioksidacijska sposobnost bila u kolovoza.

Iz navedenih rezultata vidljivo je kako sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost algi ovisi o vrsti algi i o njenom sezonskom rastu. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se dobio odgovor na to utječu li na biološki potencijal alge i razni abiotički čimbenici te da bi se ujedno otkrili i spojevi koji su odgovorni za biološku aktivnost.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata mogu se utvrditi sljedeći zaključci:

- Metoda ekstrakcije uzorka (MAE, UAE i UMAE) ima utjecaj na prinos ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima. Sukladno rezultatima može se zaključiti kako se metoda potpomognuta mikrovalovima istaknula kao najbolja. Ova metoda osigurava ekstrakciju veće količine fenola, a samim time pruža i viši antioksidacijski potencijal uzorka.
- Najveću DPPH vrijednost nakon 60 min imao je ekstrakt alge *H. scoparia* prikupljen u svibnju te pripremljen pomoću MAE.
- Ekstrakti alge *H. scoparia* ubrane u svibnju pokazuju značajno veći antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u usporedbi s ostalim mjesecima tijekom sezone rasta.
- Uporabom ORAC metode izvanredna antioksidacijska svojstva također je pokazala alga prikupljena u svibnju i tretirana MAE metodom.
- Na osnovi svih dobivenih rezultata može se utvrditi kako ekstrakt alge *H. scoparia* prikupljene u mjesecu svibnju pripremljen pomoću MAE metode ima najbolji antioksidacijski potencijal.

6. LITERATURA

- Amerine MA, Ough CS. 1980. Methods for analysis of musts and wines. Wiley & Sons, str. 181-200.
- Angoy A, Valat M, Ginisty P, Sommier A, Goupy P, Veyrat CC, Chemat F. 2018. Development of microwave-assisted dynamic extraction by combination with centrifugal force for polyphenols extraction from lettuce. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 98: 283-290.
- Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. 2013. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138: 2–3.
- Begum R, Howlader S, Mamun-Or-Rashid ANM, Rafiquzzaman SM, Ashraf G, Albadrani GM, Sayed AA, Peluso I, Abdel-Daim MM, Uddin S. 2021. Antioxidant and signal-modulating effects of brown seaweed-derived compounds against oxidative stress-associated pathology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 22 str.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30: 609–615.
- Bordoloi A, Goosen NJ. 2020. A greener alternative using subcritical water extraction to valorize the brown macroalgae *Ecklonia maxima* for bioactive compounds. *Journal of Applied Phycology*, 32: 2307–2319.
- Borlinghaus J, Reiter J, Ries M, Gruhlke CHM. 2020. Screening procedures and tests for antioxidants. Academic Press, str. 389-395.
- Chakraborty K, Maneesh A, Makkar F. 2017. Antioxidant activity of brown seaweeds. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, str. 26
- Cheeseman KH, Slater TF. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3): 481–493.
- Contreras-Guzman ES, Strong FC. 1982. Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 65(5): 1215–1222.

- Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Colombo I, Ingadottir B, Jonsdottir R, Sveinsdottir K, Rizzo AM. 2020. Characterization of antioxidant potential of seaweed extracts for enrichment of convenience food. *Antioxidants*, 9: 249.
- Čagalj M, Fras Zemljič L, Kraševac Glaser T, Mežnar E, Sterniša M, Smole Možina S, Razola-Díaz MDC, Šimat V. 2022a. Seasonal Changes in Chemical Profile and Antioxidant Activity of *Padina pavonica* Extracts and Their Application in the Development of Bioactive Chitosan/PLA Bilayer Film. *Foods*, 11(23): 3847.
- Čagalj M, Skroza D, Razola-Díaz MdC, Verardo V, Bassi D, Frleta R, Generalić Mekinić I, Tabanelli G, Šimat V. 2022b. Variations in the composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Cystoseira compressa* during seasonal growth. *Marine Drugs*, 20(1): 64.
- El-Sheekh MM, Makhlof MEM, EL-Sayed AIM. 2023. *In vitro* antibiofilm, antibacterial, antioxidant, and antitumor activities of the brown alga *Padina pavonica* biomass extract. *International Journal of Environmental Health Research*, 8: 1-18.
- Fenwick D. 2004. APHOTOMARINE. Dostupno sa: https://www.aphotomarine.com/brown_seaweed_halopteris_scoparia.html, pristupljeno: srpanj, 2023.
- Flanjak I, Primorac Lj, Kenjeric D, Bilić B. 2013. Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of everlasting (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) honey. U Zbornik sažetaka 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma. Poljoprivredni fakultet Osijek, str. 261.
- Ford L, Theodoridou K, Sheldrake G, Walsh P. 2019. A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 30: 1–13.
- Frazzini S, Scaglia E, Dell'Anno M, Reggi S, Panseri S, Giromini C, Lanzoni D, Sgoifo Rossi CA, Rossi L. 2022. Antioxidant and antimicrobial activity of algal and cyanobacterial extracts. An *in vitro* study. *Antioxidants*, 11(5): 992.
- Freitas R, Martins A, Silva J, Alves C, Pinteus S, Alves J, Teodoro F, Ribeiro HM, Gonçalves L, Petrovski Ž. 2020. Highlighting the biological potential of the brown seaweed *Fucus spiralis* for skin applications. *Antioxidants*, 9(7): 611.
- Gadow AV, Joubert E, Hansmann CF. 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60(1): 73-77.

- Galasso C, Gentile A, Orefice I, Ianora A, Bruno A, Noonan DM, Sansone C, Albin A, Brunet C. 2019. microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: a focus on cancer prevention and interception. *Nutrients*, 11(6): 1226.
- Garcia-Vaquero M, Rajauria G, Miranda M, Sweeney T, Lopez-Alonso M, O'Doherty J. 2021. Seasonal variation of the proximate composition, mineral content, fatty acid profiles and other phytochemical constituents of selected brown macroalgae. *Marine Drugs*, 19 (4): 204.
- Garcia-Vaquero M, Ummat V, Tiwari B, Rajauria G. 2020. Exploring ultrasound, microwave and ultrasound–microwave assisted extraction technologies to increase the extraction of bioactive compounds and antioxidants from brown macroalgae. *Marine Drugs*, 18(3): 172.
- Garrett AR, Murray KB, Robison RA, O'Neill KL. 2010. Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. *Methods in Molecular Biology*, 594: 251–262.
- Generalić Mekinić I, Skroza D, Šimat V, Hamed I, Čagalj M, Popović Perković Z. 2019. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, 9: 244.
- Gómez-Guzmán M, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Gálvez J. 2018. Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorders. *Marine Drugs*, 16(8): 250.
- Guiry GM. *AlgaeBase. Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau 1904. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; pristupljeno: kolovoz, 2023.
- Güner A, Nalbantsoy A, Sukatar A, Karabay Yavaşoğlu NÜ. 2019. Apoptosis inducing activities of *Halopteris scoparia* L. Sauvageau (brown algae) on cancer cells and its biosafety and antioxidant properties. *Cytotechnology*, 71(3): 687-704.
- Gupta S, Abu-Ghannam N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6): 315-326.
- Hadj Ammar H, Lajili S, Ben Said R, Le Cerf D, Bouraoui A, Majdoub H. 2015. Physicochemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1): 1.
- Hegerman AE, Riedl KM, Jones G, Sovik KN, Rechard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1887–1892.

- Holdt SL, Kraan S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23: 543–597.
- Holdt SL, Getachew AT, Jacobsen C. 2020. emerging technologies for the extraction of marine phenolics: opportunities and challenges. *Marine Drugs*, 18(8): 389.
- Hotta H, Nagano S, Ueda M, Tsujino Y, Koyama J, Osakai T. 2002. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572(1): 123-32.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-56.
- Jimenez-Lopez C, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, Garcia-Oliveira P, Cassani L, Fraga-Corral M, Prieto MA, Simal-Gandara J. 2021. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chemistry*, 341(2).
- Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP. 2014. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1): 24-31.
- Kahl R, Kappus H. 1993. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 329 str.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41-60.
- Kedare Sagar B, Singh RKP. 2011. “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48: 412-422.
- Kim SK, Pangestuti R. 2011. Biological activities and potential health benefits of fucoxanthin derived from marine brown algae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 64: 111-28.
- Kolanjinathan K, Ganesh P, Saranra P. 2014. Pharmacological importance of seaweeds. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6(1): 01-15.
- Kolet M, Zerbib D, Nakonechny F, Nisnevitch M. 2020. Production of biodiesel from brown grease. *Catalysts*, 10(10): 1189.
- Lawson GW, John DM. 1982. The marine algae and coastal environment of tropical West Africa. *Beih Nova Hedwigia*, 27: 1–455.

- Leandro A, Pereira L, Gonçalves AMM. 2019. Diverse applications of marine macroalgae. *Marine Drugs*, 18(1): 17.
- Li Y, Fu X, Duan D, Liu X, Xu J, Gao X. 2017. Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine drugs*, 15(2): 49.
- Li YX, Kim SK. 2011. Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: an overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(6): 1461–1466.
- Lin H, Decuypere E, Buyse J. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(1): 11-17.
- Lou Z, Wang H, Zhu S, Chen S, Zhang M, Wang Z. 2012. Ionic liquids based simultaneous ultrasonic and microwave assisted extraction of phenolic compounds from burdock leaves. *Analytica Chimica Acta*, 716: 28-33.
- Mahdi AA, Rashed MMA, Al-Ansi W. 2019. Enhancing bio-recovery of bioactive compounds extracted from *Citrus medica L. Var. sarcodactylis*: optimization performance of integrated of pulsed-ultrasonic/microwave technique. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13: 1661–1673.
- Matos GS, Pereira SG, Genisheva ZA, Gomes AM, Teixeira JA, Rocha CMR. 2021. Advances in extraction methods to recover added-value compounds from seaweeds: sustainability and functionality. *Foods*: 10(3): 516.
- Mena F, Wijesinghe U, Thiripuranathar G, Althobaiti NA, Albalawi AE, Khan BA. 2021. Marine algae-derived bioactive compounds: a new wave of nanodrugs. *Marine drugs*, 19(9): 484.
- Nesic A, De Bonis MV, Dal Poggetto G, Ruocco G, Santagata G. 2023. Microwave assisted extraction of raw alginate as a sustainable and cost-effective method to treat beach-accumulated *Sargassum* algae. *Polymers*, 15(14): 2979.
- Novaczek I, Breeman AM, van den Hoek C. 1989. Thermal tolerance of *Stypocaulon scoparium* (Phaeophyta, Sphacelariales) from eastern and western shores of the North Atlantic Ocean. *HelgolMeeresunters*, 43: 183–193.
- Parys S, Kehraus S, Pete R, Küpper FC., Glombitza KW., König GM. 2009. Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *The European Journal of Phycology*, 44: 331–338.
- Prakash A. 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19:2.

- Perera CO, Al-Zahrani M. 2022. Health Benefits of Seaweeds. *Sustainable Global Resources of Seaweeds*, 2: 351- 367.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10): 4290-302.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11): 3273-9.
- Prior RL. 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods 18 Part B*: 797-810.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3396-402.
- Remya RR, Samrot AV, Kumar SS, Mohanavel V, Karthick A, Kumar Chinnaiyan V. 2022. Bioactive Potential of Brown Algae. *Adsorption Science & Technology*, 13 str.
- Sadeghi A, Hakimzadeh V, Karimifar B. 2017. Microwave assisted extraction of bioactive compounds from food. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 7(1): 19-27.
- Salgado LT, Tomazetto R, Cinelli LP, Farina M, Filho GMA. 2007. The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption in vitro. *Brazilian Journal of Oceanography*, 55(2): 155-161.
- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry*, 85(3): 439-444.
- Sies H. 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie*, 25(12), 1058-1071.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 144-158.
- Shahidi F, Naczk M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press, London/New York/Washington D.C, 1-9: str. 146-152 i 270-281.
- Van Den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press Cambridge, 623 str.

- Van Reine WF. A taxonomic revision of the European Sphacelariaceae (*Sphacelariales*, *Phaeophyceae*). 1982. Leiden Botanical Series 6. Leiden University Press, Leiden.
- Wang F, Wang X, Liu X, Hou Y, Zhang Q. 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 82(1): 118–121.
- Wang L, Oh JY, Hwang J, Ko JY, Jeon Y-J, Ryu B. 2019. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of polysaccharides isolated from celluclast-assisted extract of an edible brown seaweed, *Sargassum fulvellum*. *Antioxidants*, 8(10): 493.
- Wang Y, Xu Z, Bach SJ, McAllister TA. 2008. Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*, 145 (1–4): 375–395.
- Wayne TF, Saha SP, Mukherjee D. 2016. Antioxidants in the practice of medicine; What should the clinician know? *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 6(1): 13-20.
- Wilson DW, Nash P, Buttar HS, Griffiths K, Singh R, De Meester F, Horiuchi R, Takahashi T. 2017. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: an overview. *Antioxidants*, 6(4): 81.
- Wojtunik-Kulesza KA. 2020. Approach to optimization of FRAP methodology for studies based on selected monoterpenes. *Molecules*, 25(22): 5267.
- Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186.
- Zhang YM, Chen H, He CL, Wang Q. 2013. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PLOS ONE*, 16: 8(7): e69225.