

# Izolacija bioaktivnih spojeva smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

---

Jankov, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:880061>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Lea Jankov

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH  
SPOJEVA SMEĐE ALGE *Halopteris*  
*scoparia* PRIMJENOM  
EKSTRAKCIJE  
POTPOMOGNUTE  
MIKROVALOVIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Sandra Pedisić te uz pomoć dr.sc. Zrinke Čošić.



Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta „BioProspecting Jadranskog mora“ (KK.01.1.1.01.0002; Kohezijski fond, KK.01.1.1.01) unutar Znanstvenog Centra Izvrsnosti za Bioprospecting. Voditeljica projekta dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Sandra Pedisić na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima, pristupačnosti te uloženom vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, veliko hvala dr.sc. Zrinki Čošić i Patriciji Čulina mag. ing. techn. aliment. na velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, prenesenom znanju, korisnim savjetima i dostupnosti u svakom trenutku izrade ovog rada.*

*Posebno hvala mojim roditeljima i sestri na pruženoj podršci, razumijevanju i vjeri u mene tijekom cijelog školovanja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

## IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA SMEĐE ALGE *Halopteris scoparia* PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA

*Lea Jankov*, univ. bacc. nutr.

0058211858

**Sažetak:** Cilj rada je bio ispitati utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE): temperatura (10, 25 i 40 °C), vrijeme (5, 15 i 25 min) i snaga mikrovalova (150, 300 i 450 W) na sadržaj ukupnih klorofila a (13,04 do 20,01 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) i klorofila b (6,83 do 10,83 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), karotenoida (3,90 do 6,90 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) i fenola (31,85 do 240,09 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) određenih spektrofotometrijskim metodama. Na udio analiziranih spojeva statistički značajno utječe vrijeme ekstrakcije, a optimalni uvjeti MAE su: temperatura 25 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije od 25 minuta. U ekstraktu ekstrahiranom pri optimalnim uvjetima MAE najzastupljeniji spojevi određeni HPLC-UV/VIS PDA metodom su bili klorofil a (223,72 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), derivat luteina (141,59 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) i klorofil b (126,24 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.). Antioksidacijska aktivnost je iznosila 2393,57 ± 2,53 μmol Trolox 100 g<sup>-1</sup> s.tv.

**Ključne riječi:** *antioksidacijska aktivnost, biljni pigmenti, MAE, smeđa alga Halopteris scoparia, ukupni fenoli*

**Rad sadrži:** 50 stranica, 5 slika, 12 tablica, 65 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc.dr.sc. Sandra Pedisić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Zoran Zorić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Sandra Pedisić (mentor)
3. doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

**Datum obrane:** 14. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF BROWN ALGAE *Halopteris scoparia* USING  
MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION

*Lea Jankov*, univ. bacc. nutr.

0058211858

**Abstract:** The aim of the study was to determine the influence of microwave extraction (MAE) parameters: temperature (10, 25 and 40 °C), time (5, 15 and 25 min) and microwave power (150, 300 and 450 W) on the content of total chlorophyll a (13.04 - 20.01 mg 100 g<sup>-1</sup> dw) and chlorophyll b (6.83 - 10.83 mg 100 g<sup>-1</sup> dw), carotenoids (3.90 - 6.90 mg 100 g<sup>-1</sup> dw) and phenols (31.85 - 240.09 mg 100 g<sup>-1</sup> dw) determined spectrophotometrically. The content of compounds was statistically significantly affected by extraction time. The optimal MAE conditions were 25 °C/300 W/25 minutes. In the extract extracted under optimal MAE conditions the most abundant compounds determined by HPLC-UV/VIS PDA were chlorophyll a (223.72 mg 100 g<sup>-1</sup> dw), lutein derivative (141.59 mg 100 g<sup>-1</sup> dw) and chlorophyll b (126, 24 mg 100 g<sup>-1</sup> dw). The antioxidant activity was 2393.57 ± 2.53 μmol Trolox 100 g<sup>-1</sup> dw.

**Keywords:** *antioxidant activity, plant pigments, MAE, brown algae Halopteris scoparia, total phenols*

**Thesis contains:** 50 pages, 5 figures, 12 tables, 65 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD Sandra Pedisić, assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD Zrinka Čošić

### Reviewers:

1. Zoran Zorić, PhD, Assistant professor (president)
2. Sandra Pedisić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ivona Elez Garofulić, PhD, Assistant professor (member)
4. Sandra Albino, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 14<sup>th</sup>, 2022



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. SMEĐE ALGE.....	2
2.1.1. Primjena makroalgi u proizvodnji i značaj u prehrani .....	3
2.1.2. <i>Halopteris scoparia</i> .....	5
2.1.3. Bioaktivni spojevi smeđih algi .....	6
2.1.3.1. Pigmenti .....	7
2.1.3.1.1. Klorofili.....	7
2.1.3.1.2. Karotenoidi.....	8
2.1.3.2. Fenolni spojevi.....	10
2.1.4. Antioksidacijska aktivnost biološki aktivnih spojeva .....	12
2.2. METODE EKSTRAKCIJE.....	13
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	13
2.2.1.1. Utjecaj otapala .....	14
2.2.1.2. Utjecaj vremena .....	14
2.2.1.3. Utjecaj temperature.....	14
2.2.1.4. Utjecaj snage mikrovalova.....	15
2.3. ODREĐIVANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM SPEKTROFOTOMETRIJSKIH I KROMATOGRFSKIH METODA.....	15
2.3.1. Spektrofotometrijske metode.....	15
2.3.2. Kromatografske metode .....	15
2.3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
3.1. MATERIJALI .....	17
3.1.1. Uzorak .....	17
3.2. METODE RADA.....	17
3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva smeđe alge <i>Halopteris scoparia</i> primjenom ekstrakcije mikrovalovima .....	17
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela pigmenata.....	20
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocaleauovom metodom .....	21
3.2.4. Određivanje pojedinačnih klorofila i karotenoida primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju.....	24

3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom .....	26
3.2.6. Statistička obrada rezultata .....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
4.1. BIOAKTIVNI SPOJEVI SMEĐE ALGE <i>Halopteris scoparia</i> .....	29
4.1.1. Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na maseni udio pigmenata smeđe alge <i>Halopteris scoparia</i> .....	30
4.1.2. Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na maseni udio ukupnih fenolnih spojeva smeđe alge <i>Halopteris scoparia</i> .....	35
4.2. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA SMEĐE ALGE <i>Halopteris scoparia</i> .....	38
4.2.1. HPLC- UV/VIS PDA određivanje pojedinačnih klorofila i karotenoida u ekstraktu smeđe alge <i>Halopteris scoparia</i> dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije .....	39
4.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u ekstraktu smeđe alge <i>Halopteris scoparia</i> dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije .....	41
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>43</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

# 1. UVOD

Morskim algama se u zadnje vrijeme pridaje velika pozornost uglavnom zbog njihovog nutritivnog i ljekovitog potencijala. Od davnina, morske alge su se koristile za hranu u zemljama Istočnog svijeta, u farmaciji i medicini te u kozmetičkoj industriji jer su bogate bioaktivnim spojevima.

*Halopteris scoparia* je smeđa alga koja ima visoki biološki potencijal. Pripada obitelji *Styopocaulacea* (Güner i sur., 2019). Bogata je bioaktivnim spojevima kao što su ugljikohidrati, proteini, minerali, višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA), masne kiseline, amini, amidi, antioksidansi i pigmenti kao što su karotenoidi, klorofili, ksantofili i fikobilini (Mena i sur., 2021). Tradicionalno se primjenjivala za liječenje želučanih tegoba, astme, glavobolje, hipotireoze, celulita, kašlja i umora. Dosadašnjim istraživanjima je dokazano da ima antioksidativno, antitumorsko, protuupalno, antibakterijsko i antikoagulantno djelovanje, što se pripisuje prisustvu bioaktivnih spojeva. Dokazano je da se može koristiti i u njezi kože jer djeluje protiv stvaranja bora (Remya i sur., 2022; Hadj Ammar i sur., 2015).

U ovom radu, prilikom izolacije bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi i pigmenti) korištena je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) koja spada u novije, nekonvencionalne metode ekstrakcije. Nekonvencionalne metode su danas sve više u upotrebi jer pokazuju brojne prednosti nad konvencionalnim metodama. Imaju veću ekološku prihvatljivost jer je potrebna manja količina otapala i imaju kraće vrijeme ekstrakcije, zato što se primjenom mikrovalova zagrijavanje postiže puno brže (Cikoš i sur., 2018). MAE se temelji na djelovanju elektromagnetskog polja prilikom čega se energija uz pomoć mikrovalova prenosi na materijal kroz molekulske interakcije, pri čemu dolazi do razaranja biljne stanice i izdvajanja staničnog sadržaja u otapalo (Kapoores i sur., 2018; Kadam i sur., 2013).

Cilj ovog rada je ispitati učinkovitost MAE pri izolaciji bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi, klorofili i karotenoidi) iz smeđe alge *Halopteris scoparia* te odrediti antioksidacijsku aktivnost uz primjenu 96 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala. Kako bi se dobili što veći konačni prinosi ekstrakcije, svrha rada je odrediti optimalne parametre ekstrakcije pri čemu je ispitan utjecaj temperature (10, 25 i 40 °C), vremena ekstrakcije (5, 15 i 25 min) i snage mikrovalova (150, 300 i 450 W). U dobivenim ekstraktima, ukupni i pojedinačni maseni udjeli bioaktivnih spojeva određeni su spektrofotometrijski i HPLC metodom, a antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH metode.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. SMEĐE ALGE

Alge su najveća primitivna fotoautotrofna skupina eukariota, koje obavljaju više od 50 % fotosinteze na planetu. Klasificirane su prvenstveno na temelju njihovih morfoloških značajki, bilo kao mikroalge (tj. jednostanične, kao što su na primjer dijatomeje, i višestanične) ili kao makroalge (ponekad se nazivaju i morskim algama) (Menaar i sur., 2021). Makroalge su eukariotski organizmi koji žive u slanoj ili slatkoj vodi, a smatra se da su mogući izvor bioaktivnih spojeva. Za razliku od većine kopnenih biljaka, makroalge nemaju korijenje, lišće i žilni sustav te se hrane procesom osmoze (Remya i sur., 2022).

Morske alge klasificirane su u tri velike različite skupine na temelju oblika i prisutnosti specifičnih pigmenata, a to su smeđe (*Phaeophyta/Phaeophyceae*), zelene (*Chlorophyta/Chlorophyceae*) i crvene alge (*Rhodophyta/Rhodophyceae*) (Remya i sur., 2022; Menaar i sur., 2021).

Smeđe alge (*Phaeophyceae; Phaeophyta*) su višestanični organizmi razvrstani u šest redova: *Ectocarpales*, *Cutleriales*, *Sphacelariales*, *Dictyotales*, *Laminariales* i *Fucales* (Wehr, 2015), a koje oblikom mogu varirati od malih filamentoznih oblika do velikih, složenih morskih algi (Slika 1). Po obliku su nitaste, vrpčaste, kožasto-lepezaste, vrpčasto spljoštene i dihotski razgranate ili raščlanjene poput tijela viših biljaka (*Anonymus 1*) te mogu narasti do duljine više od 45 metara (Kadam i sur., 2013). Od procijenjenih 1836 vrsta u približno 285 rodova, manje od 1 %, nalazi se u slatkovodnim staništima, dok većina živi u hladnijim morima. Neke su prilagođene životu u bočatim vodama (Wehr, 2015), no većina smeđih algi nalazi se uz morsku obalu (Remya i sur., 2022).

Smeđe alge, poznate još i kao feofiti, su raznolika klasa algi poznatih po svojoj boji, u rasponu od maslinastozelene do zlatno-smeđe boje (Remya i sur., 2022; Wehr, 2015). To je zato što njihovi kromatofori (feoplasti) sadrže zlatno-smeđi ksantofilni pigment fukoksantin, koji maskira druge pigmente u feofitima, što rezultira karakterističnom smeđom bojom. Zbog velikih količina fukoksantina i karotenoida prekriveni su ostali pigmenti, poput klorofila a i c, beta-karotena i drugih ksantofila (Remya i sur., 2022). Razmnožavanje smeđih algi može biti vegetativno te spolno i nespolno. Većina vrsta ima izmjenu haploidnih i diploidnih generacija, koje mogu biti izomorfne ili heteromorfne (Wehr, 2015).



**Slika 1.** Smeđa alga (prema [Anonymus 2](#))

Smeđe makroalge obiluju mineralnim tvarima u rasponu od 14 do 35 % suhe tvari (s.tv.), a bogate su natrijem (2,2-4 %), kalijem (3-3,8 %) i jodom (0,1-1,1 %) Imaju relativno nisku razinu ukupnih proteina, od 8 do 13 %. Mnoge vrste morskih algi imaju veliku količinu slobodne glutaminske kiseline, koja je odgovorna za *umami* okus koji obilježava japanska jela i koristi se kao pojačivač okusa u hrani. Sastav minerala i aminokiselina varira ovisno o različitim značajkama kao na primjer o godišnjem dobu kada su uzgojene. Morska alga *M. pyrifera* koja raste uz meksičku obalu sadrži više aminokiselina i minerala ljeti nego zimi (Remya i sur., 2022). Također morske alge obiluju vitaminima,  $\beta$ -karotenom i ne sadrže antinutrijente (Remya i sur., 2022). Stanična stijenka je izgrađena od alginske kiseline i celuloze. Fukoidani čine stanične stijenke mnogih smeđih makroalgi, posebno *Laminariales* i *Fucales*, a sastoje se od polisaharidnih jedinica s različitim stupnjem sulfatacije (Remya i sur., 2022). Za razliku od ostalih morskih algi u kojima se ugljikohidrati skladište u obliku škroba, smeđe morske alge pohranjuju ugljikohidrate u obliku laminarina, polisaharida glukoze, koji čini od 32 do 35 % s.tv. ukupnih polisaharida. Laminarini su glukani koji imaju linearne polisaharide, sastavljene od  $\beta$ -glukoze u omjeru 3 : 1 s nasumičnim  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) grananjem unutar lanca, a pokazuju mnoge biološke aktivnosti kao na primjer antitumorske, protuupalne, antikoagulantne i antioksidativne aktivnosti te smanjuju apoptozu stanica (Remya i sur., 2022).

### 2.1.1. Primjena makroalgi u proizvodnji i značaj u prehrani

Od davnina ljudi na Istoku su morske alge smatrali delicijom, a u 20. stoljeću počinje procvat industrije makroalgi. Poznato je da jestive makroalge imaju veliku nutritivnu vrijednost na koju može utjecati zemljopisni položaj, faza rasta i godišnje doba. Poznate su kao

niskokalorična hrana, bogata vitaminima i mineralnim tvarima. Iako konzumacija makroalgi nije toliko raširena u Europi kao u Aziji, one sve više privlače pozornost jer su zbog svog sadržaja bioaktivnih spojeva stekle reputaciju nove *superhrane*. Najviše se konzumiraju smeđe (66,5 %), zatim crvene (33 %) i zelene (5 %) alge (Cikoš i sur., 2020).

Istraživanja su pokazala da makroalge imaju veći udio dijetalnih vlakana (*Grateloupia filicina*, *Chondrus crispus*, *Ulva lactuca*) od biljaka, što može pridonijeti općem zdravlju ljudi. Dijetalna vlakna potiču rast korisnih crijevnih bakterija, smanjuju rizik od dijabetesa, pretilosti i hiperkolesterolemije zbog svoje sposobnosti apsorpcije organskih spojeva poput glukoze i kolesterola (Cai i sur., 2021; Cikoš i sur., 2020). Makroalge se mogu koristiti kao alternativa biljnim izvorima bjelanjčevina (kao npr. crvene alge *Pyropia tenera* i *Grateloupia filicina*), kao i za formiranje uravnotežene proteinske prehrane zbog prisutnosti visokog sadržaja bjelanjčevina, sličnih onima u mahunarkama kao što su grašak i grah, a uz niske troškove. Iako je mala količina ukupnih lipida prisutna u makroalgama, njihov je sastav od posebnog interesa s nutricionističkog stajališta zbog prisutnosti  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) koje imaju pozitivno djelovanje na kardiovaskularno zdravlje, jer smanjuju razvoj ateroskleroze. Utvrđeno je da pepeo jestivih makroalgi sadrži veći udio makro- i mikroelemenata nego što je to kod drugih jestivih biljaka u kojima su količine Na, K, Ca i Mg u rasponu od 8,08 do 17,88 mg 100 g<sup>-1</sup>, a Fe, Zn, Mn i Cu u rasponu od 5,10 do 15,20 mg 100 g<sup>-1</sup>. Zbog toga se smeđe i crvene makroalge mogu koristiti kao dodaci prehrani za postizanje preporučenog dnevnog unosa mineralnih tvari i elemenata u tragovima (Cikoš i sur., 2020).

Smeđe morske alge prvenstveno se koriste za liječenje želučanih tegoba, astme, glavobolje, hipotireoze, celulita, kašlja i umora. Osim što pomažu u njezi kože i smanjuju stvaranje bora, smeđe alge također olakšavaju mršavljenje. Potencijalni antioksidativni metaboliti u smeđim morskim algama su laminarini, fukoidani i polifenoli (Remya i sur., 2022; Hadj Ammar i sur., 2015). Prisutni su u mnogim biljkama i morskim algama te su dobro poznati po svom antioksidativnom djelovanju zbog uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i inhibicije peroksidacije lipida (Remya i sur., 2022).

Bioaktivni spojevi laminarini, koji se također nazivaju laminarani ili leukozini, pripadaju obitelji glukana i služe kao rezervni metaboliti u smeđim algama (Afonso i sur., 2019). Laminarin je polisaharid niske molekularne mase odnosno  $\beta$ -glukan, koji se sastoji od (1,3)- $\beta$ -d-glukana i nekih  $\beta$ -(1,6)-intralančanih veza. Udio laminarina iz smeđih algi je do 35 % s.tv., što varira ovisno o vrsti, sezoni berbe, staništu i načinu vađenja (Kadam i sur., 2014). Laminarin doprinosi unosu prehrambenih vlakana te ima važnu ulogu u prevenciji raka debelog

crijeva (Délérís i sur., 2016). Također laminarin pokazuje antitumorsko, antiapoptotičko, protuupalno, antikoagulantno i antioksidativno djelovanje (Kadam i sur., 2014). Fukoidani su sulfatirani polisaharidi, kojih nema u kopnenim biljkama (Remya i sur., 2022; Hadj Ammar i sur., 2015), a sadrže značajnu količinu sulfatiranih esterskih i L-fukoznih skupina (Remya i sur., 2022). Predmet su velikog interesa posljednjih godina, uglavnom zbog njihovog farmakološkog i biološkog potencijala s antivirusnim, antikancerogenim, hepato-protektivnim, anti-upalnim i antibakterijskim svojstvima, a također mogu utjecati na izlučivanje proteina ekstracelularnog matriksa i aktivirati apoptozu (Hadj Ammar i sur., 2015).

Kultivirane smeđe morske alge uglavnom se koriste kao ljudska hrana (npr. *kombu* juha i *wakame* salate) (Cai i sur., 2021). Hidrokolodi algi, poput karagenana, alginske kiseline i agara su važni u prehrambenoj industriji. To su glavni sastojci staničnih stijenki crvenih i smeđih algi koji se naširoko koriste u nekoliko prehrambenih industrija (Leandro i sur., 2019). Koriste se u prehrambenoj industriji kao zgušnjivači, emulgatori za umake, stabilizatori, preljeve i pekmeze, a za želiranje ne treba toplinu (Leandro i sur., 2019).

Dodatno, ekstrakti morskih algi, kao što su jod, fukoidan, fukoksantin i florotanini, koriste se kao dodaci prehrani za zdravstvene dobrobiti. Smeđe alge također se koriste za proizvodnju stočne hrane, za biognojivo ili biostimulanse, farmaceutske ili nutricionističke proizvode i za izradu kompostabilne biološke ambalaže (Cai i sur., 2021).

### 2.1.2. *Halopteris scoparia*

Smeđa alga *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau (1904) pripada obitelji *Stypocaulacea* iz razreda *Phaeophyceae* (Güner i sur., 2019) (Slika 2). Ranije je bila poznata kao *Stypocaulon scoparium*. Često se nalazi u toplim i hladnim morima diljem Europe. Prisutna je u širokom temperaturnom rasponu od 2 do 16 °C na Baltiku (njena sjeverna granica distribucije) te od 24 do 28 °C u Nigeriji (njena južna granica distribucije). Vrsta je općenito rasprostranjena u Atlantskom oceanu i prisutna je tijekom cijele godine u kontinentalnom dijelu Portugala i na arhipelagima Açores, Madeira i Kanari (Patarra i sur., 2017).

Ima približnu visinu od 15 centimetara, a talus, koji je pričvršćen za stijene, tvori krute i razgranate filamente. *Halopteris scoparia* je jedna od vrsti algi s visokim biološkim sadržajem, posebno dokazanom antimikrobnom i antifungalnom djelotvornošću (Güner i sur., 2019). Klasifikacija smeđe alge *Halopteris scoparia* prikazana je u tablici 1.



**Slika 2.** Smeđa alga *Halopteris scoparia* (vlastita fotografija)

**Tablica 1.** Klasifikacija smeđe alge *Halopteris scoparia* (prema Anonymus 3)

<b>Domena</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Carstvo</b>	<i>Chromista</i>
<b>Koljeno</b>	<i>Ochrophyta</i>
<b>Razred</b>	<i>Phaeophyceae</i>
<b>Red</b>	<i>Sphacelariales</i>
<b>Obitelj</b>	<i>Stypocaulaceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Halopteris</i>
<b>Vrsta</b>	<i>Halopteris scoparia</i>

Studija koju su preveli Güner i sur. (2019) godine dokazala je da *Halopteris scoparia* sadrži antioksidativne citokine, polifenole i betaine za potencijalnu primjenu kao preventivno sredstvo u borbi protiv humanog karcinoma. Osim što se ova alga koristi u farmaceutske svrhe, može se koristiti i u prehrambene svrhe (Güner, 2019).

### 2.1.3. Bioaktivni spojevi smeđih algi

Kemijski sastav makroalgi ima velike varijacije ovisno o različitim čimbenicima, kao što su vrsta, geografsko područje, sezonske varijacije i drugi okolišni čimbenici (Silva i sur., 2021). Morske alge bogate su bioaktivnim spojevima kao što su ugljikohidrati, proteini, minerali, višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA), masne kiseline, amini, amidi, antioksidansi (npr. polifenoli, tokoferoli) i pigmenti kao što su karotenoidi, klorofili, ksantofili i fikobilini (Menea i sur., 2021). Makroalge koriste svjetlost kao izvor energije, a pigmenti



igraju ključnu ulogu u prikupljanju sunčeve energije. Ovi pigmenti apsorbiraju svjetlost iz vidljivog spektra. Karotenoidi su narančasti/crveni pigmenti koji apsorbiraju svjetlosnu energiju, a zatim je prenose na klorofil, te stoga imaju sekundarnu ulogu u fotosintezi. Karotenoidi povećavaju potencijal algi za prikupljanje svjetlosti. Postoje promjene u sadržaju klorofila i karotenoida u morskim algama ovisno o razinama ultraljubičastog zračenja (UV) tijekom cijele godine. Klorofilni i karotenoidni pigmenti posjeduju antioksidativna i kemo-preventivna svojstva, a glavni pigmenti algi kao što su beta-karoten, astaksantin, lutein, fikocijanin, klorofil i fukoksantin koriste se u komercijalne svrhe (Biris-Dorhoi i sur., 2020).

#### *2.1.3.1. Pigmenti*

Pigmenti su kemijski spojevi koji apsorbiraju svjetlost u području valnih duljina vidljivog spektra (od 380 nm do 780 nm). Proizvedena boja ovisi o specifičnoj strukturi (kromofor); ova struktura hvata energiju i uzrokuje pobuđivanje valentnih elektrona i njihov prijelaz u više energetske nivoe. Neapsorbirana energija se reflektira i/ili lomi i vidljiva je oku, a generirani živčani impulsi se prenose u mozak gdje se interpretiraju kao boja (Delgado-Vargas i sur., 2000). Pigmenti se prema podrijetlu mogu klasificirati kao prirodni, sintetski i anorganski te se mogu klasificirati uzimajući u obzir kemijsku strukturu kromofora kao: kromofori s konjugiranim sustavima (karotenoidi, antocijanini, betalaini i sintetski pigmenti) i metalno koordinirani porfirini (mioglobin, klorofil i njegovi derivati) (Delgado-Vargas i sur., 2000).

##### *2.1.3.1.1. Klorofili*

Klorofili su temeljni pigmenti u biljkama, algama i cijanobakterijama, topivi u lipidima koji daju karakterističnu zelenkastu boju. Sadrže porfirinski prsten sa središnjim, magnezijevim ionom, koji ima funkcionalnu ulogu u procesu fotosinteze algi, ali i zaštitnu ulogu osiguravajući integritet tkiva algi od oksidativnog stresa koji može biti uzrokovan prekomjernim UV zračenjem (Mena i sur., 2021). Klorofili se mogu podijeliti u četiri skupine: klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *c* i klorofil *d* (Mena i sur., 2021). Klorofil *a* sadrži metilnu skupinu na prstenu, a klorofil *b* na istom ugljikovom atomu na prstenu ima aldehidnu skupinu.

U kopnenim biljkama i smeđim algama dominira klorofil *a*, dok se klorofil *b* uglavnom nalazi u zelenim algama. Osim toga, smeđe alge se smatraju glavnim izvorom klorofila *c*, dok je klorofil *d* specifičan za crvene alge. Poznato je da u prerađenoj biljnoj hrani i nakon ljudske konzumacije klorofil prisutan u obliku feofitina, pirofeofitina i feoforbida. Ovi derivati klorofila pokazuju antioksidativno i antimutageno djelovanje i mogu imati značajnu ulogu u prevenciji raka. Osim bioloških aktivnosti i zdravstvenih učinaka različitih katabolita klorofila,

alge se mogu smatrati i alternativom za zamjenu sintetski proizvedenih pigmenata koji se koriste u prehrambenoj industriji (Biris-Dorhoi i sur., 2020).

**Klorofil *a*** nalazi se u gotovo svim fotosintetskim organizmima, tj. biljkama, algama, cijanobakterijama i vodenim vrstama. Prije se zvao klorofil  $\alpha$ . Nalazi se u svim kompleksima za prikupljanje svjetlosti (LHC) i u oba reakcijska centra (RC) u organizmima, fotosustavu I (PS I) i fotosustavu II (PS II). Upija uglavnom crvenu svjetlost iz sunčevog spektra; apsorpcijski vrh bilježi na 420 nm i 660 nm u organskim otapalima te na 453 nm i 670-480 nm u fotosintetskim stanicama (*in vivo*). Djeluje kao primarni donor u RC PS I i PS II. Dvije vrste klorofila *a*, Ca 670 i Ca 680, su odgovorne za apsorpciju različitih valnih duljina iz svjetlosnog spektra (Sunil i sur., 2017).

**Klorofil *b*** nalazi se u zelenim algama, ali i u višim biljkama. Pomaže klorofilu *a* u fotosintezi apsorbirajući svjetlosnu energiju, a smatra se da je njegova glavna funkcija povećanje prikupljanja svjetla u uvjetima slabog osvjetljenja. Predloženo je da klorofil *b* sudjeluje u prilagodbi na dugotrajne (nekoliko dana) promjene svjetlosnih uvjeta kod viših biljaka koje rastu u sjeni. Ovaj pigment ima žutu boju u svom prirodnom stanju, ali apsorbira plavo svjetlo iz cijelog sunčevog spektra, što je korisno za fotosintezu u dubokoj vodi gdje je izvor sunčeve svjetlosti ograničen (Kume i sur., 2018; Sunil i sur., 2017; Tyutereva i sur., 2014). Za klorofil *b* karakteristični pik apsorpcije primijećen je na 453 nm i 625 nm *in vitro* te na 480 nm i 650 nm *in vivo* (Sunil i sur., 2017).

**Klorofil *c*** je pigment smeđe-zlatne boje koji prati klorofil *a* u procesu fotosinteze kao pomoćni pigment. Ima tri podklase, nazvane klorofil *c1*, *c2* i *c3*, koje su pronađene u raznim algama. Ovaj pigment je široko asimiliran u različitim morskim organizmima kao što su dijatomeje, smeđe alge i druge morske alge. Apsorpcijski vrh klorofila *c* za fotosintetski spektar dobiven je pri 445 nm i 625 nm u organskim otapalima i 645 nm *in vivo* (Sunil i sur., 2017).

**Klorofil *d*** je manji klorofil koji je identificiran u crvenim algama. Hvata krajnji crveni dio spektra sunčeve svjetlosti. Apsorpcijski spektri dobiveni su za klorofil *d* pri 450 nm i 690 nm u *in vitro* uvjetima i do 740 nm *in vivo* (Sunil i sur., 2017).

#### 2.1.3.1.2. Karotenoidi

Karotenoidi pripadaju obitelji od više od 600 prirodnih pigmenata koje sintetiziraju više biljke, alge, gljive i bakterije (Kapoor i sur., 2018). To su lipofilni, linearni polieni koji se dijele u dvije glavne skupine, na temelju njihove kemijske strukture; na karotene ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -sastavljeni od ugljika i vodika) i ksantofile (oksigenirani derivati karotena, od kojih su u algama

najzastupljeniji fukoksantin, astaksantin, lutein i zeaksantin) (Menea i sur., 2021; Biris-Dorhoi i sur., 2020; Kapoore i sur., 2018).  $\beta$ -karoten je glavni nezasićeni ugljikovodik u smeđim i zelenim morskim algama (Biris-Dorhoi i sur., 2020).

Prema istraživanju Menea i sur. (2021) zelene alge sadrže  $\beta$ -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin i zeaksantin, crvene alge sadrže uglavnom  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten, lutein i zeaksantin, a u smeđim algama prisutni su  $\beta$ -karoten, violaksantin i fukoksantin.

Fukoksantin je karakterističan narančasti ksantofil prisutan u jestivim smeđim morskim algama, kao što su *Undaria pinnatifida*, *Hijikia fusiformis*, *Laminaria japonica* i *Sargassum fulvellum*. Ima antioksidativno, antikancerogeno i anti-dijabetičko djelovanje. Tradicionalno, u komercijalne svrhe, karotenoidi algi su ekstrahirani ekstrakcijom otapalom pomoću heksana kao nepolarnog otapala. Međutim, nedavno su razvijene napredne tehnologije za učinkovitu ekstrakciju kao što su ekstrakcija pomoću superkritičnih fluida i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Remya i sur., 2022; Kadam i sur., 2013).

Fukoksantin ima snažnu aktivnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, većinom u anoksičnim uvjetima, a također je poznato da pokazuje protuupalna svojstva. Inhibira aktivnost proupalnih agenasa kao što su dušikov oksid (NO), tumorski faktor nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), prostaglandin E2 (PGE2) i interleukin-6 (IL-6) (Biris-Dorhoi i sur., 2020).

Fukoksantin je učinkovit protiv Gram pozitivnih (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus pneumoniae*) i Gram negativnih (*Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens*) bakterija (Menea i sur., 2021). U prirodi je većina karotenoida u trans obliku, a poznato je da su cis-izomeri termodinamički manje stabilni od trans-izomera. Karotenoidi su osjetljivi na svjetlost, toplinu i kisik, a svjetlost i zrak mogu rezultirati sinergijskom razgradnjom svih trans i cis-izomera. Uočeno je da snaga mikrovalova od 600 W pretvara trans-izomere u cis-izomere. Karotenoidi se razgrađuju na temperaturama iznad 60 °C (Kapoore i sur., 2018). Karotenoidi se koriste za proizvodnju dodataka prehrani i obogaćene hrane, kao boja za hranu, za stočnu hranu, te za farmaceutske i kozmetičke proizvode, zbog svojih antioksidativnih svojstava koji pomažu u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti, raka i oftalmoloških bolesti (Menea i sur., 2021).

### 2.1.3.2. Fenolni spojevi

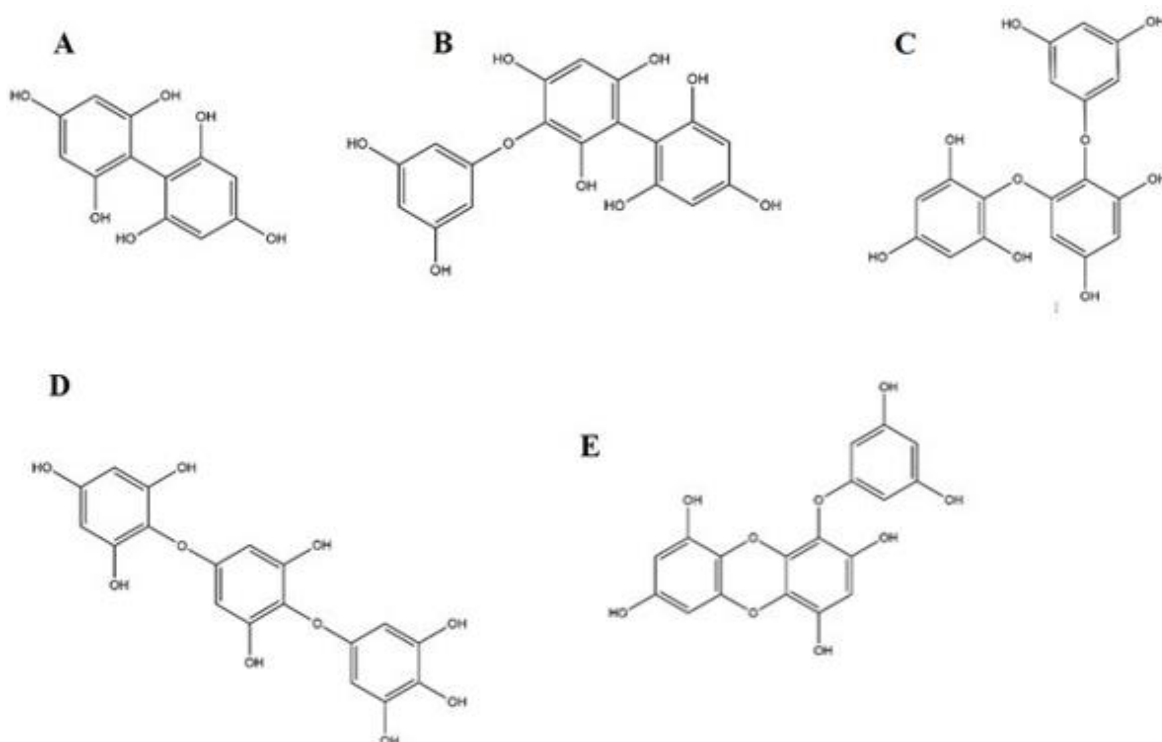
Alge su izložene ekstremnim uvjetima okoline (UV zračenje, dostupnost hranjivih tvari, salinitet, temperatura, visoka koncentracija kisika) koji induciraju stvaranje oksidacijskih sredstava, kao što su slobodni radikali i druge reaktivne vrste, no ne trpe ozbiljna strukturna i fotodinamička oštećenja tijekom metabolizma. Razlog tome može biti proizvodnja različitih metabolita, a među njima su fenolni spojevi poznati kao izuzetno dobri reduktori i hvatači slobodnih radikala (Generalić Mekinić i sur., 2019). Zbog svoje široke biološke primjene, prirodni polifenoli identificirani su kao moguća zamjena za niz industrijskih formulacija koje se sastoje od nutraceutika, dodataka prehrani, kozmetike i farmaceutskih proizvoda (Remya i sur., 2022).

Fenolni spojevi sudjeluju u mnogim važnim biokemijskim procesima tijekom zrenja i dozrijevanja, a u samim biljkama djeluju antioksidacijski, antimikrobno i kao fotoreceptori. Znatan utjecaj imaju i na boju, okus i miris hrane, obzirom da su uključeni u nastajanje tvari boje. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama značajno utječu parametri okoliša kao što su svjetlost i temperatura te uvjeti skladištenja, obrade i prerade (Shortle i sur., 2014). Fenolni spojevi nisu izravno uključeni u primarne procese kao što su fotosinteza, dioba stanica ili reprodukcija, pa se ubrajaju u sekundarne biljne metabolite prisutne u velikom broju biljaka u značajnim količinama, a do danas je poznato više od 8000 različitih struktura (Shortle i sur., 2014). Ove fitokemikalije imaju različite strukture, od jednostavnih oblika do polimera visoke molekularne mase te biogenetski proizlaze iz dva glavna primarna puta sinteze; šikiminskog i acetatnog puta (Remya i sur., 2022; Generalić Mekinić i sur., 2019). Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide (Mena i sur., 2021; Generalić Mekinić i sur. 2019; Shortle i sur., 2014; Kadam i sur., 2013).

Polifenoli prisutni u algama su fenolne kiseline, tanini, flavonoidi, katehini, floroglucinoli i flortanini (Kadam i sur., 2013). Floroglucinoli (1,3,5-trihidroksibenzen, PG) sadrže aromatski fenilni prsten s tri hidroksilne skupine, dok flortanini nastaju polimerizacijom jedinica floroglucinola s dodatnim halogenim ili hidroksilnim skupinama (Mena i sur., 2021; Generalić Mekinić i sur., 2019).

Flortanini su sekundarni metaboliti, koji su određeni samo u smeđim morskim algama, za koje je poznato da postoje u topivim oblicima (javljaju se u citoplazmi ili unutar staničnih organela) ili u oblicima vezanim za staničnu stijenkupoput drugih tanina (Generalić Mekinić i sur., 2019). U morskim algama su lokalizirani u bezbojnim vezikulama poznatim kao fizode (Kadam i sur., 2013). Izlučuju se u staničnu stijenkupoput drugih tanina (Generalić Mekinić i sur., 2019). Izlučuju se u staničnu stijenkupoput drugih tanina (Generalić Mekinić i sur., 2019). Izlučuju se u staničnu stijenkupoput drugih tanina (Generalić Mekinić i sur., 2019). Izlučuju se u staničnu stijenkupoput drugih tanina (Generalić Mekinić i sur., 2019).

membranom, te tada stvaraju komplekse s alginskom kiselinom. Imaju višestruku ulogu u smeđim algama, kako na staničnoj tako i na razini organizma (Hakim i Patel, 2020; Generalić Mekinić i sur., 2019). Florotanini su važni u svim fazama života algi, od ranih razvojnih faza do odraslih jedinki (Generalić Mekinić i sur., 2019). Molekularna masa florotanina varira od 126 Da do 650 kDa. Sadržaj florotanina može varirati od 1 do 14 % u različitim vrstama morskih algi. Općenito, smeđe alge sadrže veće količine florotanina u usporedbi s crvenim i zelenim algama. Imaju važne biološke aktivnosti kao što su antioksidativna, antiproliferativna, antibiotska, anti-dijabetička, antialergijska i protuupalna svojstva (Kadam i sur., 2013). Florotanini imaju kemijska svojstva i fiziološke uloge slične onima kod tanina u vaskularnim biljkama. Osim što su primarni dio staničnih stijenki algi, florotanini imaju ulogu kao kemijska obrana od biljojeda i bakterija. Mogu apsorbirati štetno UV zračenje i biti uključeni u mehanizme zaštite od oksidativnog oštećenja i smanjiti apsorpciju teških metala. Obilje fizoda u vanjskim tkivima pokazuje da fenolni spojevi imaju istaknutu ulogu u zaštiti talusa od prekomjernog zračenja i oštećenja UV zračenjem (Generalić Mekinić i sur., 2019). Na temelju načina povezivanja, florotanini su razvrstani u četiri podklase, tj. florotanini s eterskim vezama (fuhaloli i fletoli), florotanini s fenilnim vezama (fukoli), florotanini s eterskim i fenilnim vezama (fukofletoli) te florotanini s dibenzodioksinskom vezom (ekoli) (Generalić Mekinić i sur., 2019; Li i sur., 2017) (Slika 3).



**Slika 3.** (A) Fukol, (B) fukofletol, (C) fletoli, (D) Fuhalol, (E) Ekol (prema Afonso i sur., 2013)

Različite studije su pokazale značajna pozitivna farmakološka i nutraceutska svojstva florotanina, kao i njihovu potencijalnu primjenu u različitim industrijama (prehrambena, farmaceutska, kozmetička itd.) (Generalić Mekinić i sur., 2019). Ukupni sadržaj fenola i antioksidativna aktivnost ekstrakata morskih algi uvelike ovise o metodi ekstrakcije. Općenito, 70 %-tni aceton je učinkovitiji za ekstrakciju polifenola od vode, a florotanini se uglavnom ekstrahiraju korištenjem etanola ili metanola kao ekstrakcijskog otapala (Kadam i sur., 2013).

#### 2.1.4. Antioksidacijska aktivnost biološki aktivnih spojeva

Prema mehanizmu djelovanja, antioksidansi se mogu podijeliti na primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni antioksidansi su oni koji prekidaju lančanu reakciju oksidacije doniranjem vodika i stvaranjem stabilnijih radikala. Nasuprot tome, sekundarni antioksidansi su oni koji odgađaju oksidaciju putem drugih mehanizama, kao što su kelacija metala, regeneracija primarnih antioksidansa, razgradnja hidroperoksida i eliminacija kisika (Munteanu i Apetrei, 2021; Ambrogi i sur., 2017). Najpoznatiji antioksidansi su flavonoidi, katehini, karotenoidi,  $\beta$ -karoten, likopen, diterpeni i njihovi derivati. Učinkovitost antioksidativnih spojeva ovisi o nekoliko čimbenika, od kojih su najvažniji strukturalna svojstva, temperatura, podložnost supstrata oksidaciji, koncentracija, prisutnost sinergijskih i prooksidativnih spojeva. Važnu ulogu u zaštitnom djelovanju antioksidansa također ima i kinetika reakcije, što uključuje brzinu reakcije između antioksidansa i specifičnog oksidansa, termodinamiku reakcije i sposobnost antioksidansa da reagira (Munteanu i Apetrei, 2021, Shahidi i Zhong 2015).

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti dijele se na SET (engl. *Single Electron Transfer*) i HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) metode. U SET metode ubrajamo DPPH (engl. *2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl*), TEAC (engl. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*), FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), CUPRAC (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) metodu kao i metodu određivanja ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Navedene metode su spektrofotometrijske i temelje se na promjeni boje uslijed doniranja elektrona slobodnim radikalima od strane antioksidanasa. U HAT metode ubrajamo TRAP (engl. *Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TOSC (engl. *Total Oxyradical Scavenging Capacity*) metode koje mjere sposobnost antioksidansa da doniraju proton slobodnom radikalima (Apak i sur., 2013). DPPH metoda je zbog brzine i jednostavnosti, široko korištena metoda za mjerenje sposobnosti spojeva da djeluju kao hvatači slobodnih radikala ili donori vodika, te za procjenu antioksidativne aktivnosti hrane. Ova metoda se koristi za

ispitivanje hidrofилnih i lipofilnih antioksidansa (Kedare i Singh, 2011). Smeđe alge imaju relativno visoke razine antioksidansa u usporedbi sa zelenim i crvenim algama.

## **2.2. METODE EKSTRAKCIJE**

Ekstrakcija spojeva iz biljaka može se provesti konvencionalnim ili naprednim metodama (Cikoš i sur., 2018). Postojeće konvencionalne tehnike koje se koriste za ekstrakciju bioaktivnih spojeva uključuju Soxhlet aparaturu, hidrodestilaciju i maceraciju alkoholom. Odabir odgovarajuće metode varira ovisno o prirodi spoja koji se određuje kako bi se dobio maksimalni prinos i najveća čistoća. Konvencionalne metode mogu zahtijevati dugo vrijeme ekstrakcije što ovisi o brzini difuzije otapala i potrebna su organska otapala koja su štetna za okoliš. Bioaktivni spojevi osjetljivi su na tehnike ekstrakcije temeljene na uporabi topline ili otapala (Kadam i sur., 2013). Za osjetljive bioaktivne spojeve, npr. fukoksantin, bioaktivnost se smanjuje procesom zagrijavanja, što dovodi do niskog prinosa ekstrakcije. Ove aktivne molekule mogu biti promijenjene i pod utjecajem pH, temperature i uvjeta tlaka (Cikoš i sur., 2018; Kadam i sur., 2013). Napredne metode ekstrakcije koje se koriste su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta enzimima (EAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) i ekstrakcija otapalima pod povišenim tlakom (PLE) (Kadam i sur., 2013). Prednost naprednih metoda ekstrakcije (zelene metode) u odnosu na konvencionalne metode je smanjena potrošnja ekstrakcijskog otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i performanse na nižim temperaturama, bolju selektivnost za izolaciju željenih spojeva te izbjegavanje stvaranja nusproizvoda i neželjene reakcije tijekom ekstrakcije (Cikoš i sur., 2018).

### **2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-assisted extraction, MAE*) je jednostavna i ekonomična ekološki prihvatljiva tehnika za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz različitih materijala (Kothari i sur., 2012). Mikrovalovi su neionizirajuće elektromagnetsko zračenje frekvencije od 300 MHz do 300 GHz. Upotreba mikrovalova za ekstrakciju različitih spojeva prvi put je objavljena 1986. godine. MAE prenosi energiju na otopinu, koja se zagrijava dvostrukim mehanizmima dipolne rotacije i ionske kondukcije (Kapoore i sur., 2018; Kadam i sur., 2013). Rotacija dipola je promjena mjesta dipolnih molekula koja prati brze promjene električnog polja. Ionska kondukcija je elektroforetska migracija iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja, pri čemu otopina stvara otpor što rezultira trenjem koje zagrijava otopinu (Veggi i sur., 2013). Frekvencija zračenja odgovara

rotacijskom gibanju molekula, u kondenziranoj tvari, apsorpcija energije odmah uzrokuje preraspodjelu energije između molekula i homogenog zagrijavanja medija. MAE uzrokuje pucanje vodikovih veza i migraciju otpuštenih iona, što rezultira povećanim prodiranjem otapala u matriks, čime se olakšava ekstrakcija ciljanih spojeva. Zbog značajnog pritiska koji se razvija unutar matriksa, dolazi do povećanja poroznosti biološke matrice što rezultira većim prodiranjem otapala u matriks. Postoje dvije glavne vrste MAE sustava, a to su zatvoreni sustav i otvoreni sustav. Zatvoreni sustav koristi se za ekstrakciju ciljanih spojeva u uvjetima viših temperatura i tlaka, dok se otvoreni sustavi koriste za ekstrakcije koje se provode u uvjetima atmosferskog tlaka (Kapoor i sur., 2018; Kadam i sur., 2013). Prednosti MAE, nad konvencionalnim metodama, uključuju poboljšanu brzinu ekstrakcije, manju upotrebu otapala i poboljšani prinos ekstrakcije. Nedostatak MAE je što nije prikladna za ekstrakciju bioaktivnih spojeva osjetljivih na toplinu (Kadam i sur., 2013). Učinkovitost MAE ovisi o parametrima ekstrakcije koji utječu na mehanizam procesa ekstrakcije i dobiveni prinos. Prije provođenja ekstrakcije, pažnju treba posvetiti pravilnom odabiru otapala, temperaturi procesa, snazi mikrovalova, vremenu trajanja procesa i drugim potencijalno važnim utjecajnim parametrima procesa te njihovom međusobnom odnosu (Veggi i sur., 2013).

#### *2.2.1.1. Utjecaj otapala*

Najvažniji čimbenik koji utječe na proces MAE je odabir otapala. Otapala korištena za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima imaju visoku dielektričnu konstantu i sposobnost da apsorbiraju mikrovalnu energiju (Kothari i sur., 2012). Odabrano otapalo treba imati visoku selektivnost prema tvarima koje želimo ekstrahirati i mora biti sposobno apsorbirati mikrovalnu energiju i pretvoriti je u toplinu (Veggi i sur., 2013). Kod MAE se mogu koristiti i polarna i nepolarna otapala, ali najčešće korištena otapala su etanol, metanol i voda.

#### *2.2.1.2. Utjecaj vremena*

Vrijeme ekstrakcije u MAE je vrlo kratko u usporedbi s konvencionalnim metodama i obično varira od nekoliko minuta do pola sata, čime se izbjegava moguća toplinska degradacija i oksidacija spojeva, što je od posebne važnosti za spojeve osjetljive na temperaturu (Veggi i sur., 2013).

#### *2.2.1.3. Utjecaj temperature*

Na visokim temperaturama, snaga otapala se povećava zbog pada viskoznosti i površinske napetosti, pri čemu se povećava moć prodiranja otapala u matriks, što olakšava otapalu da otopi otopljene tvari i prodre u matricu. Kada se MAE izvodi u zatvorenim sustavima, temperatura može porasti i iznad temperature vrelišta otapala, što dovodi do bolje



učinkovitosti. Učinkovitost raste s porastom temperature sve dok se ne postigne optimalna temperatura, a zatim počinje opadati s daljnjim porastom temperature, zbog termičke stabilnosti spojeva pri različitim temperaturama (Kapoore i sur., 2018; Kadam i sur., 2013; Veggi sur., 2013).

#### 2.2.1.4. Utjecaj snage mikrovalova

Povećanje snage mikrovalova poboljšava prinos ekstrakcije i rezultira kraćim vremenom ekstrakcije. S druge strane, visoka snaga mikrovalova može uzrokovati slab učinak ekstrakcije zbog degradacije termički osjetljivih spojeva. Također, brzo pucanje stanične stijenke odvija se na višoj temperaturi kada se koristi veća snaga, a kao rezultat toga nečistoće se također mogu isprati u otapalo zajedno sa željenom otopljenom tvari (Veggi sur., 2013).

### 2.3. ODREĐIVANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM SPEKTROFOTOMETRIJSKIH I KROMATOGRAFSKIH METODA

Biološki aktivni spojevi mogu se analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim, spektrofotometrijske metode su jednostavne, praktične i ekonomski prihvatljive, zbog čega su široko primijenjene u kontrolnim laboratorijima. (Shortle i sur., 2014).

#### 2.3.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija je grana analitičke kemije koja se bavi dobivanjem informacija o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetskih promjena što se događaju u jezgrama atoma, elektronskom omotaču atoma ili u molekulama kao rezultat njihove interakcije s elektromagnetskim zračenjem ili sa česticama (Horvat, 2015). Primjenom spektrofotometrijskih metoda određuju se pigmenti klorofili i karotenoidi, antocijani, flavonoidi, hidroksicimetne kiseline i dr. Klorofili apsorbiraju svjetlost valnih duljina od 430 do 662 nm, a karotenoidi od 400 do 500 nm (plavi dio spektra) (Pietrzykowska, 2015). Svi flavonoidi pokazuju visoku apsorpciju u rasponu od 250 do 270 nm (UV područje), a posebno antocijanini imaju intenzivnu apsorpciju u rasponu od 520 do 560 nm (vidljivo područje) (Delgado-Vargas i sur., 2000). Glavne prednosti primjene spektrofotometrije su očuvanost uzoraka i mjerenje pri niskim koncentracijama analita zbog čega je ova metoda odabrana za određivanje pigmenata i ukupnih fenola u uzorcima smeđe alge *Halopteris scoparia*.

#### 2.3.2. Kromatografske metode

Kromatografske metode koriste se u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi te u preparativne svrhe. Temelje se na razdvajanju smjesa, pri čemu se sastojci smjesa razdjeljuju

između dviju faza, nepokretna (stacionarna) i pokretna (mobilna) faza. Osnovni princip kromatografskog odvajanja je različit afinitet analita za stacionarnu i mobilnu fazu. Mobilna faza, koja može biti tekućina ili plin, prenosi sastojke kroz stacionarnu fazu koji se ovisno o svojim svojstvima raspodjele na stacionarnoj fazi (Luterotti, 2009). Zbog ovih razlika neke komponente smjese ostaju dulje u stacionarnoj fazi, te se u kromatografskom sustavu kreću sporo, dok druge brzo prelaze u mobilnu fazu i brže napuštaju sustav (Coskun, 2016). Rezultat kromatografskih metoda je kromatogram, zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata (Luterotti, 2009). Na kromatogramu su vidljivi tzv. pikovi, a površina ili visina dobivenog pika proporcionalna je koncentraciji određenog spoja. Retencijsko vrijeme ( $t_R$ ) je vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do pojave pika na kromatogramu i jedna je od najvažnijih kromatografskih značajki za identifikaciju. Usporedbom retencijskog vremena standarda i analita identificira se ispitivani spoj (Etxebarria i sur., 2009). U kvalitativnoj kemijskoj analizi najčešće su primijenjene tankoslojna, papirna, kolonska adsorpcijska i plinska kromatografija (Luterotti, 2009).

#### *2.3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)*

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je specifičan oblik kolonske kromatografije koji se općenito koristi u biokemiji i analizi za odvajanje, identifikaciju i kvantificiranje aktivnih spojeva (Malviya i sur., 2010), a danas u 75 % slučajeva se koristi kao kromatografija obrnutih faza. (Luterotti, 2009). Uzorak koji se analizira uvodi se kroz injektor na kolonu te ovisno o prirodi analita i specifičnim kemijskim ili fizikalnim interakcijama analita sa stacionarnom fazom prolazi kroz mobilnu fazu (Malviya i sur., 2010; Luterotti, 2009). Vrijeme u kojem određeni analit eluira (izlazi s kraja kolone) naziva se retencijskim vremenom. Izbor otapala, aditiva i gradijenta ovisi o prirodi stacionarne faze i analita, a uobičajena otapala su kombinacije vode ili organskih otapala (metanol i acetonitril) (Malviya i sur., 2010).

Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari, a kao detektori važni su spektroskopski detektori, detektori fluorescencije, detektori indeksa loma i elektrokemijski detektori (Luterotti, 2009). HPLC koristi se za odjeljivanja i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Pojedinačni karotenoidi i klorofili mogu biti kvantificirani u algama pomoću HPLC metode, a prema istraživanju Mena i suradnika (2021) u algama su identificirani trans-zeaksantin, trans-lutein, trans- $\beta$ -karoten, trans- $\alpha$ -karoten, klorofil- $\alpha$ , klorofil- $\beta$ , feofitin- $\alpha$  i hidrosiklorofil- $\alpha$ .

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Uzorak**

Za provedbu ovog istraživanja uzorkovana je smeđa alga *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau (1904) u obalnom području Zadra, Punta Bajlo, u periodu studeni 2021. godine, na dubini 1 m, (44 05 50 N; 14 14 43 E). Uzorci alge su isprani više puta destiliranom vodom da bi se uklonila sol i ostaci nečistoća i zatim su zamrznuti na -60 °C te liofilizirani (CoolSave 55-9 PRO, Labogene, Denmark). Liofilizirani uzorci su samljeveni u prah i čuvani na -20 °C do daljnje upotrebe.

#### **3.2. METODE RADA**

##### **3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom ekstrakcije mikrovalovima**

Ekstrakcija fenolnih spojeva, klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida iz smeđe alge *Halopteris scoparia* provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) u mikrovalnom reaktoru Ethos Easy (Milestone) uz upotrebu 96 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala.

Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije s najvišim prinosom, tijekom provođenja eksperimenta varirani su parametri: temperatura (10, 25 i 40 °C), vrijeme (5, 15 i 25 min) i snaga (150, 300 i 450 W).

##### **Aparatura i pribor:**

- tehnička vaga (točnost ± 0,01 g) (Kern & Sohn, Njemačka)
- analitička vaga (točnost ± 0,0001 g) (Sartorius AG, Njemačka)
- mikrovalni reaktor, Ethos Easy (Milestone, Italija)
- mlinac (AR1105 Moulinex)
- Erlenmeyerove tikvice (100 mL, 200 mL, 500 mL)
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL)
- odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL)
- menzure (50 mL, 100 mL)
- staklene epruvete

- plastične epruvete
- stakleni lijevak
- filter papir
- mikropipete (100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L i 5000  $\mu$ L)
- pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL)
- magnetni štapić
- plastične žlice
- metalne žlice
- plastična posuda za vaganje

#### **Kemikalije:**

- 96 %-tni etanol (Lach:ner, Češka)
- destilirana voda

#### **Postupak određivanja:**

Uzorak se priprema tako da se u ćeliju ekstraktora odvaže približno 1 gram osušenog i usitnjenog uzorka i doda 20 mL 96 %-tnog etanola kao otapala. U ćeliju se ubaci magnetni mješač i zatvori se te se postavi na postolje mikrovalnog reaktora. Na mikrovalnom ekstraktoru, postave se parametri temperature, snage i vremena ekstrakcije prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 2. Vrijeme potrebno za zagrijavanje na željenu temperaturu postavi se na 5 minuta, a vrijeme ventilacije i hlađenja nakon ekstrakcije na 1 minutu.

Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt se filtrira kroz filter papir pomoću staklenog lijevka u Erlenmeyerovu tikvicu od 25 mL u koju se zatim dodaje 96 %-tni etanol do oznake. Pripremljeni uzorci prebace se u plastične epruvete i dobro zatvore. Ekstrakti se skladište u hladnjaku pri temperaturi +4 °C do trenutka provođenja spektrofotometrijskih analiza.

**Tablica 2.** Uvjeti provođenja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

<b>Uzorak</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Vrijeme ( min)</b>	<b>Snaga mikrovalova (W)</b>
1	10	5	150
2			300
3			450
4		15	150
5			300
6			450
7		25	150
8			300
9			450
10	25	5	150
11			300
12			450
13		15	150
14			300
15			450
16		25	150
17			300
18			450
19	40	5	150
20			300
21			450
22		15	150
23			300
24			450
25		25	150
26			300
27			450

### 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela pigmenata

Određivanje masenog udjela pigmenata provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode opisane u radu Lichtenthaler i Buschmann, (2001). Određivanje biljnih pigmenata odnosno ukupnih klorofila a i klorofila b te ukupnih karotenoida bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Mjerenje intenziteta obojenja provedo se pri valnim duljinama od 649 nm i 664 nm (za klorofile) te 470 nm (za karotenoide) (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

#### **Aparatura i pribor:**

- spektrofotometar (UviLine 9 400, Secomam, Francuska)
- staklene kivete
- tehnička vaga (točnosti  $\pm 0,01$ g) (Kern & Sohn, Njemačka)
- analitička vaga (točnost  $\pm 0,0001$  g) (Sartorius AG, Njemačka)
- pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- menzura, volumena 100 mL i 1 L
- staklene epruvete

#### **Kemikalije:**

- 96 %-tni etanol (Lach:ner, Češka)
- destilirana voda

#### **Postupak određivanja:**

U staklenu kivetu otpipetira se 150  $\mu$ L uzorka i 3000  $\mu$ L etanola. Nakon toga se mjeri apsorbanacija pri valnim duljinama od 649 nm i 664 nm (za klorofile) te 470 nm (za karotenoide). Na isti način se pripremi i slijepa proba, no umjesto ekstrakta uzima se isti volumen ekstrakcijskog otapala. Svi uzorci su analizirani u paraleli (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Na osnovu dobivenih rezultata apsorbancije (A), određene su koncentracije klorofila a (Ch-a), klorofila b (Ch-b) i karotenoida (Cx+c) prema sljedećim jednažbama (Sumanta i sur., 2014):

$$\text{Ch-a} = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [1]$$

$$\text{Ch-b} = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [2]$$

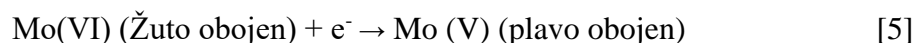
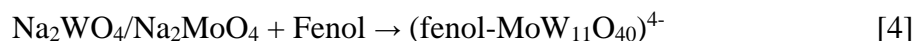
$$\text{Cx} + \text{c} = (1000 A_{470} - 2,13 \text{Ch-a} - 97,63 \text{Ch-b})/209 \quad [3]$$

Dobivene vrijednosti koncentracija izražavaju se u  $\mu\text{g/mL}$  te su preračunate u maseni udio koji je izražen u mg na g suhe tvari ( $\text{mg g}^{-1}$  s.tv.).

### 3.2.3. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteuovom metodom

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni (Shortle i sur., 2014).



Redukcija ovih kiseline odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm.

#### **Aparatura i pribor:**

- spektrofotometar (UviLine 9 400, Secomam, Francuska)
- vodena kupelj, Rotavapor
- staklene kivete
- tehnička vaga (točnost  $\pm 0,01$  g) (Kern & Sohn, Njemačka)
- analitička vaga (točnost  $\pm 0,0001$  g) (Sartorius AG, Njemačka)
- pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL

- odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
- menzura, volumena 100 mL i 1 L
- staklene epruvete
- plastična lađica za vaganje

### **Kemikalije:**

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)  
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline  
Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

### **Postupak određivanja:**

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100  $\mu$ L ekstrakta, 200 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (u vodenoj kupelji). Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

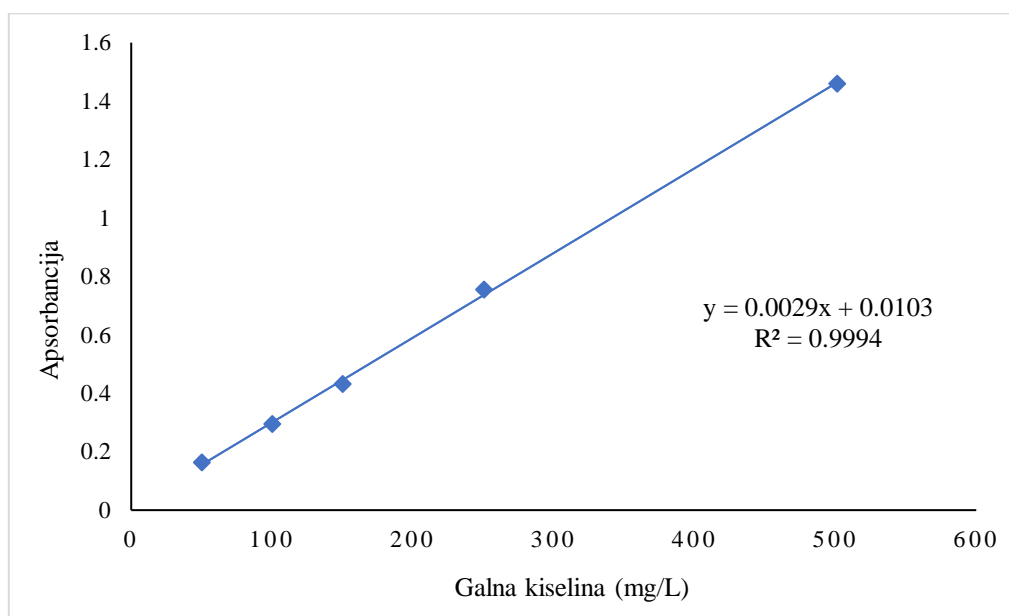
### **Izrada baždarnog pravca:**

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100  $\mu$ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL



destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (u vodenoj kupelji). Za slijepu probu uzima se  $100\text{ }\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od  $765\text{ nm}$ .

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline ( $\text{mg/L}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri  $765\text{ nm}$  (Slika 4). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 4.** Prikaz ovisnosti apsorbancije pri  $765\text{ nm}$  o koncentraciji galne kiseline ( $\text{mg/L}$ ).

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba prava glasi:

$$y = 0,0029x + 0,0103 \quad R^2 = 0.9994 \quad [6]$$

gdje je:

y – apsorbancija pri  $765\text{ nm}$ ,

x – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg/L}$ )

Maseni udjeli ukupnih fenola izražene su u  $\text{mg}$  galne kiseline na  $100\text{ grama}$  suhe tvari uzorka ( $\text{mg GAE } 100\text{ g}^{-1}\text{ s.tv.}$ ), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

### 3.2.4. Određivanje pojedinačnih klorofila i karotenoida primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju

HPLC je najosjetljivija metoda i intenzivno se koristi za odvojenu identifikaciju širokog spektra spojeva poput klorofila, karotenoida i flavonoida (Mena i sur., 2021). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV-Diode Array detekciju korištena je za određivanje pojedinačnih spojeva pigmenata, klorofila i karotenoida u ispitivanom ekstraktu dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije potpomognute mikrovalovima zbog visoke pouzdanosti i niske granice detekcije.

#### **Kemikalije:**

- metanol (Lach-ner, Češka)
- etanol (Lach-ner, Češka)
- metil tert-butil eter (Lach-ner, Češka)
- destilirana voda

#### **Standardi:**

- $\beta$ -karoten (Sigma Aldrich, USA)
- Lutein (Sigma Aldrich, USA)
- Klorofil a (Sigma Aldrich, USA)
- Klorofil b (Sigma Aldrich, USA)

#### **Aparatura:**

- HPLC uređaj (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- UV-VIS/DAD detektor (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

#### **Priprema uzorka:**

Prije injektiranja u HPLC uređaj, dobiveni ekstrakti filtriraju se kroz 0,45  $\mu$ m filter (Chromafil Xtra, Macherey-Nagel, Njemačka) u viala za injektiranje.

#### **Postupak rada:**

Za određivanje pigmenata (klorofila i karotenoida) u ekstraktima smeđe alge koristila se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV/VIS-Diode Array detekciju

(HPLC-UV-VIS/DAD) prema metodi koju su opisali Castro-Puyana i sur. (2016). Za kontrolu uređaja i obradu podataka korišten je Chemstation program.

Za izvođenje metode korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 Infinity sistem (Agilent Technologies, CA, SAD) koji je opremljen s DAD detektorom. Otapala korištena kao pokretne faze, prije korištenja odzrača se 1 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji.

Određivanje je provedeno prema sljedećim kromatografskim uvjetima prikazanima u tablicama 3 i 4:

**Tablica 3.** Uvjeti kromatografskog određivanja karotenoida i klorofila

Kolona	Develosil YMC-C30, 5 $\mu$ m (250 x 4,6 mm I.D.)
<b>Pokretna faza</b>	<b>otapalo A:</b> smjesa metanol (MeOH):metil terc-butil etera (MTBE):voda (90:7:3 v/v/v) <b>otapalo B:</b> smjesa MeOH:MTBE (10:90 v/v)
<b>Protok</b>	0,8 mL/min
<b>Detektor</b>	UV-VIS/DAD ( $\lambda$ 450 nm, 660 nm)
<b>DAD detektor:</b>	240 - 770 nm
<b>Injektirani volumen:</b>	10 $\mu$ L
<b>Eluiranje:</b>	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 4

**Tablica 4.** Gradijent za HPLC-UV/PDA analizu klorofila i karotenoida (Castro-Puyana i sur., 2016)

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL min <sup>-1</sup> )
<b>0</b>	100	0	0,8
<b>20</b>	70	30	0,8
<b>35</b>	50	50	0,8
<b>45</b>	20	80	0,8
<b>50</b>	0	100	0,8
<b>52</b>	100	0	0,8

Identifikacija klorofila (klorofil a i klorofil b) i ukupnih karotenoida (lutein,  $\beta$ -karoten, zeaksantin, likopen i fukoksantin) provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih

spojeva (tR) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom karakterističnih UV/VIS spektara. Određivanje karakterističnih UV/VIS spektara provedeno je skeniranjem spektra u području valnih duljina od 240 do 770 nm. Identifikacija karotenoida provedena je pri 450 nm, a klorofila pri 660 nm.

### 3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijske aktivnost ekstrakta može se odrediti u reakciji sa slobodnim radikalom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Brand-Williams i sur., 1995). Metoda se temelji na redukciji stabilnog DPPH u prisustvu antioksidansa pri čemu dolazi do promjene ljubičaste boje u žutu, a apsorbancija se mjeri pri 517 nm.

#### **Aparatura i pribor:**

- tehnička vaga (točnosti  $\pm 0,01$ g) (Kern & Sohn, Njemačka)
- analitička vaga (točnost  $\pm 0,0001$  g) (Sartorius AG, Njemačka)
- spektrofotometar (UviLine 9 400, Secomam, Francuska)
- Erlenmeyerove tikvice (100 mL, 200 mL, 500 mL)
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL)
- staklene epruvete
- staklene kivete
- mikropipete (100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L i 5000  $\mu$ L)
- pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL)

#### **Kemikalije:**

- destilirana voda
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DDPH) (Sigma Aldrich, USA)
- metanol (Lach:ner, Češka)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina) (Sigma Aldrich, USA)

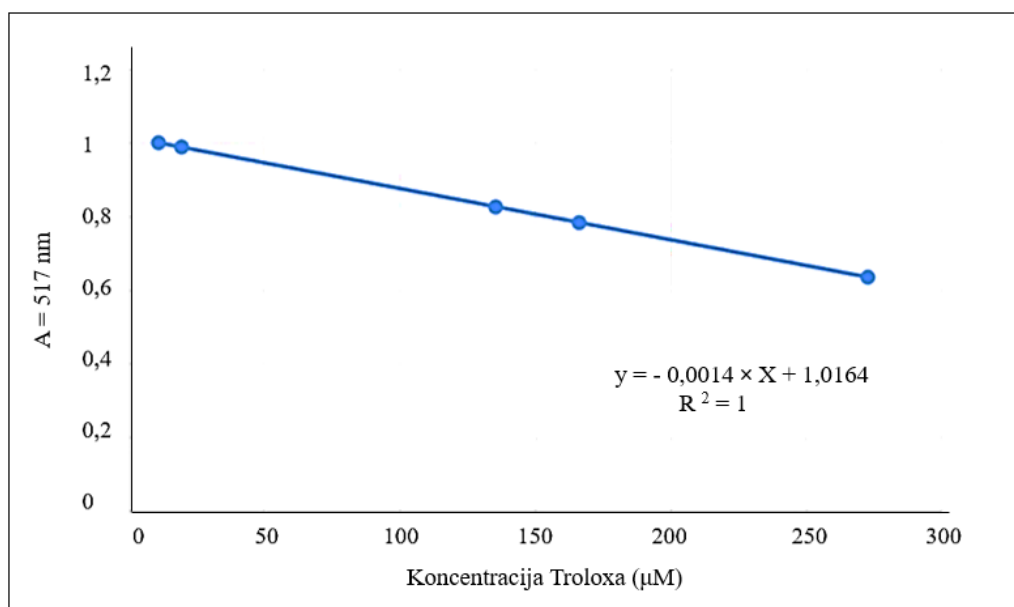
#### **Postupak određivanja:**

Prije početka određivanja antioksidacijske aktivnosti potrebno je pripremiti 0,5 mM otopinu DPPH na način da se 0,02 grama DPPH otopi u metanolu u odmjerne tikvici od 100

ml, a zatim nadopuni metanolom do oznake. U staklenu epruvetu se otpipetira 1 mL ekstrakta, 1 mL metanola, 0,5 mL 0,5 mM otopine DPPH te se ostave stajati 20 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 20 minuta mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, ali umjesto 1 mL ekstrakta, dodaje se 1 mL metanola (Prior i sur., 2005).

### Izrada baždarnog pravca:

Baždarni pravac nacrtat se pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene poznate koncentracije 0, 25, 50, 100, 200 i 300  $\mu\text{M}$  razrijeđene otopine Troloxa, a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 517 nm. Antioksidacijska aktivnost se izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 5).



**Slika 5.** Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa ( $\mu\text{M}$ )

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = - 0,0014 \times X + 1,0164 \quad R^2 = 1 \quad [7]$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent Troloxa ( $\mu\text{M}$ )

Antioksidacijska aktivnost izražena je u mikromol Troloxa na 100 g suhe tvari uzorka ( $\mu\text{mol Troloxa } 100 \text{ g}^{-1}\text{s.t.}$ ), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

### 3.2.6. Statistička obrada rezultata

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku analizu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0. Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn na tri razine.

S ciljem optimiranja parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za određivanje biološkog potencijala smeđe alge *Halopteris scoparia* ispitan je utjecaj temperature ekstrakcije (10, 25 i 40 °C), vremena ekstrakcije (5, 15 i 25 min) i snage mikrovalova (150, 300 i 450 W) na udio klorofila a, klorofila b, ukupnih karotenoida i ukupnih fenola. Kontinuirane varijable analizirane su multifaktorskom analizom varijance (ANOVA). Razine značajnosti za sva ispitivanja je bila na razini  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti), a srednje vrijednosti rezultata uspoređene su s Tukey HSD testom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. BIOAKTIVNI SPOJEVI SMEĐE ALGE *Halopteris scoparia*

U ovom radu provedena je ekstrakcija biljnih pigmenata klorofila i karotenoida te fenolnih spojeva iz smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE).

Za MAE kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 96 %-tni etanol. S ciljem optimiranja uvjeta ekstrakcije, radi dobivanja najvećeg prinosa pigmenata i fenolnih spojeva, varirani su slijedeći parametri ekstrakcije: temperatura (10, 25 i 40 °C), vrijeme ekstrakcije (5, 15 i 25 min) i snaga mikrovalova (150, 300 i 450 W). Nakon tretiranja uzoraka mikrovalovima, u dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje klorofila a i b, ukupnih karotenoida te ukupnih fenola. U ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima je provedeno kromatografsko određivanje pojedinačnih klorofila i karotenoida primjenom HPLC-UV-VIS/DAD metode i antioksidacijska aktivnost primjenom DPPH metode.

Svi dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu te prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  standardna devijacija. Nadalje, provedena je statistička obrada u programskom sustavu Statistica 8.0, a rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

4.1.1. Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na maseni udio pigmenata smeđe alge *Halopteris scoparia*

Tablica 5. prikazuje rezultate spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela klorofila a, klorofila b te ukupnih karotenoida izoliranih iz smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom MAE.

**Tablica 5.** Maseni udjeli klorofila a, klorofila b te ukupnih karotenoida (mg 100 g<sup>-1</sup> suhe tvari uzorka) izoliranih iz smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Snaga (W)	Klorofil a (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)	Klorofil b (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)	Ukupni karotenoidi (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)
1	10	5	150	13,04 ± 0,05	7,22 ± 0,17	3,90 ± 0,00
2			300	13,12 ± 0,03	6,83 ± 1,23	4,56 ± 0,22
3			450	14,05 ± 0,06	7,70 ± 0,28	4,67 ± 0,18
4		15	150	16,07 ± 0,10	7,59 ± 0,12	5,50 ± 0,00
5			300	18,24 ± 0,33	8,66 ± 0,37	6,41 ± 0,12
6			450	15,36 ± 0,20	8,72 ± 0,26	6,90 ± 0,00
7		25	150	17,45 ± 0,07	9,21 ± 0,15	4,49 ± 0,13
8			300	17,62 ± 0,03	9,73 ± 0,11	5,29 ± 0,13
9			450	17,80 ± 0,14	10,83 ± 0,24	5,45 ± 0,64
10	25	5	150	15,97 ± 0,10	8,61 ± 0,30	4,73 ± 0,04
11			300	14,65 ± 1,77	8,27 ± 0,89	4,35 ± 0,63
12			450	15,94 ± 0,08	8,73 ± 0,25	4,95 ± 0,08
13		15	150	16,06 ± 0,08	8,90 ± 0,01	4,63 ± 0,18
14			300	16,80 ± 0,00	9,02 ± 0,02	5,01 ± 0,01
15			450	17,02 ± 0,26	9,42 ± 0,11	5,10 ± 0,00
16		25	150	18,59 ± 0,27	10,16 ± 0,08	5,57 ± 0,10
17			300	19,14 ± 0,48	10,06 ± 0,06	6,20 ± 0,01
18			450	17,26 ± 0,63	10,18 ± 0,45	6,40 ± 0,14
19	40	5	150	15,23 ± 0,05	8,00 ± 0,71	4,45 ± 0,07
20			300	14,35 ± 0,21	7,52 ± 0,25	4,54 ± 0,09
21			450	13,75 ± 0,21	7,69 ± 0,30	4,52 ± 0,54
22		15	150	20,01 ± 0,15	9,84 ± 0,91	6,03 ± 0,32
23			300	15,71 ± 0,27	9,40 ± 1,14	4,77 ± 0,05
24			450	16,17 ± 0,33	9,94 ± 1,22	4,96 ± 0,20
25		25	150	17,07 ± 0,04	8,72 ± 0,12	5,58 ± 0,02
26			300	17,21 ± 0,42	9,76 ± 0,06	5,74 ± 0,23
27			450	17,79 ± 0,01	10,34 ± 0,37	5,84 ± 0,08

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.



Udjeli ukupnih klorofila a nakon provedene MAE određeni su u rasponu od  $13,04 \pm 0,05$  do  $20,01 \pm 0,15$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv., udjeli klorofila b u rasponu od  $6,83 \pm 1,23$  do  $10,83 \pm 0,24$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv., a udjeli ukupnih karotenoida u rasponu od  $3,90 \pm 0,00$  do  $6,90 \pm 0,00$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv. Može se uočiti kako su udjeli klorofila a izolirani iz smeđe alge *Halopteris scoparia* znatno veći od udjela klorofila b i ukupnih karotenoida.

Najveći udio klorofila a određen je u uzorku 22 koji se ekstrahirao pri temperaturi  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , vremenu 15 min i snazi mikrovalova 150 W, a klorofila b u uzorku 9 koji se ekstrahirao pri temperaturi  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , vremenu 25 min i snazi mikrovalova 450 W. Najmanji udio klorofila a određen je u uzorku 1 koji se ekstrahirao pri temperaturi  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , vremenu 5 min i snazi mikrovalova od 150 W, a klorofila b u uzorku 2 pri istim uvjetima temperature i vremena ekstrakcije, ali pri nešto većoj snazi mikrovalova od 300 W. Osim klorofila a, u uzorku 1 također je određen i najmanji udio ukupnih karotenoida dok je najveći udio ukupnih karotenoida određen u uzorku 6 koji se ekstrahirao pri temperaturi  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , vremenu 15 min i snazi mikrovalova od 450 W. Općenito možemo reći da su veće varijacije bile u udjelima klorofila a kako su se uvjeti ekstrakcije mijenjali dok su udjeli klorofila b i karotenoida uglavnom rasli povećanjem vremena ekstrakcije i snage mikrovalova.

Garcia-Perez i sur. (2022) su u devet različitih vrsta smeđih algi (*Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus spiralis*, *Himantalia elongata*, *Laminaria ochroleuca*, *Laminaria saccharina*, *Pelvetia canaliculata*, *Sargassum muticum* i *Undaria pinnatifida*) odredili ukupne klorofile u rasponu od 14,63 do 38,84  $\mu\text{g g}^{-1}$  koristeći etanol kao ekstrakcijsko otapalo što je značajno niže nego u našem istraživanju.

U istraživanju koje su proveli Fabrowska i sur. (2017) koristile su se različite tehnike ekstrakcije (Soxhlet, UAE, SFE, MAE) za izolaciju klorofila iz tri vrste slatkovodnih algi (*Cladophora glomerata*, *Cladophora rivularis* i *Ulva flexuosa*). Najveći udjeli klorofila a ( $16,9 \pm 0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) te ukupnih karotenoida ( $3,0 \pm 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) određeni su u ekstraktima *Cladophora glomerata*, a najveći udjeli klorofila b ( $18,7 \pm 0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) određeni su u ekstraktima *Ulva flexuosa* dobivenim pomoću MAE pri temperaturi od  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , vremenu 60 min i snazi 800 W u odnosu na ostale ekstrakcijske metode (Soxhlet, UAE i SFE). U našem istraživanju maseni udio klorofila a i b je niži u usporedbi sa rezultatima navedenog istraživanja, a najveći udio klorofila određen je pri istoj ekstrakcijskoj temperaturi od  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , ali kraćem vremenu ekstrakcije od 15 min i nižoj snazi mikrovalova od 150 W. Razlog tomu

može biti manja termička stabilnost pigmenata u smeđoj algi *Halopteris scoparia* za razliku od algi *Cladophora glomerata*, *Cladophora rivularis* i *Ulva flexuosa*.

Michalak i sur. (2015) izolirali su klorofile iz biljke *Lepidium sativum* primjenom MAE pri različitim temperaturama (25, 40, 60 °C), snazi mikrovalova od 1000 W i vremenu ekstrakcije od 30 min te promatrali kakav je prinos klorofila ovisno o temperaturi. Najveći udio ukupnih klorofila određen je u ekstraktima dobivenim pri najvišoj temperaturi ekstrakcije od 60 °C i iznosio je 34,2 mg L<sup>-1</sup> što je više nego u našim uzorcima. Smatra se da u baltičkim algama visoki udio Mg i Fe može utjecati na sintezu klorofila te je utvrđena korelacija između sadržaja mikro- i makro- elemenata i udjela klorofila. Okolišni uvjeti značajno utječu na sastav i udjele fotosintetskih pigmenata u algama (Safari i sur., 2015).

Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na masene udjele klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida smeđe alge *Halopteris scoparia* prikazani su u tablici 6.

**Tablica 6.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na maseni udio klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida smeđe alge *Halopteris scoparia*

Parametri ekstrakcije	N	Klorofil a (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)	Klorofil b (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)	Karotenoidi (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)
<b>Temperatura (°C)</b>		p=0,2768	p=0,11245	p=0,9483
<b>10</b>	18	15,86±0,42a	8,50±0,26a	5,24±0,18a
<b>25</b>	18	16,82±0,42a	9,26±0,26a	5,21±0,18a
<b>40</b>	18	16,37±0,42a	9,02±0,26a	5,16±0,18a
<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,0000	p=0,0000	p=0,0000
<b>5</b>	18	14,46±0,27a	7,84±0,18a	4,52±0,14a
<b>15</b>	18	16,82±0,27b	9,05±0,18b	5,48±0,14b
<b>25</b>	18	17,77±0,27c	9,89±0,18c	5,62±0,14c
<b>Snaga (W)</b>		p=0,7263	p=0,2473	p=0,2333
<b>150</b>	18	16,61±0,43a	8,70±0,26a	4,99±0,18a
<b>300</b>	18	16,31±0,43a	8,80±0,26a	5,21±0,18a
<b>450</b>	18	16,12±0,43a	9,28±0,26a	5,42±0,18a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

Statistička analiza je pokazala da na udio klorofila a i b te ukupnih karotenoida smeđe alge *Halopteris scoparia* značajno utječe vrijeme ekstrakcije ( $p \leq 0,05$ ) dok parametri temperature ekstrakcije i snage mikrovalova nemaju značajan utjecaj (Tablica 6).

Povećanjem vremena MAE povećava se udio ukupnih klorofila a i b te ukupnih karotenoida. Najviši prosječni udio klorofila a ( $17,77 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) i klorofila b ( $9,89 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) te ukupnih karotenoida ( $5,62 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) određen je pri vremenu ekstrakcije od 25 min, a najmanji udjeli klorofila a ( $14,46 \pm 0,27 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) i klorofila b ( $7,84 \pm 0,18 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) te ukupnih karotenoida ( $4,52 \pm 0,14 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) su određeni pri najnižem vremenu ekstrakcije od 5 min. Jedna od glavnih prednosti MAE je vrlo kratko vrijeme ekstrakcije u usporedbi s drugim metodama. Produljeno vrijeme ekstrakcije uzrokuje bubrenje, hidrataciju i mekšanje biljnog tkiva što rezultira povećanjem prinosa, ali kod ekstrakcije termolabilnih spojeva duga ekstrakcija također može dovesti i do degradacije navedenih spojeva (Chan i sur., 2011).

MAE se može provesti u više ciklusa kod dužeg vremena izlaganja uzorka mikrovalovima kada se koristi veći volumen otapala. U ostatak uzorka se dodaje svježe otapalo i postupak se ponavlja čime se dobiva veći prinos ekstrakcije, a pritom se izbjegava dugo zagrijavanje i toplinska degradacija spojeva (Veggi i sur., 2013).

Najveći udio klorofila a ( $16,82 \pm 0,42 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) i klorofila b ( $9,26 \pm 0,26 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) određen je u ekstraktima dobivenim pri temperaturi od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a njihov udio se smanjuje daljnjim povećanjem temperature ekstrakcije na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Efikasnost ekstrakcije povećava se povećanjem temperature do optimalne vrijednosti nakon čega se smanjuje pri višim temperaturama. Također, pri višim temperaturama mogući su i manji prinosi ekstrakcije zbog stvaranja međuprodukata ili moguće degradacije termički osjetljivih spojeva (De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017).

Za razliku od klorofila, najveći prosječni udio karotenoida ( $5,24 \pm 0,18 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) određen je u ekstraktima dobivenim pri najnižoj temperaturi ekstrakcije od  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  dok se udio ukupnih karotenoida smanjuje daljnjim povećanjem temperature ekstrakcije na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $5,21 \pm 0,18 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ) odnosno na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $5,16 \pm 0,18 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv. uzorka}$ ). No to smanjenje nije statistički značajno što znači ukoliko se ekstrakcija provodi primjenom više temperature ne dolazi do znatnije promjene u udjelu ekstrahiranih ukupnih karotenoida.

Neka istraživanja su pokazala da termička stabilnost karotenoida ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Tako na primjer, violaksantin i anteraksantin su osjetljiviji na visoke temperature od  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotena te  $\beta$ -kriptoksantina (Mäki-Arvela i sur., 2014).

Optimalna temperatura ekstrakcije uvjetovana je dobro odabranom snagom mikrovalova što rezultira boljim učinkom ekstrakcije. Snaga mikrovalova i temperatura međusobno su povezani jer visoka snaga mikrovalova može podići temperaturu sustava i rezultirati povećanjem prinosa ekstrakcije sve dok ne počne opadati. Temperaturu kontrolira snaga mikrovalova koja kontrolira količinu energije koja se daje sustavu, a koja se pretvara u toplinsku energiju u dielektričnom materijalu (Veggi i sur., 2013).

Najveća prosječna vrijednost udjela klorofila a ( $16,61 \pm 0,43$  mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) dobivena je ekstrakcijom primjenom snage mikrovalova 150 W te se primjenom viših vrijednosti snage mikrovalova od 300 W ( $16,31 \pm 0,43$  mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) i 450 W ( $16,12 \pm 0,43$  mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka), vrijednost udjela klorofila a postupno smanjivala. Suprotno tome najveća prosječna vrijednost udjela klorofila b ( $9,28 \pm 0,26$  mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) određena je u ekstraktima dobivenim pri snazi mikrovalova od 450 W, a primjenom nižih vrijednosti snage mikrovalova od 300 W ( $8,80 \pm 0,26$  mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) i 150 W ( $8,70 \pm 0,26$  mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) udio klorofila b je bio manji.

Snaga mikrovalova, posebno u zatvorenim sustavima u izravnoj su vezi s temperaturom i vremenom trajanja ekstrakcije (De la Calle i Costas-Rodríguez, 2017).

4.1.2. Utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na maseni udio ukupnih fenolnih spojeva smeđe alge *Halopteris scoparia*

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenog udjela fenolnih spojeva izoliranih iz smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom MAE prikazani su u tablici 7.

**Tablica 7.** Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE 100 g<sup>-1</sup> suhe tvari uzorka) izoliranih iz smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom MAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Snaga (W)	Ukupni fenoli (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)	
1	10	5	150	131,85 ± 7,17	
2			300	141,38 ± 4,88	
3			450	151,72 ± 4,88	
4		15	150	177,16 ± 5,49	
5			300	197,83 ± 7,31	
6			450	147,48 ± 18,53	
7		25	15	150	171,38 ± 9,05
8				300	171,38 ± 9,05
9				450	205,17 ± 2,44
10	5		150	155,17 ± 0,00	
11			300	154,74 ± 0,61	
12			450	183,94 ± 6,64	
13	25	15	150	176,22 ± 1,79	
14			300	163,36 ± 0,61	
15			450	192,70 ± 2,39	
16	40	25	150	211,25 ± 3,02	
17			300	240,09 ± 1,83	
18			450	216,81 ± 1,83	
19		5	150	179,74 ± 1,83	
20			300	162,04 ± 0,00	
21			450	160,04 ± 3,02	
22	15	150	239,42 ± 0,60		
23		300	180,10 ± 1,21		
24		450	163,79 ± 0,00		
25	25	150	169,40 ± 4,27		
26		300	184,67 ± 1,79		
27		450	212,07 ± 4,88		

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija

Udjeli ukupnih fenolnih spojeva u smeđoj algi *Halopteris scoparia* određeni su u rasponu od  $131,85 \pm 7,17$  do  $240,09 \pm 1,83$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv. (tablica 7). Najveći udio ukupnih fenola određen je u uzorku 17 koji se ekstrahirao 25 min pri temperaturi  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  te snazi mikrovalova 300 W, a najmanji kao i kod klorofila a kod uzorka 1 koji se ekstrahirao 5 min pri temperaturi  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  i snazi mikrovalova 150 W. Kod najniže temperature ekstrakcije udio ukupnih fenola je rastao povećanjem vremena ekstrakcije i snage mikrovalova, a kod najviše temperature ekstrakcije najveći udjeli ukupnih fenola su određeni uglavnom pri nižem vremenu ekstrakcije i snazi mikrovalova.

U istraživanju kojeg su proveli Li i sur. (2012) ispitivao se utjecaj snage mikrovalova (100, 200, 300, 400, 500 i 600 W), temperature (20, 30, 40, 50, 60 i  $70^\circ\text{C}$ ) i vremena ekstrakcije (5, 15, 25, 35, 45, 55 i 60 min) na udio ukupnih fenola u zelenoj algi *Caulerpa racemosa* te su rezultati pokazali da su na udio ukupnih fenolnih spojeva uvelike utjecali snaga mikrovalova, temperatura i vrijeme ekstrakcije. Udio ukupnih fenolnih spojeva je rastao s povećanjem snage mikrovalova, temperature i vremena ekstrakcije te su najveći udjeli fenolnih spojevi određeni pri uvjetima od 200 W ( $58,00 \pm 2,28$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ),  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $61,54 \pm 1,81$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) i 40 min ( $62,28 \pm 1,49$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ). Daljnjim povećanjem snage mikrovalova, temperature i vremena ekstrakcije udio ukupnih fenola se smanjio vjerojatno zbog degradacije fenolnih spojeva.

U drugom istraživanju Li i sur. (2017) istraživao se utjecaj temperature (15, 25, 35, 45, i  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i vremena ekstrakcije (10, 20, 30, 60 i 90 min) na udio ukupnih fenola kod smeđe alge *Sargassum fusiforme*. Učinkovitost ekstrakcije značajno se povećala s povećanjem temperature ekstrakcije s 15 na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , ali se zatim značajno smanjila kako se temperatura povećala s 25 na  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Povećanje temperature može pomoći oslobađanju i otapanju polifenolnih spojeva, ali visoka temperatura također može potaknuti razgradnju polifenola, kao što je oksidacija, i povećati ekstrakciju proteina i polisaharida iz stanične stijenke. Nadalje, učinkovitost ekstrakcije je značajno poboljšana kako se trajanje ekstrakcije povećavalo, te je dosegla maksimum pri 30 min ( $63,35 \pm 0,19$  mg  $\text{g}^{-1}$ ), a zatim se smanjila vjerojatno zbog oksidacije termolabilnih spojeva pri dužem vremenu ekstrakcije. Prema istraživanju Dzah i sur. (2020) temperatura ekstrakcije iznad  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz duže vrijeme povećava brzinu oksidacije fenola i smanjuje prinos ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima. Safari i sur. (2015) su utvrdili da su za ekstrakciju ukupnih fenola iz zelene alge *Chaetomorpha sp.* optimalni uvjeti vrijeme ekstrakcije 8 min, snaga mikrovalova 300 W i kao ekstrakcijsko otapalo 25 %-tni aceton. Prema istraživanju Dang i sur. (2017) na ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva iz smeđe alge *Sargassum vestitum* pomoću MAE značajan utjecaj ima ekstrakcijsko otapalo te veći udjeli

ukupnih fenolnih spojeva su ekstrahirani kada su korištene vodene otopine acetona ( $74,05 \pm 1,39$  mg GAE·g<sup>-1</sup>), metanola ( $59,13 \pm 1,27$  mg GAE·g<sup>-1</sup>) i etanola ( $51,65 \pm 1,1$  mg GAE·g<sup>-1</sup>) dok čista organska otapala nisu bila učinkovita za ekstrakciju fenolnih spojeva. Razlog tomu bi moglo biti bubrenje uzoraka pod utjecajem vode što dovodi do povećanja kontaktne površine između površine materijala i otapala. Također veze između fenolnih spojeva sa staničnom stijenkom alge postaju slabije što povećava topljivost fenolnih spojeva. Nadalje, visok udio organskog otapala u odnosu na vodu rezultirao je s više apsorbirane energije mikrovalova i transformirane u toplinu u uzorku što je dovelo do povećanja kinetike ekstrakcije kao i do smanjenja viskoznosti ekstrakcijskog medija. Ovi čimbenici povećavaju prinos fenolnih spojeva.

Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na udio ukupnih fenolnih spojeva u smeđoj algi *Halopteris scoparia* prikazani su u tablici 8.

**Tablica 8.** Rezultati statističke analize utjecaja parametara MAE na udio ukupnih fenolnih spojeva u smeđoj algi *Halopteris scoparia*

Parametar ekstrakcije	N	Ukupni fenoli (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)
<b>Temperatura (°C)</b>		p=0,0698
<b>10</b>	18	168,04±6,3a
<b>25</b>	18	188,25±6,3a
<b>40</b>	18	183,49±6,3a
<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,0000
<b>5</b>	18	157,86±5,15a
<b>15</b>	18	181,67±5,15b
<b>25</b>	18	200,25±5,15c
<b>Snaga (W)</b>		p=0,9339
<b>150</b>	18	180,17±6,64a
<b>300</b>	18	178,08±6,64a
<b>450</b>	18	181,52±6,64a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

Statistička analiza je pokazala da na udio ukupnih fenolnih spojeva smeđe alge *Halopteris scoparia* značajno utječe vrijeme ekstrakcije ( $p < 0,05$ ), dok parametri snage mikrovalova i temperature ekstrakcije nemaju značajan utjecaj (Tablica 8).

Povećanjem vremena MAE i snage mikrovalova povećava se udio ukupnih fenolnih spojeva. Udio ukupnih fenolnih spojeva pri najkraćem vremenu ekstrakcije od 5 min iznosio je  $157,86 \pm 5,15$  mg GAE 100 g<sup>-1</sup> s.tv., a pri najdužem vremenu ekstrakcije od 25 min iznosio je  $200,25 \pm 5,15$  mg GAE 100 g<sup>-1</sup> s.tv.. Pri temperaturi ekstrakcije od 25 °C određen je najveći

udio ukupnih fenolnih spojeva ( $188,28 \pm 6,3$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv.) koji se smanjuje povećanjem temperature ekstrakcije od  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $183,49 \pm 6,3$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv.). Najveća prosječna vrijednost ukupnih fenolnih spojeva određena je u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom primjenom mikrovalova od  $450 \text{ W}$  ( $181,52 \pm 6,64$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv.), dok su kod nižih vrijednosti snage mikrovalova od  $300 \text{ W}$  ( $178,08 \pm 6,64$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv.) i  $150 \text{ W}$  ( $180,17 \pm 6,64$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  s.tv.) udijeli ukupnih fenolnih spojeva bili manji.

U istraživanju Karami i sur. (2015) udio fenolnih spojeva u korijenu sladića smanjivao se s povećanjem vremena i temperature MAE. Temperatura ekstrakcije utječe na omekšanje biljnog tkiva i oslabljuje interakcije između polifenola i proteina te polifenola i polisaharida što rezultira većom migracijom polifenola u otapalo (Mokrani i Madani, 2016), a smanjenje udjela ukupnih fenola pri temperaturi  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , može biti zbog termolabilnosti fenolnih spojeva pri višim temperaturama (Călinoiu i Vodnar, 2020).

#### 4.2. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE MIKROVALOVIMA SMEĐE ALGE *Halopteris scoparia*

Za utvrđivanje kombiniranog utjecaja parametara ekstrakcije na klorofil a i b, ukupne karotenoide i ukupne fenole smeđe alge *Halopteris scoparia* korišten je puni faktorijalni dizajn te su optimalni uvjeti ekstrakcije prikazani u tablici 9.

**Tablica 9.** Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a i b, ukupnih karotenoida i ukupnih fenola smeđe alge *Halopteris scoparia*

Optimalni uvjeti						
	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Predviđeno	Dobiveno	Poželjnost
<b>Klorofil a (mg <math>100 \text{ g}^{-1}</math> s.tv.)</b>	25	300	25	19,1386	18,5406	0,8619
<b>Klorofil b (mg <math>100 \text{ g}^{-1}</math> s.tv.)</b>	25	300	25	10,0551	9,2896	0,8619
<b>Karotenoidi (mg <math>100 \text{ g}^{-1}</math> s.tv.)</b>	25	300	25	6,1950	5,8508	0,8619
<b>Ukupni fenoli (mg GAE <math>100 \text{ g}^{-1}</math> s.tv.)</b>	25	300	25	240,0862	232,0677	0,8619



Prema statističkoj analizi, optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a i b, ukupnih karotenoida te ukupnih fenola smeđe alge *Halopteris scoparia* su: temperatura 25 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije od 25 minuta (tablica 9).

Pasquet i suradnici (2011) su utvrdili da za ekstrakciju pigmenata iz alge *Dunaliella tertiolecta* je najbolja metoda MAE pri uvjetima: 56 °C, 5 min i 50 W.

#### 4.2.1. HPLC- UV/VIS PDA određivanje pojedinačnih klorofila i karotenoida u ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije

U ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* ekstrahiranom pri optimalnim uvjetima mikrovalne ekstrakcije (temperatura 25 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije 25 minuta) određeni su pojedinačni klorofili (klorofil b, derivat 1 i 2 klorofila, klorofil a, derivati 1 i 2 klorofila a) i karotenoidi (fukoksantin, lutein, derivat luteina, derivat 1, 2 i 3 neoksantina, β-karoten) primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV/VIS PDA detekciju, a rezultati su prikazani u tablici 10 i 11.

**Tablica 10.** Maseni udijeli klorofila (mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) u smeđoj algi *Halopteris scoparia* određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

<b>KLOROFILI</b>	<b>mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.</b>
<b>Klorofil b</b>	126,24
<b>Derivat 1 klorofil b</b>	30,32
<b>Derivat 2 klorofil b</b>	49,23
<b>Klorofil a</b>	223,72
<b>Derivat 1 klorofil a</b>	20,51
<b>Derivat 2 klorofil a</b>	2,40
<b>UKUPNI KLOROFILI</b>	452,41

**Tablica 11.** Maseni udijeli klorofila (mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) karotenoida u smeđoj algi *Halopteris scoparia* određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

<b>KAROTENODI</b>	<b>mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.</b>
<b>Fukoksantin</b>	41,79
<b>Derivat 1 lutein</b>	141,59
<b>Derivat 1 neoksantin</b>	32,20
<b>Derivat 2 neoksantin</b>	39,82
<b>Derivat 3 neoksantin</b>	18,24
<b>Diadinoksantin</b>	8,95
<b>Lutein</b>	21,85
<b>β-karoten</b>	5,34
<b>UKUPNI KAROTENOIDI</b>	309,78

Maseni udio ukupnih klorofila (kao zbroj pojedinačnih spojeva klorofila) u ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* iznosio je 452,30 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv., a najzastupljeniji spojevi bili su klorofil a (223,72 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) i klorofil b (126,24 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) što čini 77,35 % ukupnih klorofila. Derivati klorofila a i b određeni su u rasponu od 2,40 do 49,23 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. Maseni udio ukupnih karotenoida (kao zbroj pojedinačnih karotenoidnih spojeva) u analiziranom ekstraktu iznosio je 309,78 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv., a najzastupljeniji karotenoid bio je derivat luteina (141,59 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) čiji udio je 45,71% ukupnih karotenoida. U nižim udjelima određeni su fukoksantin (41,79 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), derivat 2 neoksantina (39,82 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), derivat 1 neoksantina (32,20 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), lutein (21,85 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), derivat 3 neoksantina (18,24 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), diadinoksantin (8,95 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) te β-karoten (5,34 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) u najmanjem udjelu.

Ozgun i sur. (2015) istraživali su udio pigmenata u smeđim algama uzorkovanih na mediteranskom dijelu obale Turske. Udio klorofila a kod smeđe alge *Cystoseira barbata* iznosio je 1,056 ± 0,20 mg g<sup>-1</sup>, a kod *Cystoseira compressa* 1,297 ± 0,35 mg g<sup>-1</sup> odnosno udio karotena kod *C. barbata* iznosio je 0,180 ± 0,06 mg g<sup>-1</sup>, a kod *C. compressa* 0,234 ± 0,07 mg g<sup>-1</sup> što je niže nego u našim analiziranim ekstraktima. U istraživanju Castro-Puyana i sur. (2016) iz zelene mikroalge *Neochloris oleoabundans* primjenom ekstrakcije otapalima pod

povišenim tlakom ekstrahiran je značajno veći udio karotenoida (45,2 - 142,8 mg/g ekstrakta) nego klorofila (2,3 - 42,7 mg/g ekstrakta), a lutein i karotenoidni monoestri bili su najzastupljeniji karotenoidi koji su predstavljali više od 60% ukupnih karotenoida u svim ekstraktima. Maseni udio luteina i  $\beta$ -karotena u ekstraktima *N. oleabundans* bio je u rasponu od 6,7 do 62,6 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta odnosno od 6,1 do 20,9 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta što je značajno više nego u našem istraživanju. Različit sastav pigmenata u pojedinim algama je rezultat prilagodbe algi na okoliš kako bi se optimizirao proces fotosinteze na različitim dubinama, a posljednjih godina provode se brojna istraživanja na različitim vrstama algi sa različitih staništa koja potvrđuju da morske alge mogu biti bogat izvor pigmenata i drugih bioaktivnih spojeva s antioksidativnim djelovanjem (Safari i sur., 2015).

#### 4.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u ekstraktu smeđe alge

*Halopteris scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije

Vrijednost antioksidacijske aktivnosti ( $\mu$ M Trolox na 100 g suhe tvari uzorka) određene u ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije je prikazana u Tablici 12.

**Tablica 12.** Antioksidacijska aktivnost ( $\mu$ mol Trolox 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka) određena u ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije primjenom DPPH metode

Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Snaga (W)	Antioksidacijska aktivnost ( $\mu$ mol Trolox 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)
25	25	300	2393,57 $\pm$ 2,53

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija

Pigmenti klorofili i karotenoidi su prepoznati kao snažni antioksidansi, a brojna istraživanja potvrđuju da i fenolni spojevi značajno doprinose antioksidacijskoj aktivnosti algi (Safari i sur., 2015). Fukokoksantin ima veću sposobnost uklanjanja DPPH radikala od drugih karotenoida kao što su  $\beta$ -karoten, zeaksantin i lutein u anoksičnim uvjetima nego u aerobnim uvjetima; međutim, ima nižu aktivnost od  $\alpha$ -tokoferola (Koduvayur Habeebullah i sur., 2018). DPPH metoda se koristi za određivanje antioksidacijske aktivnosti i hidrofилnih i lipofilnih antioksidansa. U ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije mikrovalovima antioksidacijska aktivnost je iznosila 2393,57  $\pm$  2,53  $\mu$ mol Trolox 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka. Antioksidativna aktivnost makroalge iz Španjolske, *Hydropuntia cornea* bila je 14,5  $\mu$ mol TE g<sup>-1</sup> s.tv., a *Agarophyton vermiculophyllum* izronjene u Vadenskom

moru (Njemačka) bila je u rasponu od 8,6 do 14,0  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.tv. (Alvarez-Gomez i sur., 2016; Tretiak i sur., 2021) što je niže nego u našem istraživanju. Kod smeđe alge, *Padina minor Yamada* sakupljene s plaže Naiyang (Tajland) antioksidativna aktivnost iznosila je 0,567  $\mu\text{M Trolox}$  (Amornlerdpison i sur., 2007). Ekstrakti algi s većom aktivnošću hvatanja radikala DPPH ukazuju na njihovu sposobnost doniranja vodika (de Lima i sur., 2016). Mnoga istraživanja pokazuju da različite vrste algi imaju visoku antioksidacijsku aktivnost iako rezultati mogu biti varijabilni kao posljedica utjecaja okoliša odnosno različitog podrijetla algi, uzgoja, prisutnosti različitih bioaktivnih spojeva te zbog različitih uvjeta i metoda ekstrakcije (Frazzini i sur., 2022). U zadnje vrijeme MAE se često koristi za ekstrakciju antioksidativnih spojeva iz različitih algi. Tako na primjer, u istraživanju Safari i sur. (2015) MAE je korištena za ekstrakciju antioksidanata iz zelene alge *Chaetomorpha sp.* te je najveća antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom u acetonskom ekstraktu pri uvjetima snage mikrovalova 300 W i vremenu ekstrakcije 8 min. U istraživanju koje su proveli Güner i sur. (2019) utvrđeno je da je antioksidacijska aktivnost smeđe alge *Halopteris scoparia* bila manja u kloroformnim i metanolnim ekstraktima nego u heksanskim ekstraktima (3,72 - 10,29  $\mu\text{g Trolox mL}^{-1}$ ). Mikrovalna snaga, koncentracija otapala, vrijeme ekstrakcije i interakcije između navedenih parametara imaju značajan učinak na antioksidacijsku aktivnost te difuzija antioksidanata iz matrice u okolno ekstrakcijsko otapalo se povećava kada se povećava vrijeme ekstrakcije (Krishnaswamy i dr. 2012).

U istraživanju Aminina i sur. (2020) na vrstama smeđih algi *Agarum*, *Thalassiosiphon*, *Fucus* i *Cystoseira* utvrđeno je da se aktivnost hvatanja radikala povećava s porastom ukupnog sadržaja polifenola. Ekstrakti koji sadrže visoke koncentracije ukupnih fenola također su pokazali snažnu antioksidacijsku aktivnost, što sugerira da bi polifenoli algi mogli biti glavni sastojci odgovorni za antiradikalna svojstva ovih ekstrakata. Međutim, vodeni ekstrakti *Sargassum miyabei* pokazali su manju aktivnost hvatanja DPPH ( $0,8 \pm 0,03$  mg askorbinske kiseline  $\text{g}^{-1}$ ) i ABTS ( $38,6 \pm 2,5$   $\mu\text{mol ekvivalenta Trolox g}^{-1}$ ) radikala u odnosu na etanolne ekstrakte ( $1,1 \pm 0,05$  mg askorbinske kiseline  $\text{g}^{-1}$  za DPPH i  $68,7 \pm 2,3$   $\mu\text{mol ekvivalenta Trolox g}^{-1}$  za ABTS) iako su sadržavali više ukupnih fenola u vodenim ekstraktima od etanolnih ekstrakata. Ovo sugerira da drugi materijali prisutni u vodenim ekstraktima algi, poput pigmenata, proteina ili peptida, mogu utjecati na njihovu aktivnost hvatanja slobodnih radikala.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) pigmentata i fenolnih spojeva smeđe alge *Halopteris scoparia* odnosno utjecaja parametara ekstrakcije (temperature, vremena i snage mikrovalova) na sadržaj klorofila, karotenoida i fenolnih spojeva u ekstraktima alge te prezentiranih rezultata može se zaključiti:

1. U ekstraktima alge *Halopteris scoparia* ukupni klorofili a određeni su u rasponu od 13,04 do 20,01 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, klorofili b od 6,83 do 10,83 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka, ukupni karotenoidi od 3,90 do 6,90 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka te ukupni fenolni spojevi od 31,85 do 240,09 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> s.tv.
2. Najmanji ekstrakcijski prinosi ukupnih klorofila, karotenoida te fenolnih spojeva ostvareni su pri temperaturi 10 °C, vremenu 5 min te snazi mikrovalova 150 W, a veći pri višim temperaturama (25°C, 40 °C) i vremenu ekstrakcije 25 min te snazi mikrovalova 450 W.
3. Na udio klorofila a i b, ukupnih karotenoida i ukupnih fenolnih spojeva alge *H. scoparia* statistički značajno utječe vrijeme ekstrakcije ( $p \leq 0,05$ ).
4. Prema statističkoj analizi, optimalni uvjeti MAE ekstrakcije klorofila a i b, ukupnih karotenoida te ukupnih fenola alge *H. scoparia* su: temperatura 25 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije od 25 minuta.
5. U ekstraktima alge *H. scoparia* ekstrahiranim pri optimalnim uvjetima MAE određeni su pojedinačni klorofili i karotenoidi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti te su najzastupljeniji spojevi bili klorofil a (223,72 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.), klorofil b (126,24 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) i derivat luteina (141,59 mg 100 g<sup>-1</sup> s.tv.).
6. U ekstraktu alge *H. scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima MAE antioksidacijska aktivnost je iznosila  $2393,57 \pm 2,53$  ol Trolox 100 g<sup>-1</sup> s.tv. uzorka.
7. Smeđa alga *Halopteris scoparia* je bogat izvor klorofila, karotenoida i fenolnih spojeva sa antioksidacijskom aktivnosti, a MAE je učinkovita metoda za njihovu ekstrakciju pri čemu se kroz kratko vrijeme ekstrakcije postižu visoki prinosi istraživanih spojeva.

## 6. LITERATURA

Afonso NC, Catarino MD, Silva A, Cardoso SM (2019) Brown Macroalgae as Valuable Food Ingredients. *Antioxidants* **8(9)**, 365. <https://doi.org/10.3390/antiox8090365>

Alvarez-Gomez F, Korbee N, Figueroa FL (2016) Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Mar* **42**, 271-288.

Ambrogi V, Carfagna C, Cerruti P, Marturano V (2017) 4 - Additives in Polymers, U: Modification of Polymer Properties, Carlos F. Jasso-Gastinel, José M. Kenny (ured.), Elsevier Inc., 2017, str. 87-108, ISBN 9780323443531, <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02434-3>

Aminina NM, Karaulova EP, Vishnevskaya TI, Yakush EV, Kim YK, i sur. (2020) Characteristics of Polyphenolic Content in Brown Algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules* **25(17)**, 3909. doi: 10.3390/molecules25173909

Amornlerdpison D, Peerapornpisal Y, Taesotikul T, Jamjai U, Nualchareo M, Kanjanapothi D (2007) Antioxidant activity of *Padina minor yamada*. *KMITL Sci. Tech. J.* **7**, 1.

Anonymus 1, Smeđe alge < <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=1687>> Pristupljeno 20.05.2022.

Anonymus 2, Smeđe alga < <https://www.dalton-cosmetics.com/int/explore-dalton/ingredients-library/brown-algae> > Pristupljeno 20.05.2022.

Anonymus 3, Klasifikacija smeđe alge *Halopteris scoparia* <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=182742> > Pristupljeno 20.05.2022.

Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich K, Özyürek M, Güçlü K (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* **85(5)**. 10.1351/PAC-REP-12-07-15.

Biris-Dorhoi ES, Michiu D, Pop CR, Rotar AM Tofana M, Pop OL, i sur. (2020) Macroalgae- A Sustainable Source of Chemical Compounds with Biological Activities. *Nutr* **12(10)**, 3085. <https://doi.org/10.3390/nu12103085>

Cai J, Lovatelli A, Garrido Gamarro E, Geehan J, Lucente D, Mair G, i sur. (2021) Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, FAO, broj 1229, ISSN 2070-6065

Călinoiu LF, Vodnar DC (2020) Thermal Processing for the Release of Phenolic Compounds from Wheat and Oat Bran. *Biomolecules* **10(1)**: 21. doi:10.3390/biom10010021

Castro-Puyana M, Perez-Sanchez A, Valdes A, Ibrahim OHM, Suarez- Alvarez S, Ferragut JA, i sur. (2016) Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Res Int* **99 (3)**, 1048-1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.021>

Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A*, **1218(37)**, 6213-6225.

Cikoš A, Čož-Rakovac R, Šubarić D, Jerković I, Ačkar Đ, Jokić S (2020) Macroalgae in the Food Industry - Opportunities and Challenges. *Power Eng* **15 (3)**, 14-19.

Cikoš AM, Jokić S, Šubarić D, Jerković I (2018) Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae. *Mar drugs* **16(10)**, 348. <https://doi.org/10.3390/md16100348>

Dang TT, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett CJ (2017) Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga *Sargassum vestitum*, *Sep Sci Technol* **53(11)**, 1711-1723. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1414845>

De la Calle I, Costas-Rodríguez M (2017) Microwaves for greener extraction. U: The application of green solvents in separation processes, Pena-Pereira F, Tobiszewski M. (ured.) Elsevier, Fedor J, str. 253-300,

de Lima RL, dos Santos Pires-Cavalcante KL, de Alencar DB, Viana FA, Sampaio AH, Saker-Sampaio S (2015) In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts obtained from seaweeds endemic to the coast of Ceará, Brazil. *Acta Sci Technol* **38 (2)**, 247-255.

Déléris P, Nazih H, Bard JM (2016) Chapter 10 - Seaweeds in Human Health U: Seaweed in Health and Disease Prevention, Joël Fleurence, Ira Levine (ured.), Academic Press, str. 319-367. ISBN 9780128027721

- Delgado-Vargas, F, Jiménez-Aparicio A, Paredes-Lopez O (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* **40(3)**, 173-289. doi:10.1080/10408690091189257
- Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G, i sur. (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci* **35**, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- Etxebarría N, Zuloaga O, Olivares M, Bartolomé L, Navarro P (2009) Retention-time locked methods in gas chromatography. *J Chromatogr A* **1216(10)**, 1624-1629. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.038>
- Fabrowska J, Messyasz B, Szyling J, Walkowiak J, Łęska B (2017) Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods. *Phycol Res* **66(1)**, 52-57.
- Frazzini, S., Scaglia, E., Dell'Anno, M., Reggi, S., Panseri, S., Giromini, C., i sur. (2022) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Algal and Cyanobacterial Extracts: An In Vitro Study. *Antioxidants* **11**, 992. <https://doi.org/10.3390/antiox11050992>
- Garcia-Perez P, Lourenço-Lopes C, Silva A, Pereira AG, Fraga-Corral M, Zhao C, i sur. (2022) Pigment Composition of Nine Brown Algae from the Iberian Northwestern Coastline: Influence of the Extraction Solvent. *Mar Drugs* **20(2)**: 113. doi: 10.3390/md20020113
- 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
- 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.
- 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 J Pharm Sci* **23(1)**, 1. doi: 10.1186/s40199-015-0089-6



Hakim MM, Patel IC (2020) A review on phytoconstituents of marine brown algae. *Futur J Pharm Sci* **6**, 129.

Horvat AJM (2015) O nazivima spektrometrija i spektroskopija, Imenje i nazivlje u kemiji i kemijskom inženjerstvu, *Kem Ind* **64 (9-10)**, 530–531.

Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2013) Application of novel extraction technologies for extraction of bioactives from marine algae. *J Agric Food Chem* **61(20)**, 4667-4675.

Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2014) Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int J Food Sci Technol* **50**, 24–31. doi: 10.1111/ijfs.12692

Kapooore RV, Butler TO, Pandhal J, Vaidyanathan S (2018) Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. *Biology* **7(1)**, 18. <https://doi.org/10.3390/biology7010018>

Karami Z, Emam-Djomeh Z, Mirzaee HA, Khomeiri M, Mahoonak AS, Aydani E. (2015) Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. *J Food Sci Technol* **52(6)**, 3242-53. doi: 10.1007/s13197-014-1384-9

Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Agric Food Chem* **48(4)**, 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

Koduvayur Habeebullah SF, Surendraraj A, Jacobsen C (2018). Isolation of Fucoxanthin from Brown Algae and Its Antioxidant Activity: In Vitro and 5% Fish Oil-In-Water Emulsion. *J Am Oil Chem Soc* **95**, 835–843. <https://doi.org/10.1002/aocs.12092>.

Kothari V, Gupta A, Naraniwal M (2012) Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts: A comparative study, 1. izd., Lambert Academic Publishing. str. 16-20.

Krishnaswamy K, Orsat V, Gariépy Y, Thangavel K (2012) Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Grape Seeds (*Vitis vinifera*). *Food bioprocess tech* **6(2)**, 1–15.

Kume A, Akitsu T, Nasahara KN (2018) Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? *J Plant Res* **131(6)**, 961-972. <https://doi.org/10.1007/s10265-018-1052-7>

- Leandro A, Pereira L, Gonçalves A (2019) Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Mar drugs*, **18**(1), 17. <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- 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. *Mar drugs* **15**(2), 49. <https://doi.org/10.3390/md15020049>
- Li Z, Wang B, Zhang Q, Qu Y, Xu H, Li G. (2012) Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. *J Appl Phycol* **24**, 1527–1536. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9813-5>
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr protoc food anal chem* **1**(1), <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Luterotti S (2009) Uvod u kemijsku analizu, 3. izd., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 222-223.
- Mäki-Arvela P, Hachemi I, Yu D (2014) Murzin Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. *J Chem Technol Biotechnol* **89**, 1607–1626.
- Malviya R, Bansal V, Pal OP, Sharma P (2010) High performance liquid chromatography: A short review. *J Glob Pharma Technol* **2**, 22-26.
- Menea F, Wijesinghe U, Thiripuranathar G, Althobaiti NA, Albalawi AE, Khan BA, i sur. (2021) Marine Algae-Derived Bioactive Compounds: A New Wave of Nanodrugs?. *Mar drugs* **19**(9), 484. <https://doi.org/10.3390/md19090484>
- Michalak I, Tuhy Ł, Chojnacka K (2015) Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chem* **13**, 1183–119. DOI: 10.1515/chem-2015-0132
- Mokrani A, Madani K (2016) Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Sep Purif Technol* **162**, 68–76.
- Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sc* **22**(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Ozgun S, Tura, F, Çinar ME, Bakir K, Öztürk B, Katağan T, i sur. (2015) Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *J Black Sea/Medit Environ* **21(2)**, 125- 134.

Pasquet V, Cherouvrier JR, Farhat F, Thiery V, Piot JM, Berard JB, i sur. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem* **46**, 59–67.

Patarra RF, Carreiro AS, Lloveras AA, Abreu MA, Buschmann AH, Neto AI (2017) Effects of light, temperature and stocking density on *Halopteris scoparia* growth. *J Appl Phycol* **29**, 405–411.

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290-4302.

Remya RR, Samrot AV, Kumar SS, Mohanavel V, Karthick A, Kumar Chinnaiyan V, i sur. (2022) Bioactive Potential of Brown Algae. *Adsorp Sci Technol* **12**. <https://doi.org/10.1155/2022/9104835>

Safari P, Rezaei M, Shaviklo AR (2015) The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian gulf green algae (*Chaetomorpha* sp.) using response surface methodology. *J Food Sci Technol* **52(5)**: 2974-81. doi: 10.1007/s13197-014-1355-1

Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* **18**, 757-781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98 (4)**, 828-834.

Silva A, Rodrigues C, Garcia-Oliveira P, Lourenço-Lopes C, Silva SA, Garcia-Perez P, i sur. (2021) Screening of Bioactive Properties in Brown Algae from the Northwest Iberian Peninsula. *Foods* **10(8)**, 1915. <https://doi.org/10.3390/foods10081915>

Sunil P, Sagar NA, Sunil Sharma S, Kumar V (2017) Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, Elhadi M. Yahia (ured.), 2. izd., Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd.

Tretiak S, Schwoerbel J, Ramona B, Buck BH, Enders I, Henjes, J, i sur. (2021). Optimizing antioxidant activity in *Agarophyton vermiculophyllum* for functional packaging. *Algal Res* **54**, 102232. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102232>.

Tyutereva E, Alexandra I, Voitsekhovskaja O (2014) On the role of chlorophyll b in ontogenetic adaptations of plants. *Biol Bull Rev* **4**, 507-514. <https://doi.org/10.1134/S2079086414060073>.

Veggi PC, Martinez J, Meireles MA (2013) Fundamentals of Microwave Extraction U: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds, Chemat, F., Cravotto, G. (ured.), Springer, New York, str. 15-53.

Wehr JD (2015) Brown Algae. U: John D. Wehr, Robert G. Sheath and J. Patrick Kociolek (ured.) *Freshwater Algae of North America*, 2 izd., Academic Press, str. 851-871

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LEA JANKOV izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis