

# Utjecaj tehnike i parametara ekstrakcije na prinos pigmenata iz algi Jadranskog mora

---

**Kovačec, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:159:007152>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2023.

Lucija Kovačec

**UTJECAJ TEHNIKE I  
PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA  
PRINOS PIGMENATA IZ ALGI  
JADRANSKOG MORA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva u Centru za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju u Zadru Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Zorana Zorića, te uz pomoć dr.sc. Zrinke Čošić.



Ovo istraživanje je provedeno u okviru znanstvenog Centra izvrsnosti za bioprospecting Jadranskog mora (BioProCro) na projektu BioProspecting Jadranskog mora (KK.01.1.1.01.0002) financiranog sredstvima Europske unije.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojem mentoru izv.prof.dr.sc. Zoranu Zoriću na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima, pristupačnosti te uloženom vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, veliko hvala dr.sc. Zrinki Čošić na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno hvala mojim roditeljima, sestri, bratu i prijateljima 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: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

## UTJECAJ TEHNIKE I PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA PRINOS PIGMENATA IZ ALGI JADRANSKOG MORA

Lucija Kovačec, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212582

### Sažetak:

Alge predstavljaju izvor mnogih bioaktivnih spojeva kojima se pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje, a jednu od značajnijih skupina bioaktivnih molekula čine pigmenti klorofili i karotenoidi. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj tehnike ekstrakcije, snage, trajanja i temperature ekstrakcije na prinos klorofila i karotenoida iz pet različitih vrsta algi (*Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*) te utvrditi optimalne parametre ekstrakcije pri kojima se dobivaju najveći prinosi pigmentata. Ekstrakcija se provela primjenom ultrazvuka i mikrovalova, a obje tehnike provele su se korištenjem 96 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala pri 30 °C, 25 minuta i 530 W te pri 50 °C, 30 minuta i 400 W. Udjeli pigmentata određeni su visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom. Rezultati su pokazali da su alge *Dictyota dichotoma* i *Dictyota fasciola* vrlo dobar izvor pigmentata te da su mikrovalovi pokazali bolji učinak na prinos pigmentata, dok su učinci ostalih parametara ovisili o vrsti alge.

**Ključne riječi:** ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, alge, HPLC metoda, antioksidacijska aktivnost, pigmenti

**Rad sadrži:** 58 stranica, 15 slika, 14 tablica, 117 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Zoran Zorić

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Zrinka Čošić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:** (Napomena: članovi povjerenstva se predlažu u obrascu OB-US-13-01, a u diplomski rad unose tek nakon sjednice Odbora)

1. prof. dr. sc. Sandra Balbino (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Zoran Zorić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (član)\*
4. doc. dr. sc. Maja Repajić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 25. svibnja 2023.

## 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:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### INFLUENCE OF EXTRACTION TECHNIQUE AND PARAMETERS ON THE YIELD OF PIGMENTS FROM ALGAE OF THE ADRIATIC SEA

*Lucija Kovačec*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212582

#### **Abstract:**

Algae are the source of many bioactive molecules and one of the most significant groups of bioactive molecules are compounds from chlorophyll and carotenoid groups. The aim of this research was to determine the influence of extraction technique, power, duration and temperature on the yield of chlorophyll and carotenoids from five types of algae (*Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* and *Dasycladus vermicularis*) and to determine the optimal extraction parameters. Extraction was carried out using ultrasound and microwaves, using 96 % ethanol, at 30 °C, 25 minutes and 530 W and at 50 °C, 30 minutes and 400 W. The concentrations of pigments were determined with high-performance liquid chromatography. The results have shown that *Dictyota dichotoma* and *Dictyota fasciola* are very good sources of pigments and that microwaves had a better effect on the yield of pigments, while the effects of other parameters depended on the type of algae.

**Keywords:** ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, algae, HPLC method, antioxidant activity, pigments

**Thesis contains:** 58 pages, 15 figures, 14 tables, 117 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:** Zoran Zorić, PhD, Associate professor

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

#### **Reviewers:**

1. Sandra Balbino, PhD, Full professor (president)
2. Zoran Zorić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (member)
4. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** May 25<sup>th</sup>, 2023



<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. ALGE.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Dictyota fasciola</i> .....	5
2.1.2. <i>Dictyota dichotoma</i> .....	6
2.1.3. <i>Cutleria multifida</i> .....	7
2.1.4. <i>Fucus virsoides</i> .....	7
2.1.5. <i>Dasycladus vermicularis</i> .....	8
<b>2.2. PIGMENTI U ALGAMA .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Karotenoidi .....	9
2.2.2. Klorofili .....	10
<b>2.3. TEHNIKE EKSTRAKCIJE PIGMENTA.....</b>	<b>11</b>
2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije .....	11
2.3.2. Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>16</b>
3.1.1. Uzorak.....	16
3.1.2. Kemikalije.....	16
3.1.3. Aparatura .....	17
3.1.4. Pribor .....	17
<b>3.2. EKSTRAKCIJA PIGMENATA .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. UAE .....	18
3.2.2. MAE.....	19
3.2.3. HPLC određivanje klorofila i karotenoida.....	20
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom .....	23

3.2.6.	Obrada podataka .....	25
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>26</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>48</b>

# 1. UVOD

Oceani i mora prekrivaju više od 70 % površine Zemlje, a morski organizmi čine otprilike polovicu ukupne globalne bioraznolikosti što navodi znanstvenike da sve više istražuju i dalje nedovoljno istraženi svijet morskih organizama. Morske vrste prepoznate su kao bogati izvori funkcionalnih sastojaka kao što su polinezasićene masne kiseline, polisaharidi, prirodni pigmenti, esencijalni minerali, vitamini, enzimi i bioaktivni peptidi (Shahidi i Rahman, 2018; Kim i Wijesekara, 2010).

Iako se dugo koriste u prehrani te kao tradicionalni lijekovi na istočnoj hemisferi, morske alge još se uvijek smatraju nedovoljno iskorištenim biljnim resursima (Heo i sur., 2009). Posljednjih godina pokazalo se da mnogi metaboliti izolirani iz algi posjeduju biološku aktivnost te mnoge potencijalne zdravstvene koristi zbog čega se pojavio novi trend izolacije i identifikacije spojeva iz morskih algi.

Među ovim spojevima posebnu pažnju zadobili su prirodni pigmenti kojima su alge bogate, a koji osim fotosintetskih i pigmentacijskih učinaka također imaju i zdravstvene učinke kao što su antioksidacijski, antikancerogeni, protuupalni, itd. Prirodni pigmenti široko su rasprostranjeni, ne samo u morskim algama, već i u svim živim tvarima kao što su sisavci, gljive i beskralješnjaci (Delgado-Vargas i sur., 2000). Alge su bogate trima vrstama pigmenata: klorofilima, karotenoidima i fikobiliproteinima. Na temelju sadržaja pigmenata, morske alge mogu se klasificirati u smeđe, crvene i zelene alge (Khan i sur, 2010). Iz tog razloga različiti su prirodni pigmenti izolirani iz morskih algi privukli veliku pozornost u područjima prehrane, kozmetike i farmakologije (Pangestuti i Kim, 2011).

S ciljem ekstrakcije ovih spojeva iz algi, u današnje vrijeme teži se novijim metodama kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima koje će biti detaljnije opisane i korištene u ovome radu. Ove nekonvencionalne metode omogućuju kraće vrijeme trajanja, veće prinose, nižu cijenu, manji utrošak otapala i manji utrošak energije što ih čini održivijima i ekološki prihvatljivijima. Stoga je cilj ovog istraživanja odrediti utjecaj tehnike ekstrakcije, snage, trajanja i temperature ekstrakcije na prinos klorofila i karotenoida iz pet različitih vrsta algi (*Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*) te utvrditi optimalne parametre ekstrakcije pri kojima se dobivaju najveći prinosi pigmenata. Ekstrakcija će se provesti primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Obje tehnike

ekstrakcije provest će se korištenjem 96 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala pri temperaturama 30 i 50 °C kroz dva različita vremena ekstrakcije (25 i 30 minuta) te pri snazi od 500 i 430 W.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ALGE

Alge (lat. *algae*) u najširem smislu obuhvaćaju sve autotrofne organizme na nižem razvojnem stupnju koji u svojem tijelu sadrže klorofil, zbog kojega velik dio algi ima upravo zelenu boju. Neke alge izgledom podsjećaju na biljke, no one nemaju pravo korijenje, stabljiku listove i sustav žila, već se njihovo tijelo naziva talus. Sličnost sa biljkama je da imaju stanice koje sadrže plastide, vakuole i stanične stijenke (Barsanti i Gualtieri, 2014). Alge su s filogenetskog gledišta vrlo heterogena skupina organizama. Dio njih, u okviru nadcarstva *Procaryota* pripada carstvu *Monera*, a dio njih, u okviru nadcarstva *Eucaryota*, pripada carstvima *Protista* i *Vegetabilia* (Hrvatska enciklopedija, 2021).

Nastale su i razvijale se u vodi, stoga se i najveći broj vrsta danas nalazi u vodenoj sredini. One vrste koje su se tijekom evolucije ipak adaptirale na život izvan vode nalaze se na vlažnim i osvijetljenim staništima. Alge koje lebde ili plutaju u vodi čine plankton te žive u osvijetljenim područjima svih vodenih tijela, uključujući i pod ledom u polarnim područjima, dok one koje su pričvršćene za dno čine bentos. Bentoske alge mogu rasti pričvršćene na kamenju, na blatu, pijesku, na drugim algama, biljkama ili životinjama (Barsanti i Gualtieri, 2014). Predstavljaju važan čimbenik osnovnih bioloških procesa kruženja tvari i protjecanja energije te su osnovni primarni proizvođači organskih tvari u vodi. Imaju značajnu ulogu prozračivanja vodenih biotopa, a procesom fotosinteze stvaraju organske tvari iz ugljikova dioksida (CO<sub>2</sub>) i vode (H<sub>2</sub>O) pomoću svjetlosne energije i klorofila uz istodobno izlučivanje kisika koji služi za disanje vodenim organizmima. Poznati su indikatori stanja u okolišu zbog svoje brze reakcije na promjene u istom. Prve reagiraju pa omogućuju predviđanje promjena i tako poduzimanje mjera prije nego li se ekološki sustav naruši (Hrvatska enciklopedija, 2021).

Prema građi razlikujemo jednostanične alge koje žive pojedinačno ili u kolonijama te višestanične alge građene od mnogo filamenata udruženih u taluse različitih oblika i struktura. Po načinu prehrane mogu biti heterotrofi, autotrofi ili miksotrofi, koji kombiniraju heterotrofnu

prehranu i fotosintezu (Blaženčić, 1990). Alge se međusobno razlikuju po vrsti pigmenata u stanicama, sastavu stanične stijenke, skladišnim molekulama, načinu razmnožavanja te prisutnosti i izgledu bičeva (Rindi i sur., 2012).

Kategoriziraju se u dvije skupine na temelju njihove veličine i morfologije – mikroalge i makroalge (Griffiths i sur., 2016). Morske makroalge su uglavnom višestanični organizmi koji rastu na čvrstoj podlozi na područjima od plitkog obalnog pojasa, pa sve do većih dubina. S obzirom da rastu samo do dubina na kojima svjetlost može doći do njih kako bi mogle provoditi proces fotosinteze, svjetlost predstavlja ograničavajući čimbenik njihovog rasta. Osim svjetlosti, koja se potpuno apsorbira na dubini od 200 do 400 m, morale su se prilagoditi i ostalim ekstremnim uvjetima morskog okoliša, kao što su salinitet, širok raspon pH, temperatura, zamućenost te koncentracija kisika i ugljikovog dioksida, a kako bi preživjele u ovim uvjetima te vrlo konkurentskom morskome okolišu morale su razviti složene i specifične metaboličke putove (Barsanti i Gualtieri, 2014; Encyclopedia Britannica, 2011). Većina njih proizvodi sekundarne metabolite te su postale vrlo obećavajući alternativni izvor spojeva karakteriziranih širokim spektrom bioloških ponašanja kao što su antibakterijska, antivirusna i antifungalna svojstva (Ganesan i sur., 2019; Yaich i sur., 2013; Marinho-Soriano i sur., 2006). Neki od tih tvari su pigmenti (klorofili, karotenoidi, fikobiliproteini), polisaharidi, zasićene masne kiseline, itd. (Sathasivam i sur., 2017; Dominguez, 2013). Međutim, ne postoji fiksna vrijednost čak ni za isti rod ili vrstu te se može znati samo raspon ili omjer određenog kemijskog spoja u danom taksonu. Antioksidansi predstavljaju najzanimljivije metabolite ekstrahirane iz morskih algi i od velike su važnosti u liječenju raznih teških bolesti (Kohen i Nyska, 2002). Alge proizvode velike količine prirodnih antioksidansa u svrhu zaštite funkcionalnih makromolekula koje se nalaze unutar njihovih stanica od oksidacije putem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) (Duan i sur., 2006; Yuan i sur., 2005; Kuda i sur., 2005; Lim i sur., 2002). Neki od antioksidansa koji se mogu pronaći u algama su askorbinska kiselina, fenoli, flavonoidi, karotenoidi, florotanini i sulfatirani polisaharidi (Corsetto i sur., 2020; Wu i sur., 2010; Plaza i sur., 2008).

Makroalge se na temelju vrste fotosintetskog pigmenta, vrste skladišnog materijala i sastava polisaharida stanične stijenke obično dijele u tri skupine: zelene, crvene i smeđe alge (Alves i sur., 2013; Balboa i sur., 2013).

Zelene alge ili *Chlorophyta* predstavljaju opsežnu skupinu algi koja obuhvaća od mikroskopski sitnih, jednostaničnih oblika koji žive pojedinačno ili u koloniji, nerazgranjenih ili razgranjenih nitastih algi koje formiraju busenčiće, sve do onih složenije građe čije tijelo

nalikuje na razvijene biljke; posjeduju rizoide, kauloide i filoide (Hrvatska enciklopedija, 2021). Evolucijski su povezane s biljkama jer sadrže iste oblike klorofila, a njihove stanične stijenke sadrže celulozu (Encyclopedia Britannica, 2011). Uz karotenoide i ksantofile sadrže klorofil (a i b) koji prevladavaju te su izrazito zelene boje (Burrows, 1991). Razvrstavaju se u devet redova - *Volvocales*, *Chlorococcales*, *Cladophorales*, *Chaetophorales*, *Oedogoniales*, *Siphonales*, *Conjugales* i *Charales*, s otprilike 10 000 vrsta. Uglavnom žive u planktonu i bentosu slatkih voda (oko 90 %), no neke vrste nalaze se i u morskim vodama (Hrvatska enciklopedija, 2021; Arora i Sahoo, 2015). Sadržaj proteina im iznosi preko 20 % te predstavljaju potencijalni izvor komercijalno korisnih biljnih proteina, a neke vrste su bogate vitaminima i mineralima (Dominguez, 2013).

Crvene alge ili *Rhodophyta* su skupina višestaničnih, te iznimno jednostaničnih algi koje imaju raznolike građe steljke, nitaste, perasto ili viličasto razgranjene, krpaste ili člankovite, a neke su raščlanjene u filoide, rizoide i kauloide (Hrvatska enciklopedija, 2021). Predstavljaju drevnu lozu fotosintetskih eukariota koji su nastali endosimbiozom (Dawes, 2016). Uglavnom su svjetlocrvene do ljubičaste boje, te rjeđe crvenoljubičaste ili smeđecrvene (El-Gamal, 2010). Klorofil *a* (u nekih malo klorofila *d*) i karotenoidi prekriveni su jako fluorescirajućim crvenim, u vodi topljivim fikoeritriinom, a u nekih vrsta nalazi se i modri fikocijan. Razvrstane su u šest redova – *Bangiales*, *Nemalionales*, *Cryptonemiales*, *Gigartinales*, *Rhodymeniales* i *Ceramiales*, s otprilike 4000 vrsta. Najčešće žive u moru, i to u toplijim morima, rijetko i u slatkoj vodi ili na kopnu, a jedinstvene su među eukariotskim organizmima po svojoj sposobnosti da žive unutar izvora termalne vode. Za razliku od zelenih i smeđih algi mogu živjeti u vrlo dubokim vodama, te su obično manje; od nekoliko centimetara do jednog metra (Hrvatska enciklopedija, 2021; Encyclopedia Britannica, 2011).

Smeđe alge ili *Phaeophyta* predstavljaju skupinu višestaničnih algi koje po obliku mogu biti nitaste, kožasto-lepezaste, vrpčaste, vrpčasto spljoštene i dihotomski razgranjene ili raščlanjene kao što su tijela viših biljaka. Veličina im varira od 30 cm pa sve do 100 metara kod nekih vrsta. Razvrstavaju su u šest redova - *Ectocarpales*, *Cutleriales*, *Sphacelariales*, *Dictyotales*, *Laminariales* i *Fucales*, s otprilike 2000 vrsta (Hrvatska enciklopedija, 2021). Uglavnom su morski organizmi (95 %) zastupljeni u umjerenim i hladnijim dijelovima oceana, uz iznimku 3 roda koja rastu slatkim vodama (Dawes, 2016). Većina nastanjuje stjenovito, šljunčano i pješčano morsko dno, a neke vrste žive u talusu drugih algi ili na životinjama poput morskih puževa ili spužvi (Hrvatska enciklopedija, 2021; Antolić i sur., 2011). Sadrže male

količine proteina, ali veće količine polifenola i polisaharida. Fenolni spojevi su većinom zaslužni za njihovu antioksidacijsku aktivnost, a istraživanja su potvrdila da smeđe alge imaju relativno značajno viši antioksidacijski potencijal nego crvene i zelene alge (Dang i sur., 2018; Dominguez, 2013). Smeđe alge su vjerojatno najviše istražena skupina algi jer sadrže posebnu skupinu biološki aktivnih fenola zvanih florotanini (Montero i sur., 2014; Balboa i sur., 2013) čija je glavna uloga zaštita algi od biljojeda, bakterija i obraštajućih organizama. Budući da je njihovo antioksidativno djelovanje 10 do 100 puta jače od ostalih polifenola, uključeni su i u zaštitu od oksidativnog oštećenja (Li i sur., 2017; Namvar i sur., 2013). Još jedan razlog zbog kojeg su smeđe alge naširoko istražene je taj da imaju širok spektar pozitivnih bioloških svojstava kao što su UV zaštitna djelovanja te protuupalni, antiangiogeni, antialergijski i antidijabetički učinci (Le Lann i sur., 2016; Leyton i sur., 2016). Najzastupljenije smeđe alge u Jadranskom moru su jadranski bračić (*Fucus virsoides*) te različite vrste iz rodova *Dictyota*, *Laminaria* i *Sargassum* (Verma i sur., 2015).

Pigmenti kod ove vrste algi su: klorofil *a* i *c*,  $\beta$ -karoten te nekoliko ksantofila, od kojih smeđi fukoksantin prekriva ostale pigmente i daje im smeđu boju te se njihovi kromatofori nazivaju feoplastima (Bold i sur., 1987).

Godišnja svjetska berba algi procjenjuje se na više od milijun tona suhe mase, a azijske zemlje, kao što su Japan i Kina proizvode 80 % te količine. U Kini se alge koriste za prehranu, ali i u tradicionalnoj medicini već tisućama godina. Korištenje algi u industriji započelo je u širokim razmjerima u 17. stoljeću u Japanu s proizvodnjom natrijevog i kalijevog hidroksida iz pepela smeđih algi. Čitavo stoljeće poslije, zapadne zemlje počele su iskorištavati alge za ekstrakciju joda i drugih kemijskih spojeva velike ekonomske vrijednosti, kao što su fikokoloidi – tvari poput želatine koje se mogu dobiti iz nekoliko vrsta algi. Fikokoloidi koji se najviše koriste su agar, karagenan i algin (Encyclopedia Britannica, 2011).

#### 2.1.1. *Dictyota fasciola*

*Dictyota fasciola* vrsta je smeđe alge koja pripada obitelji *Dictyotaceae*. Ravna je alga koja može doseći duljinu talusa do 10 cm i širinu do 0,5 cm. Smeđe je boje, ali naginje ka maslinasto zelenoj boji. Rubovi talusa su joj zaobljeni, a ona stoji uspravno u vodi (Tronholm i sur., 2010) (slika 1).



**Slika 1.** *Dictyota fasciola* (Renoult, 2018)

### 2.1.2. *Dictyota dichotoma*

*Dictyota dichotoma* vrsta je smeđe alge koja pripada porodici *Dictyotaceae* i česti je stanovnik Jadranskoga mora. Uspravnog je talusa u obliku vrpce te maslinastozelene, smeđe do žute boje, pravilnog dihotomskog razgranjenja. Nastanjuje obalni pojas tijekom cijele godine, a karakteriziraju je odvojeni busenčići koji na završetcima reflektiraju plavkasto-zelenkastu boju. Upotrebljava se u životinjskoj i ljudskoj prehrani, ali i za dobivanje alginata (Mejdandžić, 2015) (slika 2).



**Slika 2.** *Dictyota dichotoma* (Azevedo, 2022 )



### 2.1.3. *Cutleria multifida*

*Cutleria multifida* vrsta je smeđe alge koja pripada obitelji *Cutleriaceae* te broji jako puno vrsta i varijeteta. Raste tijekom ljeta i zime u gornjem obalnom pojasu na područjima koja su dobro osvijetljena. Uglavnom raste u busenima ili kao epifit na rodu *Cystoseira* (Mejdandžić, 2015) (slika 3).



**Slika 3.** *Cutleria multifida* (Martin, 2021)

### 2.1.4. *Fucus virsoides*

*Fucus virsoides* ili jadranski bračić endemična je smeđa alga iz Jadrana koja pripada obitelji *Fucaceae* te se može naći poglavito u sjevernom dijelu Jadrana. Raste na stijenama uz morsku obalu u zoni mediolitorala na mjestima jakih udara valova. Izuzetno preferira čisto stanište te je jedan od najvažnijih bioindikatora čistog mora, ali može se pronaći i u lukama (na primjer otok Krk). Boja mu je tamnosmeđa do maslinastosmeđa te ima sluzavo tijelo kojim se štiti od isušivanja u vrijeme oseke. Karakteriziraju ga lepezasto razgranati listovi, a može doseći duljinu od 10 do 15 centimetara (Mejdandžić, 2015) (slika 4).



**Slika 4.** *Fucus virsoides* (Gljušćić, 2016)

#### 2.1.5. *Dasycladus vermicularis*

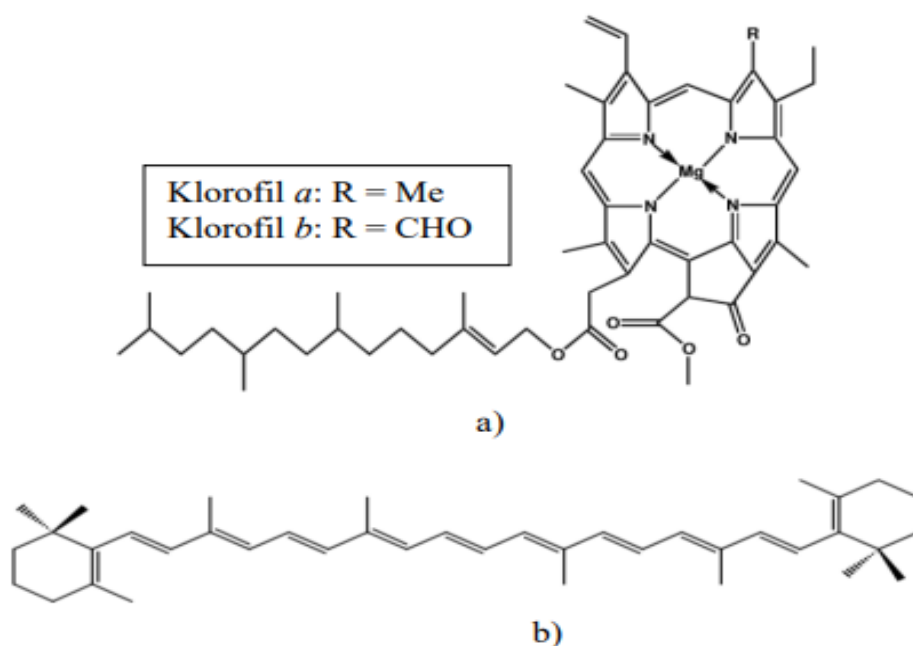
*Dasycladus vermicularis* jako je česta zelena alga obalnog pojasa koja pripada obitelji *Dasycladaceae*. Ima kijačasti talus visine do 50 mm te debljine 5 mm, a na dodir je baršunasta (slika 5). Raste tijekom cijele godine u gustim naseljima na tvrdim podlogama koje se nalaze na dobro osvijetljenim mjestima (Mejdandžić, 2015).



**Slika 5.** *Dasycladus vermicularis* (Bárcenas Graniel, 2017 )

## 2.2. PIGMENTI U ALGAMA

Pigmenti u algama dijele se na tri osnovne skupine: karotenoide, klorofile (slika 6) i fikobiliproteine (Pangestuti i Kim, 2011), a ovisno o tome koja skupina pigmentata je dominantna dodijeljeni su i nazivi različitim skupinama algi. Ovi prirodni pigmenti smatraju se potencijalnim zamjenama za umjetna bojila koja se koriste u hrani. Osim što se koriste kao prirodna bojila, ovi pigmenti pridonose antioksidativnom, antikancerogenom, neuroprotektivnom i protuupalnom djelovanju te utječu na pretilost (Wijesinghe i Jeon, 2013; Pangestuti i Kim, 2011).



**Slika 6.** Shematski prikaz struktura: a) klorofila a i b; b) karotenoida (prema Sumanta i sur., 2014)

### 2.2.1. Karotenoidi

Karotenoidi predstavljaju skupinu najraširenijih pigmentata u prirodi te se nalaze u gotovo svim algama. Oni su tetraterpeni ( $C_{40}$ ) sastavljeni od 8 izoprenskih jedinica koji se dijele na dvije strukturne skupine: karotene i ksantofile. Karoteni su nezasićeni ugljikovodici s izmjeničnim dvostrukim vezama, a najpoznatiji predstavnici karotena su  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten i likopen. S druge strane, ksantofili su oksidirani derivati karotena koji sadrže jednu ili više funkcionalnih skupina sa kisikom koji može biti prisutan u obliku alkohola, ketona, kombinacije alkohola i ketona ili estera alkohola (Saini i Keum, 2018; Poojary i sur., 2016; Cuellar-Bermudez i sur.

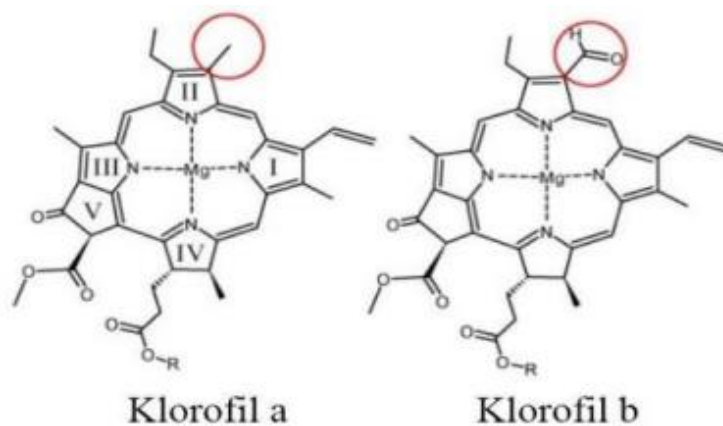
2015). Karotenoidni pigmenti odgovorni su za crvenu, narančastu ili žutu boju brojnih namirnica. Koriste se kao bojila hrane, a odlikuje ih i antioksidativni, antikancerogeni i mnogi drugi pozitivni učinci na zdravlje (Krinsky i Johnson, 2004).

Mikroalge i makroalge su jedinstven i održiv izvor karotenoida te zbog toga raste zanimanje za njih kao sirovine. Makroalge su važan izvor karotenoida fukoksantina, luteina,  $\beta$ -karotena i sifinoksantina, od kojih je fukoksantin jedan od najzastupljenijih karotenoida koji predstavlja oko 10 % ukupne proizvodnje karotenoida u prirodi (Safafar i sur., 2015, Pangestuti i Kim, 2011).

### 2.2.2. Klorofili

Klorofili su skupina pigmenata čiju osnovnu strukturu čini porfirinski prsten koji je sastavljen od četiri povezana pirolna prstena, dok peti prsten nastaje ciklizacijom bočnog lanca na prstenu III. U središtu molekule nalazi se ion magnezija ( $Mg^{2+}$ ) vezan s 4 koordinacijske veze na dušikove atome pirolnih prstena (Chakdar i Pabbi, 2017). Na četvrti prsten vezan je fitol esterskom vezom te je njegov dugački hidrofobni lanac zaslužan za topljivost klorofila u lipidima (González, 2001).

Četiri su vrste klorofila nađene u morskim algama: klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *c* i klorofil *d*, od kojih je najvažniji klorofil *a* jer je neophodan za proces fotosinteze (Pangestuti i Kim, 2011). Klorofil *a* se od klorofila *b* razlikuje po tome što na drugom pirolnom prstenu klorofil *a* kao supstituent ima metilnu skupinu, dok klorofil *b* ima aldehidnu skupinu (slika 7). Ove razlike u strukturi razlog su njihovim drugačijim svojstvima apsorpcije. Naime, klorofil *a* apsorbira većinu energije iz valne duljine od ljubičaste, plave i narančasto-crvene svjetlosti (Pangestuti i Kim, 2011; Hosikian i sur., 2010). Također, klorofil *a* manje je termostabilan u odnosu na klorofil *b* te klorofili, koji inače daju zelenu boju algama, tijekom procesiranja hrane prelaze u feofitin, feoforbid i pirofeofitin. Ovi spojevi posjeduju antitumorigena i antioksidacijska svojstva jer prekidaju reakcije slobodnih radikala do kojih dolazi zbog autooksidacije putem mehanizma kojemu je donor vodik (Ferruzzi i sur., 2002).



**Slika 7.** Prikaz kemijske strukture klorofila *a* i klorofila *b*

(prema Saito i sur., 2018)

## 2.3. TEHNIKE EKSTRAKCIJE PIGMENTA

### 2.3.1. Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Ekstrakcija predstavlja proces potpunog ili djelomičnog izdvajanja neke tvari iz smjese pomoću određenog otapala tijekom čega dolazi do prijenosa tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo, a tvar koja se ekstrahira mora biti više topljiva u otapalu nego što je u polaznoj fazi (Wang i Weller, 2006). Vrlo je važno odabrati točno odgovarajuće otapalo za tvar koju se želi ekstrahirati, pri čemu se gledaju parametri i značajke otapala kao što su: polarnost, temperatura vrelišta, viskoznost, stabilnost na svjetlo, kisik i toplinu, cijena te sigurnost pri korištenju (Albu i sur., 2004). Osim otapala, na iskorištenje procesa ekstrakcije utječu i veličina čestica, tlak, temperatura, pH i vrijeme te kemijske i fizikalne karakteristike samog uzorka poput onih o kojoj se vrsti alge radi te udjelu vode (Jeon i sur., 2012; Conde i sur., 2010). Najčešće korištena otapala za ekstrakciju su metanol, etanol, aceton, etil-acetat i voda (Xu i Chang, 2007).

Od konvencionalnih metoda ekstrakcija najviše se koriste: ekstrakcija otapalom/ima, ekstrakcija uljima, maceracija, direktna destilacija, destilacija vodenom parom ili vodom i parom te hladno prešanje (Blekić i sur., 2011). Pigmenti iz algi se najčešće ekstrahiraju upravo konvencionalnim metodama, kao što je to ekstrakcija po Soxhletu. Nedostatak ovih metoda je taj što su dugotrajne, imaju niske prinose ekstrakcije, mogu uzrokovati razgradnju termolabilnih spojeva te se koriste velike količine otapala, što ove metode čini skupima i ekološki

neprihvatljivima (Devgun i sur., 2012).

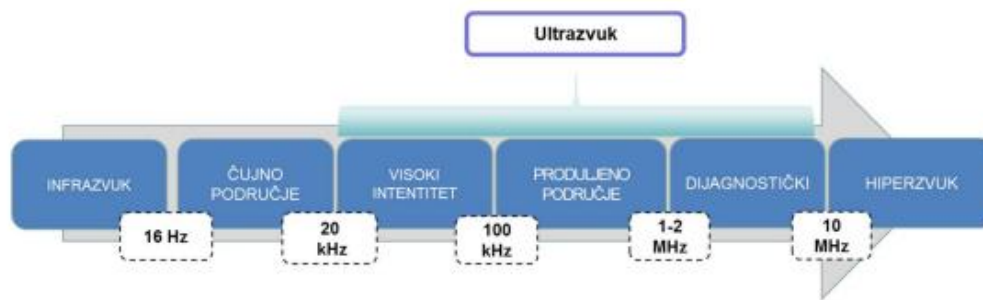
### 2.3.2. Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije

Upravo zbog navedenih nedostataka metoda konvencionalne ekstrakcije razvijene su nove metode ekstrakcije kao što su: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *Ultrasound Assisted Extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave Assisted Extraction*, MAE), enzimska ekstrakcija (eng. *Enzyme Assisted Extraction*, EAE), ekstrakcija superkričnim tekućinama (eng. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (eng. *Pulse Electric Field*, PEF), ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (eng. *High Voltage Electrical Discharge*, HVED) te ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE).

Prednosti ovih novih metoda ekstrakcije su: kraće trajanje, veći prinosi, niži troškovi, bolja selektivnost, automatizacija procesa, smanjena upotreba otapala, a time i veća ekološka prihvatljivost (Kadam i sur., 2013).

#### 2.3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Tehnika ekstrakcije potpomognute ultrazvukom temelji se na primjeni ultrazvučnih valova na matriks uronjen u tekući medij, izazivajući pucanje staničnih stijenki i otpuštanje molekula koje nas zanimaju (Chemat i sur., 2017a). UAE je vrlo korisna za ekstrakciju mnogih bioaktivnih spojeva jer daje visoke prinose bez ometanja integriteta spojeva, budući da se temperatura kontrolira tijekom cijelog postupka ekstrakcije (Dey i Rathod, 2013). Ultrazvučni valovi spadaju u zvučne valove frekvencija viših od 16 kHz, tj. iznad praga čujnosti ljudi, što je prikazano na slici 8 (Dujmić i sur., 2013).



**Slika 8.** Raspodjela frekvencijskog područja (prema Dujmić i sur., 2013)

Ultrazvuk se može podijeliti na ultrazvuk visokog i ultrazvuk niskog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta ili dijagnostički ultrazvuk radi na frekvencijama višim od 2 MHz (Mason i Luche, 1996). Ne uzrokuje fizičke ni kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen te se iz tog razloga smatra neinvazivnom tehnikom, a koristi se kao analitička tehnika. Ultrazvuk visokog intenziteta radi u rasponu frekvencija od 20 do 100 kHz te može uzrokovati fizičke promjene na materijalu i određene kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen (Režek Jambrak i sur., 2010; Povey i Mason, 1998).

Tijekom širenja zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije te ekspanzivnih vrtloga. Rezultat oscilacija tlaka u mediju je oscilacija mjehurića koji uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije (Suslick, 1990). U trenutku kada mjehurić dosegne kritičnu veličinu, on ne može više efikasno apsorbirati energiju te se šupljina ne može samoodržavati i mjehurić se uruši sam u sebe (Suslick, 1994). Kavitacija uključuje stvaranje, rast i snažno puknuće mjehurića ili praznina u tekućini kao rezultat fluktuacije tlaka. Upravo zbog efekta kavitacije ultrazvuk visoke snage dovodi do oštećenja stijenke na materiju koje rezultira poboljšanim prijenosom mase i olakšanim prodiranjem otapala u materijal te samim time i do većeg prinosa ekstrakcije (Vinatoru, 2001).

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može se provoditi na dva načina:

- u ultrazvučnoj kupelji;
- u uređaju određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij koji želimo ekstrahirati.

U laboratorijima se česte koriste ultrazvučne kupelji zbog svoje dostupnosti i cijene. Elementi pretvornika smješteni su na dnu spremnika, a većina ultrazvučnih kupelji radi u frekvencijskom rasponu od 20 do 40 kHz, iako postoje i izvedbe u višem frekvencijskom području (Brnčić i sur.

2009).

Optimizacija procesa ekstrakcije vrlo je važna kako bi se postigli najbolji prinosi ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Parametri koji se moraju pravilno odabrati i uzeti u obzir su: amplituda (%), ciklus (%), frekvencija (kHz) i nazivna izlazna energija (W) (Brnčić i sur., 2010; Herceg i sur., 2009).

### *2.3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima*

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi građeni od dva međusobno okomita oscilirajuća polja: električnog i magnetnog polja. Frekvencijskog su raspona od 300 MHz do 300 GHz, a valna duljina im je od 1 mm do 1 m (Wang i Weller, 2006). Imaju ograničeni energetska potencijal i ne mogu uzrokovati promjene u strukturama tvari, već uzrokuju samo porast temperature zbog titranja i sudara čestica jednih u druge. Ovaj efekt mikrovalova iskorišten je za kuhanje i sušenje pomoću mikrovalnih pećnica (Blekić i sur., 2011).

MAE djeluje na način da mikrovalovi zagrijavaju cijeli uzorak istovremeno i dolazi do pucanja vodikovih veza čime se potiče rotacija dipola. Kretanje otopljenih iona pospješuje prodiranje otapala u matriks te se tako poboljšava otapanje (Eskilsson i Bjorklund, 2000). Prednosti ove nove tehnike ekstrakcije su: značajno smanjeno vrijeme ekstrakcije, smanjena upotreba otapala, veći prinosi, automatizacija procesa čime se postiže preciznost, pogodna za termolabilne sastojke, mogućnost ekstrakcije sastojaka u tragovima, miješanje tijekom postupka što poboljšava fenomen prijenosa mase. Uređaji za mikrovalnu ekstrakciju sadrže kombinaciju ekstrakcije po Soxhletu i mikrovalne pećnice, čime se povećava efikasnost ekstrakcije (Mandal i sur., 2007).

Danas se najviše koriste dvije vrste komercijalnih sustava mikrovalne ekstrakcije (Kaufmann i Christen, 2002):

- Ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi – pri uvjetima niske ili visoke temperature, tlak ovisi o količini i vrelištu otapala (Cravotto i sur., 2008)
- Ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku

Na efikasnost mikrovalne ekstrakcije veliki utjecaj imaju veličina čestica i njihova raspodjela i tijekom procesa temperatura mora biti točno definirana zbog očuvanja stabilnosti



termolabilnih sastojaka (Eskilsson i Bjorklund, 2000). Povišenjem temperature povećava se efikasnost ekstrakcije samo ukoliko je odabrana temperatura optimalna pri dobro određenoj snazi mikrovalova (Blekić i sur., 2011). Otapalo je također još jedan vrlo bitan faktor efikasnosti ekstrakcije, a izbor ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala da upijaju mikrovalove – poželjno je da otapala imaju visoku dielektričnu konstantu te mogu dobro upijati energiju mikrovalova (Bousbia i sur., 2009). Zbog ovih činjenica, za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima najčešće se koriste otapala poput etanola, metanola i vode jer su dovoljno polarna pa se mogu zagrijavati (Brachet i sur., 2002). Snaga mikrovalova treba biti dobro odabrana da bi se smanjilo vrijeme postizanja potrebne temperature, a da pritom ne dođe do pregrijavanja sustava ili prevelikog tlaka u zatvorenom sustavu. Snage koje se najčešće koriste su: 600 W – 1000 W kod zatvorenog sustava te 250 W kod otvorenog sustava (Kaufman i Christen, 2002).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak

Istraživanje je provedeno na uzorcima algi izronjenih na području Zadarskog arhipelaga u studenom 2021. godine. Nakon dostavljanja uzoraka u laboratorij alge su najprije isprane u slatkoj, a potom u destiliranoj vodi te osušene postupkom liofilizacije na liofilizatoru. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu 0,130 - 0,155 hPa i temperaturi od -30 do 0 °C/18 sati, a izotermna desorpcija pri 20 °C/6 sati. Pomoću električnog mlinca osušene alge su samljevene u prahove pohranjene u staklene posude i čuvani u mraku pri sobnoj temperaturi do provođenja daljnjih analiza.

##### 3.1.2. Kemikalije

- ❖ Etanol, 96 %-tni (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Češka)
- ❖ DPPH  $\geq$  85 % (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ❖ Metanol,  $\geq$  99,9 %-tni (Fisher Chemical, Trinidad i Tobago)
- ❖ Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ (Millipore, SAD)
- ❖ Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina) (Sigma-Aldrich, St Louis SAD)
- ❖ Kalijev persulfat  $\geq$  99 % (Kemika, Hrvatska)
- ❖ ABTS (AppliChem, Njemačka)
- ❖ Metil *tert*-butil eter (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Češka)
- ❖ Standardi:
  - $\alpha$ -karoten (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
  - $\beta$ -karoten (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
  - Lutein (ChromaDex, Los Angeles, SAD)
  - fukoksantin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
  - ksantaksantin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
  - zeaksantin (Biosynth Ltd, Berkshire, Velika Britanija)

- klorofil a (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- klorofil b (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

### 3.1.3. Aparatura

- ❖ Analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Italija)
- ❖ Liofilizator (CoolSafe, Model: 55-9 PRO, Labogene, Danska)
- ❖ Električni mlinac (CM 3260, Grundig, Njemačka)
- ❖ Ultrazvučna kupelj (Elmasonic P, Elma, Njemačka)
- ❖ Uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (ETHOS EASY, Milestone Srl, Italija)
- ❖ Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- ❖ HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies, SAD)

### 3.1.4. Pribor

- ❖ Staklene posude
- ❖ Staklene epruvete
- ❖ Stalci za epruvete
- ❖ Plastične žličice
- ❖ Parafilm
- ❖ Odmjerne tikvice volumena 5 mL, 25 mL i 100 mL
- ❖ Filter-papir
- ❖ Falcon epruvete volumena 25 mL
- ❖ Staničevina
- ❖ Staklene kivete
- ❖ Automatske mikropipete volumena 1-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L
- ❖ Stakleni lijevak
- ❖ Staklene čaše
- ❖ Aluminijska folija

## 3.2. EKSTRAKCIJA PIGMENATA

### 3.2.1. UAE

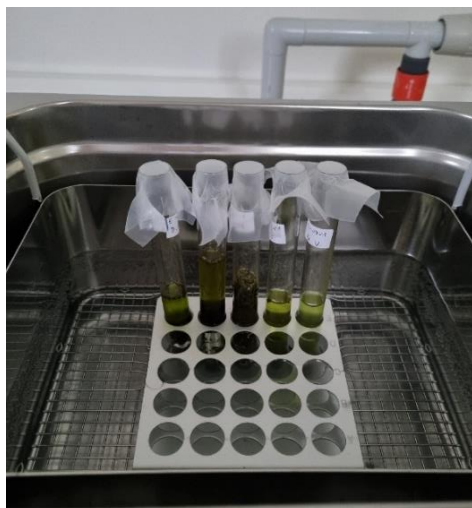
Odvaže se po 1 g usitnjenog uzorka algi na analitičkoj vagi. Odvagani uzorak se prebaci u staklenu epruvetu i doda 10 mL 96 %-tnog etanola. Staklene epruvete s uzorcima i otapalom se zatim pokriju parafilmom. Epruvete svih algi se stave u ultrazvučnu kupelj (slike 9 i 10) te se na njoj postave uvjeti ekstrakcije: temperatura, vrijeme i snaga prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 1.

**Tablica 1.** Uvjeti provođenja UAE i MAE pigmenta iz algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*

EKSTRAKCIJSKA TEHNIKA	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (min.)	SNAGA (W)
UAE	30	25	530
	50	30	400
MAE	30	25	530
	50	30	400



**Slika 9.** Ultrazvučna kupelj (vlastita fotografija)



**Slika 10.** Staklene epruvete s uzorcima u ultrazvučnoj kupelji (*vlastita fotografija*)

Nakon provedene ekstrakcije sadržaj se profiltrira kroz filtar papir Whatman br. 40 (Whatman International Ltd., Velika Britanija) u odmjernu tikvicu od 25 mL te se nadopuni 96 %-tnim etanolom do oznake. Ekstrakti se prebace u falcon epruvete i skladište na +4 °C do provođenja daljnjih analiza.

### 3.2.2. MAE

Na analitičkoj vagi odvaže se po 1 g uzorka algi direktno u ekstrakcijski cilindar. Nakon toga se u tuljac doda 20 mL 96 %-tnog etanola i magnetič te se tuljac montira i stavi u uređaj (slika 11 i 12). U jedan od tuljaca stavi se 20 mL čistog etanola i magnetič zbog kontinuiranog miješanja tuljaca unutar uređaja. Zatim se postave uvjeti ekstrakcije prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 1.



**Slika 11.** Uređaj za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (*vlastita fotografija*)



**Slika 12.** Dijelovi aparature za mikrovalnu ekstrakciju (*vlastita fotografija*)

Nakon provedene ekstrakcije sadržaj tuljca prebaci se u odmjernu tikvicu od 25 mL preko filter papira te nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Ekstrakti se prebace u falcon epruvete i skladište na temperaturi od +4 °C do provođenja daljnjih analiza.

### 3.2.3. HPLC određivanje klorofila i karotenoida

Određivanje pigmenata u uzorcima ekstrakata algi provelo se prema metodi koju su opisali Castro-Puyana i sur. (2017) u aparaturi koja se može vidjeti na slici 13. Prije upotrebe mobilne faze (A, B) se ozračuje u ultrazvučnoj kupelji. Određivanje klorofila i karotenoida primjenom opisane metode temelji se na gradijentnoj eluciji, tijekom koje se ekstrahirani klorofili i karotenoidi eluiraju u nizu padajuće polarnosti. Klorofili se snimaju pri 660 nm, a karotenoidi pri 450 nm.

Parametri kromatografske analize:

Kolona:	C30, 5 $\mu$ m (250 $\times$ 4,6 mm I.D.)
Pretkolona:	DevelosilGuard
Pokretna faza: otapalo A:	MeOH:Metil <i>tert</i> -butileter:voda (90:7:3)
otapalo B:	MeOH: Metil <i>tert</i> -butil eter (10:90, v/v)
Detektor:	UV/VIS PDA
Eluiranje:	gradijentno (prikazano u tablici 2)
Temperatura:	35 °C
Vrijeme trajanja:	52 min

Injektirani volumen: 10  $\mu$ L  
 Protok: 0,8 mL/min  
 Vrijeme uravnoteženja kolone: 2 min

**Tablica 2.** Gradijent za HPLC-UV/VIS/PDA analizu klorofila i karotenoida (Castro-Puyana i sur., 2017)

t(min)	otapalo A	otapalo B	protok (mL/min)
0	100	0	0,8
20	70	30	0,8
35	50	50	0,8
45	20	80	0,8
50	0	100	0,8
52	100	0	0,8

Identifikacija ekstrahiranih pigmenata provedena je uspoređivanjem vremena zadržavanja i spektralnih podataka s onima autentičnih standarda ( $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten, lutein, fukoksantin, ksantaksantin, zeaksantin klorofil a i klorofil b), a u slučaju da je standard nedostupan - uspoređivanjem apsorpcijskog spektra navedenog u literaturi. Kvantifikacija klorofila i karotenoida izračunata je koristeći metodu vanjskog standarda pomoću kalibracijskih krivulja za  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ - karoten, lutein, fukoksantin, ksantaksantin, zeaksantin, klorofil a i klorofil b (tablica 3).

**Tablica 3.** Jednadžbe baždarnih pravaca za standarde korištene u HPLC analizi

Standard	Jednadžba pravca	Koeficijent determinacije, R <sup>2</sup>
$\alpha$ -karoten	$y=75,312x$	0,9896
$\beta$ - karoten	$y=374,11x$	0,9927
lutein	$y=11,86x$	0,9834
fukoksantin	$y=51,483x$	0,9996
ksantaksantin	$y=18,061x$	0,9847
zeaksantin	$y=85,609x$	0,9989
klorofil a	$y=35,932x$	0,9896
klorofil b	$y=13,326x$	0,9683



**Slika 13.** HPLC aparatura (*vlastita fotografija*)

#### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidativni kapacitet 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 stabilnoga DPPH u prisustvu antioksidansa pri čemu dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. Apsorbancija se mjeri na 517 nm.

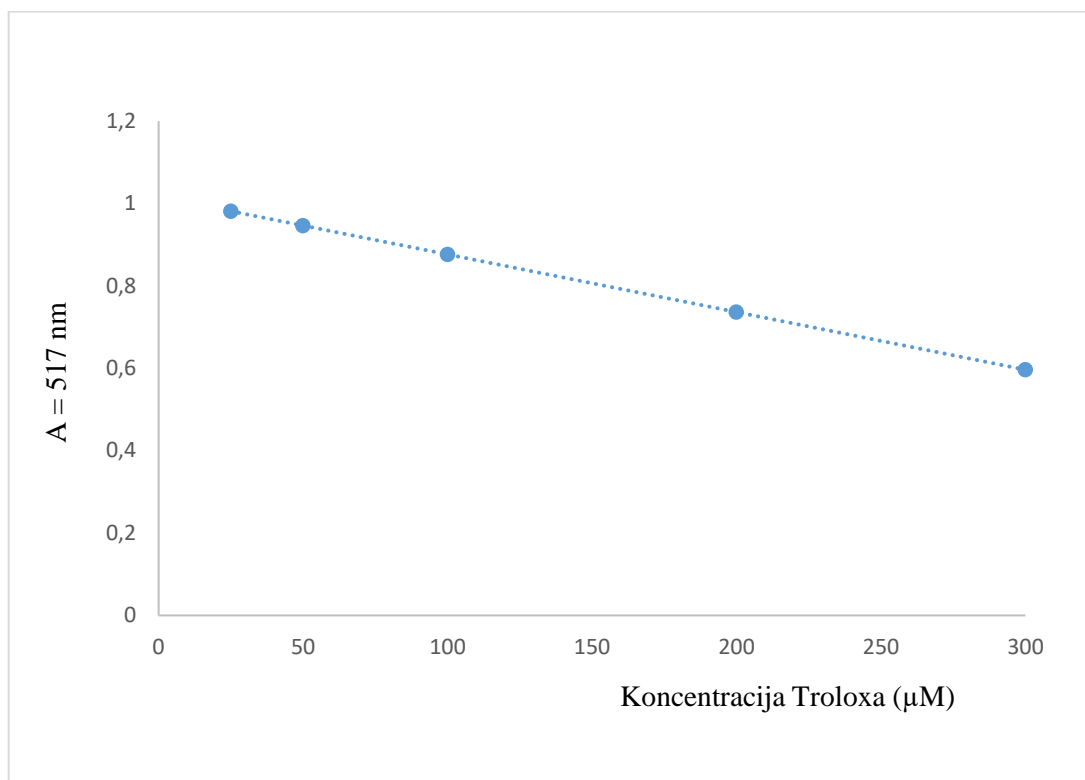
##### Postupak određivanja:

Prije početka određivanja antioksidacijskog kapaciteta pripremi se 0,5 mM otopina DPPH tako da se 0,02 grama DPPH otopi u metanolu u odmjerne tikvici od 100 mL, a zatim se nadopuni metanolom do oznake. U staklenu epruvetu otpipetira se 1 mL ekstrakta uzorka algi, 1 mL metanola, 0,5 mL 0,5 mM otopine DPPH te se ostavi stajati 20 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 20 minuta mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, no osim 1 mL ekstrakta, dodaje se 1 mL metanola.

##### Izrada baždarnog pravca:

Baždarni se pravac izrađuje s razrijeđenim otopinama Troloxa poznate koncentracije: 0, 25, 50, 100, 200 i 300  $\mu\text{M}$  i na temelju izmjerenih apsorbancija pri 517 nm dobije se jednadžba pravca (slika 14).





**Slika 14.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednađba pravca glasi:

$$y = - 0,0014 \cdot x + 1,0164 \quad R^2 = 1 \quad [9]$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

x – ekvivalent Troloxa (µM)

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Antioksidativni kapacitet ekstrakata algi određen je i prema metodi koju su opisali Pellegrini i sur. (2003). Metoda se temelji na sposobnosti molekula antioksidansa da uhvati ABTS, plavo zeleni kromofor sa karakterističnom apsorbancijom na 734 nm, čime reducira ABTS i uzrokuje njegovo obezbojenje.

Reagensi:

1. 140 mM otopina kalijeva persulfata ( $K_2S_2O_8$ ),
2. 7 mM otopina  $ABTS^{*+}$

3. 96 %-tni etanol (v/v).

#### Priprema reagensa:

##### 1. dan

1. 140 mM otopina kalijeva persulfata,  $K_2S_2O_8$  (0,1892 g  $K_2S_2O_8$  izvaže se u tikvicu od 5 mL i otopi u destiliranoj vodi),
2. 7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u tikvici od 5 mL, te nadopuni destiliranom vodom do oznake),
3. stabilna  $ABTS^{•+}$  otopina; Pripremi se tako da se 88  $\mu L$   $K_2S_2O_8$  otopine prenese u tikvicu od 5 mL u kojoj je ABTS otopina. Dobro se promiješa, zatvori i čuva na sobnoj temperaturi u mraku 12-16 sati, zamotano u Al-foliju. Konačna koncentracija  $K_2S_2O_8$  pri tome je 2,45 mmol/L.

##### 2. dan

Na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina  $ABTS^{•+}$ ; 250  $\mu L$   $ABTS^{•+}$  otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni etanolom do oznake.

Podešava se koncentracija  $ABTS^{•+}$  tako da apsorbancija pri 734 nm iznosi  $0,70 \pm 0,02$ .

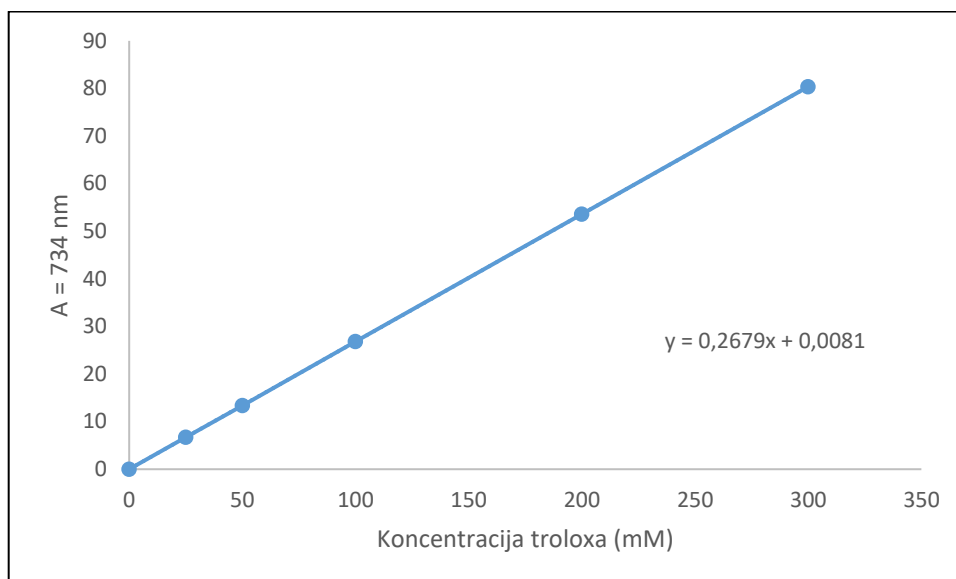
Pripremljena otopina koristi se za spektrofotometrijsko određivanje.

Postupak određivanja:

40  $\mu L$  razrijeđenog uzorka pomiješa se sa 4 mL 1 %-tnog  $ABTS^{•+}$  te se nakon 1 minute mjeri apsorbancija na 734 nm. Za slijepu probu koristi se etanol. Rezultati su izraženi kao  $\mu mol$  TE/100 g uzorka.

Izrada baždarnog pravca:

Baždarni pravac (slika 15) izrađuje se s razrijeđenim otopinama Troloxa poznate koncentracije. Od otopina tih koncentracija otpipetira se 40  $\mu L$  svake i 4 mL 1 %-tne otopine ABTS. Kod slijepa probe umjesto Troloxa otpipetira se 40  $\mu L$  etanola. Oduzimanjem apsorbancije pri 734 nm uzorka od apsorbancije slijepa probe dobije se vrijednost  $\Delta A$ .



**Slika 15.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 734 nm o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,2679 \cdot x + 0,0081 \quad R^2 = 0,9989 \quad [10]$$

Gdje je:

y = izmjerene vrijednosti apsorbancije

x = ekvivalent Troloxa (mmol/L)

### 3.2.6. Obrada podataka

Statistička obrada rezultata provedena je računalnim programom Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft, Redmond, SAD) i Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Parametri analize bili su: ekstrakcijska tehnika (UAE i MAE), temperatura (30 i 50 °C), vrijeme (25 i 30 minuta) te snaga (400 i 530 W), dok su zavisne varijable bili maseni udjeli klorofila i karotenoida te antioksidacijska aktivnost određena DPPH i ABTS metodom. Kontinuirane varijable analizirane su pomoću multivarijantne analize varijance (MANOVA) dok su granične srednje vrijednosti uspoređene Tukeyevim LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila  $\alpha \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Klorofili i karotenoidi imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje. Njihova učinkovitost izolacije iz različitih matriksa ovisi o metodi ekstrakcije, a time i o korištenom otapalu, trajanju ekstrakcije te temperaturi na kojoj je provedena ekstrakcija. Stoga je optimizacija parametara različitih metoda ekstrakcije vrlo važna jer se na taj način smanjuje utrošak energije i otapala, a samim time i cijena procesa.

U ovome radu provedena je ekstrakcija klorofila i karotenoida iz uzoraka algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* primjenom MAE i UAE.

S ciljem optimiranja uvjeta ekstrakcije, radi dobivanja najvećeg prinosa pigmenata, varirani su sljedeći parametri ekstrakcije: temperatura (30 i 50 °C), vrijeme ekstrakcije (25 i 30 min) i snaga (500 i 430 W), a u obje vrste ekstrakcije kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 96 %-tni etanol.

Nakon tretiranja uzoraka mikrovalovima i ultrazvukom, u dobivenim ekstraktima provedeno je kromatografsko određivanje pojedinačnih klorofila i karotenoida primjenom HPLC-UVVIS/DAD metode i određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH i ABTS 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 12.0, a rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Svi prikazani rezultati uspoređeni su sa rezultatima istraživanja koja su se bavila sličnom problematikom.

**Tablica 4.** Rezultati HPLC određivanja karotenoida i klorofila u etanolnim ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola* (D.F.), *Dictyota dichotoma* (D.D.), *Cutleria multifida* (C.M.), *Fucus virsoides* (F.V.) i *Dasycladus vermicularis* (D.V.) dobivenim pomoću UAE i MAE pri temperaturama 30 i 50 °C, trajanju od 25 i 30 minuta i snazi ultrazvuka i mikrovalova 400 i 530 W\*

UZORAK	<i>fukoksantin</i>	<i>neoksantin</i> (derivat 1)	<i>neoksantin</i> (derivat 2)	<i>lutein</i>	<i>lutein</i> (derivat)	<i>zeaksantin</i>	<i>zeaksantin</i> (derivat)	<i>klorofil a</i> (derivat 1)	<i>klorofil a</i> (derivat 2)	<i>klorofil b</i>	<i>klorofil a</i> (derivat 3)	<i>klorofil a</i> (derivat 4)	
	mg/100 g												
<b>UAE</b> 30 °C 25 min 530 W	D.F.	3,22±0,20	4,63±0,35	4,16±0,23	1,19±0,10	1,07±0,20	0,14±0,02	0,45±0,07	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,65±0,87	1,14±0,25
	D.D.	4,90±0,24	2,67±0,25	4,95±0,23	0,00±0,00	1,28±0,09	0,05±0,01	0,29±0,02	0,00±0,00	0,65±0,23	0,00±0,00	6,67±0,06	1,13±0,14
	C.M.	1,75±0,09	1,03±0,19	1,87±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,06	0,00±0,00	0,59±0,19	0,00±0,00	2,90±0,24	0,53±0,06
	F.V.	0,85±0,18	0,83±0,09	1,14±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,13±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,27±0,04	0,00±0,00
	D.V.	0,11±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,99±0,10	0,00±0,00
<b>UAE</b> 50 °C 30 min 400 W	D.F.	1,62±0,10	2,93±0,12	1,71±0,06	0,00±0,00	1,17±0,15	0,00±0,00	0,23±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,57±0,32	0,47±0,05
	D.D.	4,27±0,25	2,83±0,20	3,98±0,20	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,01	0,24±0,09	0,00±0,00	0,52±0,06	0,00±0,00	5,97±0,41	0,84±0,13
	C.M.	1,12±0,08	0,74±0,06	1,11±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,30±0,14	0,00±0,00	2,10±0,08	0,26±0,32
	F.V.	1,71±0,05	1,42±0,35	2,36±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,26±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,50±0,04	0,00±0,00
	D.V.	0,46±0,06	0,37±0,02	0,64±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,59±0,04	0,17±0,06	0,65±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00	3,26±0,10	0,00±0,00
<b>MAE</b> 30 °C 25 min 530 W	D.F.	8,19±0,30	7,45±0,55	12,44±0,98	0,00±0,00	4,84±0,32	0,45±0,04	1,20±0,12	0,00±0,00	0,39±0,02	0,65±0,05	16,22±0,98	2,99±0,21
	D.D.	17,59±1,00	7,22±0,69	16,93±1,25	1,54±0,26	3,09±0,26	0,41±0,03	1,03±0,07	0,00±0,00	3,50±0,19	2,85±0,16	21,21±2,00	4,24±0,30
	C.M.	6,53±0,24	2,97±0,27	7,86±0,40	0,37±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,42±0,06	0,00±0,00	3,30±0,21	1,29±0,07	9,53±0,14	1,90±0,04
	F.V.	5,21±0,15	0,00±0,00	5,56±0,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,18±0,01	0,98±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	13,87±0,65	0,27±0,04
	D.V.	0,55±0,09	0,62±0,07	0,88±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	1,00±0,06	0,34±0,02	1,05±0,14	0,00±0,00	0,56±0,12	5,25±0,32	0,42±0,06
<b>MAE</b> 50 °C 30 min 400 W	D.F.	5,73±0,10	6,43±0,99	7,92±0,32	0,67±0,15	2,79±0,23	0,32±0,02	0,80±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	31,71±3,67	1,68±0,62	0,00±0,00
	D.D.	16,64±1,20	8,69±0,96	14,09±0,86	1,51±0,22	3,06±0,18	0,40±0,03	1,08±0,17	0,00±0,00	0,15±0,03	0,43±0,09	0,17±0,08	0,17±0,02
	C.M.	3,24±0,25	1,81±0,10	3,35±0,23	0,21±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,22±0,09	0,00±0,00	1,00±0,21	0,54±0,17	5,25±0,63	0,93±0,10
	F.V.	4,71±0,19	5,07±0,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,15±0,03	0,86±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	12,38±0,74	0,00±0,00
	D.V.	0,54±0,03	0,00±0,00	0,93±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	0,94±0,07	0,28±0,08	1,01±0,19	0,00±0,00	0,50±0,05	5,01±0,26	0,32±0,04

\*Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 4 može se vidjeti da je HPLC metodom u ekstraktima algi identificirano 12 pigmenata koji su određeni u rasponima: fukoksantin od  $0,11\pm 0,05$  do  $17,59\pm 1,00$  mg/100 g, neoksantin (derivat 1) do  $8,69\pm 0,96$  mg/100 g, neoksantin (derivat 2) do  $16,93\pm 1,25$  mg/100 g, lutein do  $1,54\pm 0,26$  mg/100 g, lutein (derivat) do  $4,84\pm 0,32$  mg/100 g, zeaksantin do  $1,00\pm 0,06$  mg/100 g, zeaksantin (derivat) do  $1,20\pm 0,12$  mg/100 g, klorofil a (derivat 1) do  $1,05\pm 0,14$  mg/100 g, klorofil a (derivat 2) do  $3,50\pm 0,19$  mg/100 g, klorofil b do  $31,71\pm 3,67$  mg/100 g, klorofil a (derivat 3) od  $0,17\pm 0,08$  do  $21,21\pm 2,00$  mg/100 g i klorofil a (derivat 4) do  $4,24\pm 0,30$  mg/100 g. Klorofil b određen je u najvećoj koncentraciji ( $31,71\pm 3,67$  mg/100 g), i to u ekstraktu alge *Dictyota dichotoma* nakon provedene MAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W.

Promatrajući rezultate svih ekstrakata algi vidljivo je da su najzastupljeniji pigmenti klorofil a (derivat 3), zatim neoksantin (derivat 2), fukoksantin i neoksantin (derivat 1), a najmanje zastupljeni klorofil a (derivat 1), zeaksantin, lutein i derivat zeaksantina.

Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Deyab i sur. (2017) gdje navode klorofil a kao najzastupljeniji pigment (55 % ukupnog sadržaja pigmenata) u algi *Dictyota dichotoma*.

Ekstrakti alge *Dictyota dichotoma* prosječno su sadržavali najveće količine pigmenata u odnosu na ekstrakte drugih algi, zatim slijede ekstrakti vrste *Dictyota fasciola* koji su također sadržavali relativno visoke količine pigmenata. Manje količine određene su u ekstraktima vrsti *Culteria multifida* i *Fucus virsoides*, a daleko najmanje količine pigmenata određene su u svim ekstraktima zelene alge *Dasycladus vermicularis*.

U istraživanju koje su proveli Heriyanto i sur. (2017) na smeđim algama *Dictyota dentata*, *Padina australis*, *Sargassum crassifolium* i *Turbinaria conoides* HPLC metodom dobivene su koncentracije klorofila a od  $1,70\pm 0,37$  do  $7,89\pm 0,59$  mg/g suhe tvari i fukoksantina od  $0,43\pm 0,11$  do  $4,11\pm 0,55$  mg/g suhe tvari. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da su koncentracije pigmenata alge *Dictyota dentata* bile više od dva puta veće od koncentracija u ekstraktima drugih algi, što se podudara sa rezultatima našeg istraživanja gdje su ekstrakti vrsti *Dictyota dichotoma* i *Dictyota fasciola* sadržavali daleko veće koncentracije pigmenata od ekstrakata algi *Culteria multifida* i *Fucus virsoides*. Stoga se može zaključiti da su alge iz porodice *Dictyotaceae* dobri potencijalni izvori pigmenata za industrijsku proizvodnju jer su građene od mekih i tankih razgranatih talusa iz kojih se lako ekstrahiraju pigmenti (Heriyanto i sur., 2017)

Usporedbom dobivenih rezultata pokazalo se da je ekstrakcijom potpomognutom

mikrovalovima pri istim parametrima ekstrakcije kao i UAE dobiven veći prinos pigmenata u svim ekstraktima algi osim na prinos luteina iz ekstrakta alge *Dictyota fasciola* i neoksantina (derivat 1) u ekstrakta alge *Fucus virsoides* (30 °C, 25 minuta i 530 W) te klorofila a (derivat 3 i 4) iz algi *Dictyota fasciola* i *Dictyota dichotoma*, klorofila a (derivat 2) iz ekstrakta alge *Dictyota dichotoma*, neoksantina (derivat 2) iz ekstrakta alge *Fucus virsoides* i neoksantina (derivat 1) iz ekstrakta alge *Dasycladus vermicularis* dobivenim pri 50 °C, 30 minuta i 400 W.

Kong i sur. (2014.) su u svom istraživanju pokazali da su optimizirani uvjeti UAE za klorofile iz *C. vulgaris* bili 61,4 °C, 78,7 minuta, 79,4 %-tni etanol i snaga od 200 W.

Povećanje temperature s 30 na 50 °C, produljenje trajanja ekstrakcije s 25 na 30 minuta te smanjenje snage ultrazvuka i mikrovalova s 530 na 400 W utjecalo je na povećanje prinosa pigmenata u ekstraktima, osim u slučaju derivata luteina u ekstraktu alge *Dictyota fasciola*, neoksantina (derivat 1) u ekstraktu alge *Dictyota dichotoma* i svih identificiranih pigmenata u ekstraktima algi *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* nakon provedene UAE, te u slučaju luteina i klorofila b u ekstraktu alge *Dictyota dichotoma*, neoksantina (derivat 1) u ekstraktima algi *Dictyota dichotoma* i *Fucus virsoides*, zeaksantina (derivat) u ekstraktu alge *Dictyota dichotoma* i neoksantina (derivat 2) u ekstraktu alge *Dasycladus vermicularis* nakon provedene MAE.

U istraživanju koje su proveli Razi Parjikolaei i sur. (2014) s ciljem ispitivanja utjecaja SFE na ekstrakciju karotenoida iz alge *Ulva lactuca* naveli su da je povećanje temperature imalo pozitivan utjecaj na količinu ekstrahiranih karotenoida.

**Tablica 5.** Rezultati HPLC određivanja ukupnih karotenoida i klorofila u etanolnim ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* dobivenih pomoću UAE i MAE pri temperaturama 30 i 50 °C, trajanju od 25 i 30 minuta i snazi ultrazvuka i mikrovalova 400 i 530 W\*

Tip ekstrakcije	T (°C)	Vrijeme (min)	Snaga (W)	<i>Dictyota fasciola</i>		<i>Dictyota dichotoma</i>		<i>Cutleria multifida</i>		<i>Fucus virsoides</i>		<i>Dasycladus vermicularis</i>	
				Ukupni karotenoidi	Ukupni klorofili	Ukupni karotenoidi	Ukupni klorofili	Ukupni karotenoidi	Ukupni klorofili	Ukupni karotenoidi	Ukupni klorofili	Ukupni karotenoidi	Ukupni klorofili
				mg/100 g									
UAE	30	25	530	14,98±0,14	7,44±0,49	14,20±0,15	8,22±0,29	4,83±0,13	3,71±0,41	3,04±0,15	2,08±0,24	0,35±0,09	0,88±0,15
	50	30	400	7,84±0,20	3,95±0,16	11,45±0,24	7,15±0,18	2,83±0,20	2,83±0,25	5,82±0,12	4,32±0,23	2,39±0,24	3,51±0,52
MAE	30	25	530	34,72±0,40	20,06±0,16	47,30±0,16	31,62±0,11	10,43±0,23	9,61±0,37	11,94±0,07	13,89±0,30	3,70±0,11	7,48±0,43
	50	30	400	24,35±0,30	33,55±0,41	47,50±0,37	0,85±0,15	8,72±0,14	7,82±0,15	11,14±0,15	13,00±0,13	2,94±0,10	7,04±0,31

\*Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.



Prema podacima prikazanim u tablici 5 vidljivo je da su udjeli ukupnih karotenoida nakon provedene UAE određeni u rasponu od  $0,35\pm 0,09$  (*D. vermicularis*) do  $14,98\pm 0,14$  mg/100 g (*D. fasciola*), a ukupnih klorofila od  $0,88\pm 0,15$  (*D. vermicularis*) do  $8,22\pm 0,29$  mg/100 g (*D. dichotoma*) dok su nakon provedene MAE ukupni karotenoidi određeni u rasponu od  $2,94\pm 0,10$  (*D. vermicularis*) do  $47,50\pm 0,37$  mg/100 g (*D. dichotoma*) te ukupni klorofili od  $0,85\pm 0,15$  (*D. dichotoma*) do  $33,55\pm 0,41$  mg/100 g (*D. fasciola*). Koncentracija karotenoida bila je veća od koncentracije klorofila kod algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma* i *Cutleria multifida* što upućuje na njihovu veću zastupljenost u tkivu ovih algi. Kod alge *Fucus virsoides* određen je veći udio ukupnih karotenoida za ekstrakte dobivene s UAE, dok je kod ekstrakata dobivenih s MAE količina ukupnih klorofila nešto veća. U slučaju ekstrakata lista alge *Dasycladus vermicularis* može se vidjeti veća zastupljenost ukupnih klorofila. Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da su alge *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida* i *Fucus virsoides* smeđe alge koje sadrže i veće količine karotenoida nego klorofila, dok alga *Dasycladus vermicularis* pripada zelenim algama koje su bogatije klorofilima (Burrows, 1991; Bold i sur., 1987). Ipak, analiziranjem rezultata dobivenih nakon provedenih ekstrakcija iz algi koje pripadaju različitim taksonomskim skupinama treba se razmotriti i različiti unutarnji i vanjski utjecaji koji mogu utjecati na njihov sastav. Osim inherentnih karakteristika svake vrste, ekološki čimbenici kojima su alge izložene u svom normalnom ekosustavu, kao što su svjetlost, temperatura, salinitet i kemijski sastav morske vode, također mogu utjecati na njihov sadržaj pigmenata (Lalegerie i sur., 2020). Također, manji sadržaj klorofila može biti povezan s činjenicom da je etanol slabi inhibitor aktivnosti klorofilaze, što je moglo dovesti do snižavanja sadržaja klorofila u uzorcima i, posljedično, do niskih rezultata uočenih za koncentracije klorofila u uzorcima (Connan, 2015).

Može se primijetiti da su ekstrakti alge *Dictyota dichotoma* imale najveći sadržaj i ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida, osim u slučaju ukupnih klorofila dobivenih pomoću MAE pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 minuta i 400 W što se može pripisati njihovoj većoj osjetljivosti na parametre ove ekstrakcijske metode.

U istraživanju koje su proveli Garcia-Perez i sur. (2022) na devet različitih vrsta smeđih algi, koristeći etanol kao otapalo, određene su vrijednosti ukupnih klorofila u rasponu od 14,63 do 38,84  $\mu\text{g/g}$ , što su značajno niže vrijednosti od onih dobivenih u ovom istraživanju.

**Tablica 6.** Antioksidacijska aktivnost određena DPPH i ABTS metodom u ekstraktima algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

Tip ekstrakcije	Uvjeti ekstrakcije	<i>Dictyota fasciola</i>		<i>Dictyota dichotoma</i>		<i>Cutleria multifida</i>		<i>Fucus virsoides</i>		<i>Dasycladus vermicularis</i>	
		DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
		μM TE/100 g uzorka									
UAE	30 °C 25 min 530 W	1636,52±8,47	205,68±6,94	1551,75±16,81	116,65±9,63	1631,72±5,06	232,69±9,84	2960,65±13,32	2377,72±11,84	2235,95±8,14	209,06±11,07
	50 °C 30 min 400 w	1616,10±12,42	233,58±8,32	1583,12±8,56	289,96±7,53	1682,62±12,49	546,56±8,24	2648,26±7,93	2227,59±6,92	2017,34±9,22	98,32±3,80
MAE	30 °C 25 min 530 W	1718,74±7,89	541,66±2,88	1267,48±7,13	1271,42±2,88	2891,34±12,25	477,03±8,36	2627,56±7,47	5333,12±5,95	2720,27±8,54	485,83±5,78
	50 °C 30 min 400 W	1746,27±8,50	891,29±8,57	1207,71±8,93	1529,03±2,45	1691,47±3,63	351,09±3,17	2468,89±7,95	4476,32±7,90	2790,61±13,16	731,97±5,10

\*Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija.

Nakon provedene UAE u dobivenim ekstraktima određena je antioksidacijska aktivnost DPPH metodom te je najniža vrijednost  $1551,75 \pm 16,81 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka određena u ekstraktima dobivenim iz alge *Dictyota dichotoma* pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 minuta i 530 W, dok je najviša određena u ekstraktima dobivenim iz alge *Fucus virsoides* pri istim uvjetima ( $2960,65 \pm 13,32 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka). Najniža vrijednost AOA određena ABTS metodom bila je u ekstraktima dobivenim iz alge *Dasycladus vermicularis* pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W ( $98,32 \pm 3,80 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka), dok je najviša vrijednost određena u ekstraktima dobivenim iz alge *Fucus virsoides* pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 minuta i 530 W ( $2377,72 \pm 11,84 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka) (tablica 6).

Nakon provedene MAE najniža vrijednost AOA određena DPPH metodom bila je u ekstraktima dobivenim iz alge *Dictyota dichotoma* pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W ( $1207,71 \pm 8,93 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka), a najviša je bila u ekstraktima dobivenim iz alge *Cutleria multifida* pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 minuta i 530 W ( $2891,34 \pm 12,25 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka). S druge strane, kod najniža vrijednost AOA određena ABTS metodom bila je u ekstraktima dobivenim iz alge *Cutleria multifida* pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W ( $351,09 \pm 3,17 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka), dok je najviša vrijednost bila u ekstraktima dobivenim iz alge *Fucus virsoides* pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 minuta i 530 W ( $5333,12 \pm 5,95 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka).

Najveći antioksidacijski kapacitet od  $5333,12 \pm 5,95 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka, koji je ispitan ABTS metodom, zabilježen je kod ekstrakta alge *Fucus virsoides* dobivenog ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 minuta i 530 W. S druge strane, najmanji antioksidacijski kapacitet od  $98,32 \pm 3,80 \mu\text{M TE}/100 \text{ g}$  uzorka zabilježen je kod alge *Dasycladus vermicularis* gdje je korištena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W, a određen je ABTS metodom.

U slučaju alge *Dictyota fasciola* najveći antioksidacijski kapacitet određene je DPPH metodom za ekstrakte dobivene pomoću mikrovalne ekstrakcije na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W. Ekstrakti alge *Dictyota dichotoma* imali su najveći antioksidacijski kapacitet kada su bili dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W kada je uzorak ispitan DPPH metodom. Kod alge *Cutleria multifida* najveći kapacitet određen je DPPH metodom kod ekstrakata dobivenih pomoću mikrovalova na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 25 minuta i 530 W. Ekstrakti *Dasycladus vermicularis* su najveći antioksidacijski kapacitet imali također kada se koristila mikrovalna ekstrakcija i DPPH metoda, no pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 minuta i 400 W.

Mnoga istraživanja pokazala su da različite alge imaju visoku antioksidacijsku aktivnost iako rezultati variraju zbog utjecaja okoliša, odnosno zbog različitog podrijetla algi, uzgoja,

prisutnosti različitih bioaktivnih spojeva te zbog različitih uvjeta i metoda ekstrakcije (Frazzini i sur., 2022).

Gotovo svi ekstrakti algi imali su veću antioksidacijsku aktivnost dobivenu DPPH metodom nego ABTS metodom, što se podudara s istraživanjem koje su proveli Dang i sur. (2018) na smeđim algama.

Mikrovalna ekstrakcija pokazala se boljom u odnosu na ultrazvučnu pri istim uvjetima za istu algu, osim u slučaju alge *Fucus virsoides* za DPPH metodu pri oba uvjeta, alge *Dictyota dichotoma* za DPPH metodu na 30 °C, 25 minuta i 530 W, te kod alge *Cutleria multifida* za ABTS metodu pri 50 °C, 30 minuta i 400 W.

**Tablica 7.** Pojedinačni utjecaj postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na masene udjele karotenoida u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

		<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	N	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	4	11,41±2,57 <sup>a</sup>	12,82±0,57 <sup>a</sup>	3,83±0,54 <sup>a</sup>	4,43±0,359 <sup>a</sup>	1,37±0,45 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	4	29,53±2,57 <sup>b</sup>	47,40±0,57 <sup>b</sup>	9,58±0,54 <sup>b</sup>	11,54±0,359 <sup>b</sup>	3,32±0,45 <sup>a</sup>
<b>T (°C)</b>		p=0,28	p=0,93	p=0,46	p=0,75	p=0,54
<b>30</b>	4	24,85±5,26 <sup>a</sup>	30,75±10,00 <sup>a</sup>	7,63±1,66 <sup>a</sup>	7,49±2,12 <sup>a</sup>	2,03±2,12 <sup>a</sup>
<b>50</b>	4	16,09±5,26 <sup>a</sup>	29,47±10,00 <sup>a</sup>	5,77±1,66 <sup>a</sup>	8,48±2,12 <sup>a</sup>	2,66±2,12 <sup>a</sup>
<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,28	p=0,93	p=0,46	p=0,75	p=0,54
<b>25</b>	4	24,85±5,26 <sup>a</sup>	30,75±10,00 <sup>a</sup>	7,63±1,66 <sup>a</sup>	7,49±2,12 <sup>a</sup>	2,03±2,12 <sup>a</sup>
<b>30</b>	4	16,09±5,26 <sup>a</sup>	29,47±10,00 <sup>a</sup>	5,77±1,66 <sup>a</sup>	8,48±2,12 <sup>a</sup>	2,66±2,12 <sup>a</sup>
<b>Snaga (W)</b>		p=0,28	p=0,93	p=0,46	p=0,75	p=0,54
<b>400</b>	4	16,09±5,26 <sup>a</sup>	29,47±10,00 <sup>a</sup>	5,77±1,66 <sup>a</sup>	8,48±2,12 <sup>a</sup>	2,66±2,12 <sup>a</sup>
<b>530</b>	4	24,85±5,26 <sup>a</sup>	30,75±10,00 <sup>a</sup>	7,63±1,66 <sup>a</sup>	7,49±2,12 <sup>a</sup>	2,03±2,12 <sup>a</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u mg/100 g

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

Rezultati statističke analize su pokazali da na udio ukupnih karotenoida u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* značajno utječe metoda ekstrakcije ( $p < 0,05$ ), dok parametri temperature i trajanja

ekstrakcije te snage ultrazvuka i mikrovalova nemaju značajan utjecaj (tablica 7).

**Tablica 8.** Pojedinačni utjecaj postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na masene udjele klorofila u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

		<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	N	p<0,01	p=0,37	p<0,01	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	4	5,70±2,85 <sup>a</sup>	7,69±6,28 <sup>a</sup>	3,27±0,43 <sup>a</sup>	3,20±0,50 <sup>a</sup>	2,20±0,56 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	4	26,80±2,85 <sup>b</sup>	16,23±6,28 <sup>a</sup>	8,72±0,43 <sup>b</sup>	13,45±0,50 <sup>b</sup>	7,26±0,56 <sup>b</sup>
<b>T (°C)</b>		p=0,61	p=0,06	p=0,57	p=0,88	p=0,63
<b>30</b>	4	13,75±6,60 <sup>a</sup>	19,92±4,95 <sup>a</sup>	6,66±1,58 <sup>a</sup>	7,99±3,00 <sup>a</sup>	4,18±1,53 <sup>a</sup>
<b>50</b>	4	18,75±6,60 <sup>a</sup>	4,00±4,95 <sup>a</sup>	5,33±1,58 <sup>a</sup>	8,66±3,00 <sup>a</sup>	5,28±1,53 <sup>a</sup>
<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,61	p=0,06	p=0,57	p=0,88	p=0,63
<b>25</b>	4	13,75±6,60 <sup>a</sup>	19,92±4,95 <sup>a</sup>	6,66±1,58 <sup>a</sup>	7,99±3,00 <sup>a</sup>	4,18±1,53 <sup>a</sup>
<b>30</b>	4	18,75±6,60 <sup>a</sup>	4,00±4,95 <sup>a</sup>	5,33±1,58 <sup>a</sup>	8,66±3,00 <sup>a</sup>	5,28±1,53 <sup>a</sup>
<b>Snaga (W)</b>		p=0,61	p=0,06	p=0,57	p=0,88	p=0,63
<b>400</b>	4	18,75±6,60 <sup>a</sup>	4,00±4,95 <sup>a</sup>	5,33±1,58 <sup>a</sup>	8,66±3,00 <sup>a</sup>	5,28±1,53 <sup>a</sup>
<b>530</b>	4	13,75±6,60 <sup>a</sup>	19,92±4,95 <sup>a</sup>	6,66±1,58 <sup>a</sup>	7,99±3,00 <sup>a</sup>	4,18±1,53 <sup>a</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u mg/100 g

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

Rezultati statističke analize su pokazali da na udio ukupnih klorofila u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* značajno utječe metoda ekstrakcije ( $p < 0,05$ ), dok parametri temperature i trajanja ekstrakcije te snage ultrazvuka i mikrovalova nemaju značajan utjecaj. Za algu *Dictyota dichotoma* pokazalo da se da metoda, temperatura, trajanje i snaga ultrazvuka i mikrovalova nisu imali značajan utjecaj na udio ukupnih klorofila (tablica 8).

Prema podacima prikazanim u tablicama 7 i 8 vidljivo je da se ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima udio karotenoida i klorofila kod svih algi značajno povećao, što se podudara sa rezultatima istraživanja drugih autora na algama gdje se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala učinkovitijom u ekstrakciji pigmentata (Fabrowska i sur., 2018). Najveća razlika u prinosu karotenoida između dviju ekstrakcija zapažena je u slučaju

alge *Dictyota dichotoma*. Isti trend zapažen je i kod prinosa ukupnih klorofila, gdje je najveća razlika u prinosu između ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima vidljiva za algu *Dictyota fasciola*.

Temperatura je vrlo važan parametar jer izravno utječe na svojstva otopljene tvari i otapala (kao što su viskoznost, tlak pare i površinska napetost). U jednu ruku, porast temperature povezan je sa smanjenjem vremena i većim prinosom ekstrakcije zbog povećane difuzije otapala i topljivosti pigmenta (Chemat i sur., 2017b; Camel, 2000). S druge strane, otkriveno je da daljnja povećanja temperature nisu imala značajan učinak na ekstrakciju pigmenta, a povećanjem preko određene maksimalne točke dolazi do raspadanja termolabilnih spojeva (González i sur., 2020). U tablici 7 vidljivo je da se prinos ukupnih karotenoida smanjio povećanjem temperature s 30 na 50 °C kod vrsta *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma* i *Cutleria multifida*, dok se kod vrsta *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* blago povećao. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima koje su u svojem istraživanju dobili Fratianni i sur. (2010) u kojem je nakon provedene MAE prinos odabranih karotenoida pokazao silazni trend na temperaturama blizu 60 °C, vjerojatno zbog dominacije njihove razgradnje umjesto ekstrakcije. Najveća promjena u prinosu karotenoida zabilježena je kod alge *Dictyota fasciola*, kod koje je došlo do smanjenja od  $8,76 \pm 5,26$  mg/100 g. U tablici 8 prikazano je da se prinos ukupnih klorofila na većoj temperaturi povećao kod vrsti *Dictyota fasciola*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*, dok se za vrste *Dictyota dichotoma* i *Cutleria multifida* prinos smanjio. Do najveće promjene u prinosu klorofila došlo je kod ekstrakta vrste *Dictyota dichotoma*, kod koje je došlo smanjenja prinosa od  $15,92 \pm 4,95$  mg/100 g.

Vrijeme ekstrakcije ključni je parametar jer zajedno sa snagom i temperaturom određuje potrošnju energije i učinkovitost ekstrakcije. Povećanjem vremena ekstrakcije do maksimalne točke postizat će se veći prinosi ekstrakcije, a nakon postizanja maksimalne točke daljnja povećanja uzrokovat će smanjenje prinosa (Kumar i sur., 2021; Soroush i sur., 2021). To jest, kada se postigne maksimalni prinos u određeno vrijeme, postiže se ravnotežna koncentracija ekstrahiranog pigmenta (Romero-Díez i sur., 2019). To se može objasniti činjenicom da produljeno trajanje ekstrakcije i produljena izloženost ultrazvuku ili mikrovalovima mogu dovesti do razgradnje termolabilnih spojeva ili oksidativne degradacije ekstrahiranih spojeva, u ovom slučaju pigmenta (Zhang i sur., 2020; Lovrić i sur., 2017) Imajući to na umu, vrlo kratko vrijeme ekstrakcije može biti nedovoljno za završetak ekstrakcije ostavljajući ciljne spojeve u uzorku. Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na prinos karotenoida prikazan je u tablici 7 te je iz

nje vidljivo da je povećanjem temperature s 25 na 30 minuta došlo do blagog povećanja prinosa karotenoida vrsti *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* te smanjenja prinosa karotenoida vrsti *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma* i *Cutleria multifida*. Do najveće promjene došlo je kod alge *Dictyota fasciola*, kod koje je tijekom povećanja trajanja ekstrakcije došlo do pada prinosa karotenoida. Prema podacima prikazanim u tablici 8 vidljivo je da je povećanje trajanja ekstrakcije s 25 na 30 minuta uzrokovalo povećanje masenog udjela ekstrahiranih ukupnih klorofila kod vrsta *Dictyota fasciola*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*, dok je kod vrsta *Dictyota dichotoma* i *Cutleria multifida* došlo do smanjenja prinosa klorofila. Najveća promjena u smanjenju prinosa klorofila zabilježena je kod vrste *Dictyota dichotoma*.

Povećanjem snage ultrazvuka i mikrovalova do određene točke može se postići veća učinkovitost ekstrakcije. Međutim, pri daljnjem povećavanju snage može doći do degradacije spojeva (Shang i sur., 2020; Montero-Calderon i sur., 2019). Kod ultrazvučne ekstrakcije to se može objasniti činjenicom da bi kavitacija nastala tijekom ultrazvuka mogla proizvesti radikale hidroksila (OH) i vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uzrokujući degradaciju spojeva (Zafra-Rojas i sur., 2020). Stoga je snaga ultrazvuka parametar koji bi trebalo optimizirati tražeći minimum potreban za postizanje najboljih rezultata ekstrakcije pigmenta i smanjenje potrošnje energije UAE procesa. Kada je u pitanju mikrovalna ekstrakcija, pojačano mikrovalno zračenje do određene točke poboljšava sadržaj ispitivanih bioaktivnih spojeva kao rezultat pojačane molekularne interakcije između biomase i elektromagnetskog polja. Međutim, daljnje povećanje snage može biti odgovorno za degradaciju bioaktivnih komponenti ekstrakta, u ovom slučaju pigmenta (Bachtler i Bart, 2021; Nguyen i sur., 2021; Shang i sur., 2020). U tablici 7 prikazano je da se prinos ukupnih karotenoida povećanjem snage sa 400 na 530 W povećao kod vrsti *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma* i *Cutleria mutlfida*, dok se smanjio za vrste *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*. Prinosi ukupnih klorofila povećanjem snage su se povećali za vrste *Dictyota dichotoma* i *Cutleria multifida*, dok su se za ostale tri vrste oni smanjili (tablica 8).

**Tablica 9.** Kombinirani utjecaji postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na masene udjele karotenoida u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

			<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	<b>T (°C)</b>	<b>N</b>	p<0,01	p<0,01	p=0,32	p=0,60	p<0,01
<b>UAE</b>	30	2	14,98±0,20 <sup>b</sup>	14,20±0,17 <sup>b</sup>	4,83±0,13 <sup>b</sup>	3,04±0,09 <sup>a</sup>	0,35±0,11 <sup>a</sup>
<b>UAE</b>	50	2	7,84±0,20 <sup>a</sup>	11,45±0,17 <sup>a</sup>	2,83±0,13 <sup>a</sup>	5,82±0,09 <sup>b</sup>	2,39±0,11 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	30	2	34,72±0,20 <sup>d</sup>	47,31±0,17 <sup>c</sup>	10,43±0,13 <sup>d</sup>	11,94±0,09 <sup>d</sup>	3,70±0,11 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	50	2	24,35±0,20 <sup>c</sup>	47,50±0,17 <sup>c</sup>	8,72±0,13 <sup>c</sup>	11,14±0,09 <sup>c</sup>	2,94±0,11 <sup>c</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Vrijeme (min)</b>		p<0,01	p<0,01	p=0,32	p=0,60	p<0,01
<b>UAE</b>	25	2	14,98±0,20 <sup>b</sup>	14,20±0,17 <sup>b</sup>	4,83±0,13 <sup>b</sup>	3,04±0,09 <sup>a</sup>	0,35±0,11 <sup>a</sup>
<b>UAE</b>	30	2	7,84±0,20 <sup>a</sup>	11,45±0,17 <sup>a</sup>	2,83±0,13 <sup>a</sup>	5,82±0,09 <sup>b</sup>	2,39±0,11 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	25	2	34,72±0,20 <sup>d</sup>	47,31±0,17 <sup>c</sup>	10,43±0,13 <sup>d</sup>	11,94±0,09 <sup>d</sup>	3,70±0,11 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	30	2	24,35±0,20 <sup>c</sup>	47,50±0,17 <sup>c</sup>	8,72±0,13 <sup>c</sup>	11,14±0,09 <sup>c</sup>	2,94±0,11 <sup>c</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Snaga (W)</b>		p<0,01	p<0,01	p=0,32	p=0,60	p<0,01
<b>UAE</b>	400	2	7,84±0,20 <sup>a</sup>	11,45±0,17 <sup>a</sup>	2,83±0,13 <sup>a</sup>	5,82±0,09 <sup>b</sup>	2,39±0,11 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	530	2	14,98±0,20 <sup>b</sup>	14,20±0,17 <sup>b</sup>	4,83±0,13 <sup>b</sup>	3,04±0,09 <sup>a</sup>	0,35±0,11 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	400	2	24,35±0,20 <sup>c</sup>	47,50±0,17 <sup>c</sup>	8,72±0,13 <sup>c</sup>	11,14±0,09 <sup>c</sup>	2,94±0,11 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	530	2	34,72±0,20 <sup>d</sup>	47,31±0,17 <sup>c</sup>	10,43±0,13 <sup>d</sup>	11,94±0,09 <sup>d</sup>	3,70±0,11 <sup>b</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u mg/100 g

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



**Tablica 10.** Kombinirani utjecaj postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na masene udjele klorofila u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

			<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	<b>T (°C)</b>	<b>N</b>	p<0,01	p<0,01	p=0,11	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	30	2	7,44±0,24 <sup>b</sup>	8,22±0,14 <sup>c</sup>	3,71±0,22 <sup>a</sup>	2,08±0,17 <sup>a</sup>	0,88±0,27 <sup>a</sup>
<b>UAE</b>	50	2	3,95±0,24 <sup>a</sup>	7,15±0,14 <sup>b</sup>	2,83±0,22 <sup>a</sup>	4,32±0,22 <sup>b</sup>	3,51±0,27 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	30	2	20,06±0,24 <sup>c</sup>	31,62±0,14 <sup>d</sup>	9,61±0,22 <sup>c</sup>	13,89±0,22 <sup>c</sup>	7,48±0,27 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	50	2	33,55±0,24 <sup>d</sup>	0,85±0,14 <sup>a</sup>	7,83±0,22 <sup>b</sup>	13,00±0,22 <sup>c</sup>	7,04±0,27 <sup>c</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Vrijeme (min)</b>		p<0,01	p<0,01	p=0,11	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	25	2	7,44±0,24 <sup>b</sup>	8,22±0,14 <sup>c</sup>	3,71±0,22 <sup>a</sup>	2,08±0,17 <sup>a</sup>	0,88±0,27 <sup>a</sup>
<b>UAE</b>	30	2	3,95±0,24 <sup>a</sup>	7,15±0,14 <sup>b</sup>	2,83±0,22 <sup>a</sup>	4,32±0,22 <sup>b</sup>	3,51±0,27 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	25	2	20,06±0,24 <sup>c</sup>	31,62±0,14 <sup>d</sup>	9,61±0,22 <sup>c</sup>	13,89±0,22 <sup>c</sup>	7,48±0,27 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	30	2	33,55±0,24 <sup>d</sup>	0,85±0,14 <sup>a</sup>	7,83±0,22 <sup>b</sup>	13,00±0,22 <sup>c</sup>	7,04±0,27 <sup>c</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Snaga (W)</b>		p<0,01	p<0,01	p=0,11	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	400	2	3,95±0,24 <sup>a</sup>	7,15±0,14 <sup>b</sup>	2,83±0,22 <sup>a</sup>	4,32±0,22 <sup>b</sup>	3,51±0,27 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	530	2	7,44±0,24 <sup>b</sup>	8,22±0,14 <sup>c</sup>	3,71±0,22 <sup>a</sup>	2,08±0,17 <sup>a</sup>	0,88±0,27 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	400	2	33,55±0,24 <sup>d</sup>	0,85±0,14 <sup>a</sup>	7,83±0,22 <sup>b</sup>	13,00±0,22 <sup>c</sup>	7,04±0,27 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	530	2	20,06±0,24 <sup>c</sup>	31,62±0,14 <sup>d</sup>	9,61±0,22 <sup>c</sup>	13,89±0,22 <sup>c</sup>	7,48±0,27 <sup>c</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u mg/100 g

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

Prema rezultatima statističke analize prikazanim u tablicama 9 i 10 vidljivo je da je najniži udio karotenoida određen u ekstraktima dobivenim pomoću UAE iz alge *Dasycladus vermicularis* pri 30 °C, 25 minuta i 530 W (0,35±0,11 mg/100 g), dok je najviši udio karotenoida određen u ekstraktima dobivenim pomoću MAE iz alge *Dictyota dichotoma* pri 50 °C, 30 minuta i 400 W (47,50±0,17 mg/100 g). S druge strane, najniži udio klorofila određen je u ekstraktima dobivenim pomoću MAE iz alge *Dictyota dichotoma* pri 50 °C, 30 minuta i 400 W (0,85±0,14 mg/100 g), dok je najviši udio klorofila određen u ekstraktima dobivenim pomoću MAE iz alge *Dictyota fasciola* pri istim uvjetima (33,55±0,24 mg/100 g).

Najveći udio karotenoida (47,50±0,17 mg/100 g) određen je kod ekstrakta alge *Dictyota dichotoma* dobivenog pomoću MAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W, dok je najmanji udio

karotenoida ( $0,35 \pm 0,11$  mg/100 g) određen kod ekstrakta alge *Dasycladus vermicularis* dobivenog pomoću UAE pri 30 °C, 25 minuta i 530 W. S druge strane, najveći udio klorofila ( $33,55 \pm 0,24$  mg/100 g) određen je kod ekstrakta alge *Dictyota fasciola* dobivenog pomoću MAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W, dok je najmanji udio klorofila ( $0,85 \pm 0,14$  mg/100 g) određen kod ekstrakta alge *Dictyota dichotoma* dobivenog pomoću MAE također pri 50 °C, 30 minuta i 400 W.

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je na prinos ukupnih karotenoida kod ekstrakata algi *Dictyota fasciola*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* najbolji učinak imao kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/30 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/25 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/530 W. Na prinos karotenoida alge *Dictyota dichotoma* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/50 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/30 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/400 W (tablica 9).

S druge strane, na prinos ukupnih klorofila kod ekstrakata algi *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/30 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/25 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/530 W. Na prinos klorofila alge *Dictyota fasciola* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/50 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/30 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/400 W (tablica 10).

U istraživanju koje su proveli Pasquet i suradnici (2011) pokazalo se da je za ekstrakciju karotenoida i povezanih pigmenta iz alge *Dunaliella tertiolecta* najbolja metoda MAE pri uvjetima: 56 °C, 5 min i 50 W.

Fabrowska i sur. (2018) u svome su istraživanju uspoređivali utjecaj različitih metoda ekstrakcije klorofila i karotenoida iz algi te se pokazalo da je pri 40 °C, 60 minuta i 800 W MAE bolja metoda ekstrakcije za izolaciju ovih pigmenta od UAE.

**Tablica 11.** pojedinačni Utjecaj postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom kod ekstrakata lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

		<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	N	p<0,01	p<0,01	p=0,12	p=0,04	p<0,01
<b>UAE</b>	4	1626,31±8,00 <sup>a</sup>	1567,43±14,50 <sup>b</sup>	1657,17±245,17 <sup>a</sup>	2804,46±71,62 <sup>b</sup>	2126,64±47,05 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	4	1732,51±8,00 <sup>b</sup>	1237,59±14,50 <sup>a</sup>	2291,40±245,17 <sup>a</sup>	2548,22±71,62 <sup>a</sup>	2755,44±47,05 <sup>a</sup>
<b>T (°C)</b>		p=0,94	p=0,92	p=0,17	p=0,07	p=0,79
<b>30</b>	4	1677,63±31,67 <sup>a</sup>	1409,61±96,23 <sup>a</sup>	2261,53±257,15 <sup>a</sup>	2794,10±77,32 <sup>a</sup>	2478,11±186,29 <sup>a</sup>
<b>50</b>	4	1681,19±31,67 <sup>a</sup>	1395,41±96,23 <sup>a</sup>	1687,05±257,15 <sup>a</sup>	2558,58±77,32 <sup>a</sup>	2403,97±186,29 <sup>a</sup>
<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,94	p=0,92	p=0,17	p=0,07	p=0,79
<b>25</b>	4	1677,63±31,67 <sup>a</sup>	1409,61±96,23 <sup>a</sup>	2261,53±257,15 <sup>a</sup>	2794,10±77,32 <sup>a</sup>	2478,11±186,29 <sup>a</sup>
<b>30</b>	4	1681,19±31,67 <sup>a</sup>	1395,41±96,23 <sup>a</sup>	1687,05±257,15 <sup>a</sup>	2558,58±77,32 <sup>a</sup>	2403,97±186,29 <sup>a</sup>
<b>Snaga (W)</b>		p=0,94	p=0,92	p=0,17	p=0,07	p=0,79
<b>400</b>	4	1681,19±31,67 <sup>a</sup>	1395,41±96,23 <sup>a</sup>	1687,05±257,15 <sup>a</sup>	2558,58±77,32 <sup>a</sup>	2403,97±186,29 <sup>a</sup>
<b>530</b>	4	1677,63±31,67 <sup>a</sup>	1409,61±96,23 <sup>a</sup>	2261,53±257,15 <sup>a</sup>	2794,10±77,32 <sup>a</sup>	2478,11±186,29 <sup>a</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u μM TE/100 g uzorka

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

Statistička analiza je pokazala da na antioksidacijsku aktivnost ispitanu DPPH metodom u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* značajno utječe metoda ekstrakcije ( $p \leq 0,05$ ), dok parametri temperature i trajanja ekstrakcije te snage ultrazvuka i mikrovalova nemaju značajan utjecaj. Za algu *Cutleria multifida* pokazalo da se da metoda, temperatura, trajanje i snaga ultrazvuka i mikrovalova nisu imali značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost (tablica 11).

**Tablica 12.** Utjecaj pojedinačno postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom kod ekstrakata lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

		<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	<b>N</b>	p<0,01	p<0,01	p=0,12	p=0,04	p<0,01
<b>UAE</b>	4	219,63±71,65 <sup>a</sup>	203,30±63,43 <sup>a</sup>	389,63±69,11 <sup>a</sup>	2302,65±4,23 <sup>a</sup>	153,69±55,17 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	4	716,47±71,65 <sup>b</sup>	1400,23±63,43 <sup>b</sup>	414,06±63,43 <sup>a</sup>	4904,72±4,23 <sup>b</sup>	608,90±55,17 <sup>b</sup>
<b>T (°C)</b>		p=0,78	p=0,67	p=0,34	p=0,84	p=0,11
<b>30</b>	4	373,67±150,79 <sup>a</sup>	694,04±345,75 <sup>a</sup>	354,86±63,95 <sup>a</sup>	3855,42±4,23 <sup>a</sup>	347,44±141,17 <sup>a</sup>
<b>50</b>	4	562,43±150,79 <sup>a</sup>	909,50±345,75 <sup>a</sup>	448,82±63,95 <sup>a</sup>	3351,95±4,23 <sup>a</sup>	415,14±141,17 <sup>a</sup>
<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,78	p=0,67	p=0,34	p=0,84	p=0,11
<b>25</b>	4	373,67±150,79 <sup>a</sup>	694,04±345,75 <sup>a</sup>	354,86±63,95 <sup>a</sup>	3855,42±4,23 <sup>a</sup>	347,44±141,17 <sup>a</sup>
<b>30</b>	4	562,43±150,79 <sup>a</sup>	909,50±345,75 <sup>a</sup>	448,82±63,95 <sup>a</sup>	3351,95±4,23 <sup>a</sup>	415,14±141,17 <sup>a</sup>
<b>Snaga (W)</b>		p=0,78	p=0,67	p=0,34	p=0,84	p=0,11
<b>400</b>	4	562,43±150,79 <sup>a</sup>	909,50±345,75 <sup>a</sup>	448,82±63,95 <sup>a</sup>	3351,95±4,23 <sup>a</sup>	415,14±141,17 <sup>a</sup>
<b>530</b>	4	373,67±150,79 <sup>a</sup>	694,04±345,75 <sup>a</sup>	354,86±63,95 <sup>a</sup>	3855,42±4,23 <sup>a</sup>	347,44±141,17 <sup>a</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u  $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka

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

Statistička analiza je pokazala da na antioksidacijsku aktivnost ispitanu ABTS metodom u ekstraktima lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* značajno utječe metoda ekstrakcije ( $p \leq 0,05$ ), dok parametri temperature i trajanja ekstrakcije te snage ultrazvuka i mikrovalova nemaju značajan utjecaj. Za algu *Cutleria multifida* pokazalo da se da metoda, temperatura, trajanje i snaga ultrazvuka i mikrovalova nisu imali značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost (tablica 12).

MAE je uzrokovala povećanje antioksidacijske aktivnosti ispitanu DPPH metodom kod ekstrakata vrsti *Dictyota fasciola*, *Cutleria multifida* i *Dasycladus vermicularis*, dok se kod vrsti *Dictyota dichotoma* i *Fucus virsoides* boljom pokazala UAE (tablica 11). S druge strane, kod rezultata ispitivanja antioksidacijske aktivnosti dobivenih ABTS metodom vidljivo je da je MAE imala bolji učinak od UAE kod svih ekstrakata algi (tablica 12).

Kod rezultata dobivenih DPPH metodom povećanje temperature sa 30 na 50 °C te

povećanje trajanja ekstrakcije sa 25 na 30 minuta negativno je utjecalo na antioksidacijske kapacitete ekstrakata svih algi osim alge *Dictyota fasciola* gdje je zabilježen neznatan porast. Utjecaj povećanja snage sa 400 na 530 W pokazao se potpuno suprotnim i zabilježen je porast antioksidacijske aktivnosti kod svih algi osim alge *Dictyota fasciola* (tablica 11). Kada su u pitanju rezultati dobiveni ABTS metodom, antioksidacijske aktivnosti ekstrakata su rasle s temperaturom, trajanjem i smanjenjem snage za sve ekstrakte algi osim vrste *Fucus virsoides* kod koje se antioksidacijska aktivnost smanjila povećanjem temperature, trajanja ekstrakcije i smanjenjem snage (tablica 12).

Georgiopoulou i sur. (2023) su proveli istraživanje na algi *Chlorella vulgaris* te su njihovi rezultati pokazali da se povećanjem temperature ekstrakcije sa 40 na 50 te krajnje na 60 °C pogoršala antioksidacijska aktivnost ekstrakata, koja je bila ispitana DPPH metodom.

U istom istraživanju rezultati su pokazali da se povećanjem vremena ekstrakcije pomoću MAE s 5 na 15 minuta povećala i antioksidacijska aktivnost uzorka, dok se daljnjim povećanjem trajanja na 25 minuta ta aktivnost smanjila. Ovo su povezali s činjenicom da se produljenjem trajanja sa 5 na 15 minuta povećala i koncentracija fenola, karotenoida i klorofila u ekstraktima, dok je daljnjim produljenjem trajanja ekstrakcije došlo do smanjenja sadržaja spomenutih spojeva. Slična zapažanja koja se tiču smanjenja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pri daljnjem produljenju trajanja ekstrakcije zabilježili su i Nguyen i sur. (2021).

Povećanje snage sa 300 na 550 W značajno je utjecalo na povećanje udjela fenola, karotenoida i klorofila u ekstraktima, a time posljedično i na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Međutim, povećanje na 800 W uzrokovalo je pogoršanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata (Georgiopoulou i sur., 2023).

**Tablica 13.** Kombinirani utjecaji postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom kod ekstrakata lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

			<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	<b>T (°C)</b>	<b>N</b>	p=0,02	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	30	2	1636,52±6,71 <sup>a</sup>	1551,75±7,80 <sup>c</sup>	1631,72±6,57 <sup>a</sup>	2960,65±6,70 <sup>c</sup>	2235,95±7,05 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	50	2	1616,10±6,71 <sup>a</sup>	1583,12±7,80 <sup>c</sup>	1682,62±6,57 <sup>b</sup>	2648,26±6,70 <sup>b</sup>	2017,34±7,05 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	30	2	1718,74±6,71 <sup>b</sup>	1267,48±7,80 <sup>b</sup>	2891,34±6,57 <sup>c</sup>	2627,56±6,70 <sup>c</sup>	2720,27±7,05 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	50	2	1746,27±6,71 <sup>b</sup>	1207,71±7,80 <sup>a</sup>	1691,47±6,57 <sup>b</sup>	2468,89±6,70 <sup>a</sup>	2790,60±7,05 <sup>d</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Vrijeme (min)</b>		p=0,02	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	25	2	1636,52±6,71 <sup>a</sup>	1551,75±7,80 <sup>c</sup>	1631,72±6,57 <sup>a</sup>	2960,65±6,70 <sup>c</sup>	2235,95±7,05 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	30	2	1616,10±6,71 <sup>a</sup>	1583,12±7,80 <sup>c</sup>	1682,62±6,57 <sup>b</sup>	2648,26±6,70 <sup>b</sup>	2017,34±7,05 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	25	2	1718,74±6,71 <sup>b</sup>	1267,48±7,80 <sup>b</sup>	2891,34±6,57 <sup>c</sup>	2627,56±6,70 <sup>c</sup>	2720,27±7,05 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	30	2	1746,27±6,71 <sup>b</sup>	1207,71±7,80 <sup>a</sup>	1691,47±6,57 <sup>b</sup>	2468,89±6,70 <sup>a</sup>	2790,60±7,05 <sup>d</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Snaga (W)</b>		p=0,02	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
<b>UAE</b>	400	2	1616,10±6,71 <sup>a</sup>	1583,12±7,80 <sup>c</sup>	1682,62±6,57 <sup>b</sup>	2648,26±6,70 <sup>b</sup>	2017,34±7,05 <sup>a</sup>
<b>UAE</b>	530	2	1636,52±6,71 <sup>a</sup>	1551,75±7,80 <sup>c</sup>	1631,72±6,57 <sup>a</sup>	2960,65±6,70 <sup>c</sup>	2235,95±7,05 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	400	2	1746,27±6,71 <sup>b</sup>	1207,71±7,80 <sup>a</sup>	1691,47±6,57 <sup>b</sup>	2468,89±6,70 <sup>a</sup>	2790,60±7,05 <sup>d</sup>
<b>MAE</b>	530	2	1718,74±6,71 <sup>b</sup>	1267,48±7,80 <sup>b</sup>	2891,34±6,57 <sup>c</sup>	2627,56±6,70 <sup>c</sup>	2720,27±7,05 <sup>c</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u  $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka

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

**Tablica 14.** Kombinirani utjecaji postupka ekstrakcije, temperature, vremena ekstrakcije i snage ultrazvuka i mikrovalova na antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS metodom kod ekstraktata lista algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis*\*

			<i>Dictyota fasciola</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Cutleria multifida</i>	<i>Fucus virsoides</i>	<i>Dasycladus vermicularis</i>
<b>Postupak</b>	<b>T (°C)</b>	<b>N</b>	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p=0,60	p<0,01
<b>UAE</b>	30	2	205,68±5,00 <sup>a</sup>	116,65±4,52 <sup>a</sup>	232,69±5,53 <sup>a</sup>	2377,72±5,98 <sup>b</sup>	209,06±4,96 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	50	2	233,58±5,00 <sup>a</sup>	289,96±4,52 <sup>b</sup>	546,56±5,53 <sup>d</sup>	2227,59±5,98 <sup>a</sup>	98,32±4,96 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	30	2	541,66±5,00 <sup>b</sup>	1271,42±4,52 <sup>c</sup>	477,03±5,53 <sup>c</sup>	5333,12±5,98 <sup>d</sup>	485,83±4,96 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	50	2	891,29±5,00 <sup>c</sup>	1529,03±4,52 <sup>d</sup>	351,09±5,53 <sup>b</sup>	4476,32±5,98 <sup>c</sup>	731,97±4,96 <sup>d</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Vrijeme (min)</b>		p<0,01	p<0,01	p<0,01	p=0,60	p<0,01
<b>UAE</b>	25	2	205,68±5,00 <sup>a</sup>	116,65±4,52 <sup>a</sup>	232,69±5,53 <sup>a</sup>	2377,72±5,98 <sup>b</sup>	209,06±4,96 <sup>b</sup>
<b>UAE</b>	30	2	233,58±5,00 <sup>a</sup>	289,96±4,52 <sup>b</sup>	546,56±5,53 <sup>d</sup>	2227,59±5,98 <sup>a</sup>	98,32±4,96 <sup>a</sup>
<b>MAE</b>	25	2	541,66±5,00 <sup>b</sup>	1271,42±4,52 <sup>c</sup>	477,03±5,53 <sup>c</sup>	5333,12±5,98 <sup>d</sup>	485,83±4,96 <sup>c</sup>
<b>MAE</b>	30	2	891,29±5,00 <sup>c</sup>	1529,03±4,52 <sup>d</sup>	351,09±5,53 <sup>b</sup>	4476,32±5,98 <sup>c</sup>	731,97±4,96 <sup>d</sup>
<b>Postupak</b>	<b>Snaga (W)</b>		p<0,01	p<0,01	p<0,01	p=0,60	p<0,01
<b>UAE</b>	400	2	233,58±5,00 <sup>a</sup>	289,96±4,52 <sup>b</sup>	546,56±5,53 <sup>d</sup>	2227,59±5,98 <sup>b</sup>	98,32±4,96 <sup>a</sup>
<b>UAE</b>	530	2	205,68±5,00 <sup>a</sup>	116,65±4,52 <sup>a</sup>	232,69±5,53 <sup>a</sup>	2377,72±5,98 <sup>a</sup>	209,06±4,96 <sup>b</sup>
<b>MAE</b>	400	2	891,29±5,00 <sup>c</sup>	1529,03±4,52 <sup>d</sup>	351,09±5,53 <sup>b</sup>	4476,32±5,98 <sup>d</sup>	731,97±4,96 <sup>d</sup>
<b>MAE</b>	530	2	541,66±5,00 <sup>b</sup>	1271,42±4,52 <sup>c</sup>	477,03±5,53 <sup>c</sup>	5333,12±5,98 <sup>c</sup>	485,83±4,96 <sup>c</sup>

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška u  $\mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka

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

Prema podacima prikazanim u tablicama 13 i 14 vidljivo je da je najniža antioksidacijska aktivnost ispitana DPPH metodom određena u ekstraktima dobivenim pomoću MAE iz alge *Dictyota dichotoma* pri 50 °C, 30 minuta i 400 W ( $1207,71 \pm 7,80 \mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka), dok je najviša AOA određena u ekstraktima dobivenim pomoću UAE iz alge *Fucus virsoides* pri 30 °C, 25 minuta i 530 W ( $2960,65 \pm 6,70 \mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka). S druge strane, za ekstrakte algi ispitane ABTS metodom najniža AOA je određena u ekstraktima dobivenim pomoću UAE iz alge *Dasycladus vermicularis* pri 50 °C, 30 minuta i 400 W ( $98,32 \pm 4,96 \mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka), a najviša u ekstraktima dobivenim pomoću MAE iz alge *Fucus virsoides* pri 30 °C, 25 minuta i 530 W ( $5333,12 \pm 5,98 \mu\text{M TE}/100\text{ g}$  uzorka).

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je za alge *Dictyota fasciola* i *Dasycladus vermicularis* na antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom najbolji učinak imao kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/50 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/30 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/400 W. Na algu *Dictyota dichotoma* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: UAE/50 °C, metode i vremena ekstrakcije: UAE/30 minuta te metode i snage ekstrakcije: UAE/400 W. Najbolji učinak na algu *Cutleria multifida* imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/30 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/25 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/530 W. Kod alge *Fucus virsoides* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: UAE/30 °C, metode i vremena ekstrakcije: UAE/25 minuta te metode i snage ekstrakcije: UAE/530 W (tablica 13).

Što se tiče antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, za ekstrakte algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma* i *Dasycladus vermicularis* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/50 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/30 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/400 W. Na antioksidacijsku aktivnost alge *Cutleria multifida* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: UAE/50 °C, metode i vremena ekstrakcije: UAE/30 minuta te metode i snage ekstrakcije: UAE/400 W. U slučaju ekstrakta alge *Fucus virsoides* najbolji učinak imao je kombinirani utjecaj metode i temperature: MAE/30 °C, metode i vremena ekstrakcije: MAE/25 minuta te metode i snage ekstrakcije: MAE/530 W (tablica 14).

U istraživanju koje su proveli Safari i sur. (2015) na zelenoj algi *Chaetomorpha sp.* za ekstrakte ispitane DPPH metodom utvrđeni su optimalni parametri MAE: snaga 300 W i trajanje 8 minuta.

Rashad i sur. (2021) u svome su radu provedenome na algi *Ulva lactuca* odredili optimalne parametre UAE ekstrakcije za antioksidacijsku aktivnost koji su bili: 1 sat, 50 %-tni etanol i 25 °C.



## 5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati masenih udjela pigmenata određenih u svim dobivenim ekstraktima su pokazali da je zastupljenost pigmenata sljedeća: klorofil a (derivat 3) > neoksantin (derivat 2) > fukoksantin > neoksantin (derivat 1) > klorofil b > lutein (derivat) > klorofil a (derivat 4) > klorofil a (derivat 2) > zeaksantin (derivat) > lutein > zeaksantin > klorofil a (derivat 1).
2. Ekstrakti alge *Dicytota dichotoma* prosječno su sadržavali najveće količine pigmenata u odnosu na ekstrakte drugih algi, zatim ekstrakti vrste *Dictyota fasciola*. Manje količine određene su u ekstraktima vrsti *Cutleria multifida* i *Fucus virsoides*, a daleko najmanje količine pigmenata određene su u svim ekstraktima zelene alge *Dasycladus vermicularis*.
3. Na prinos ukupnih karotenoida kod ekstrakata algi *Dictyota fasciola*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* najbolji učinak imala je MAE pri 30 °C, 25 minuta i 530 W, dok je kod ekstrakata alge *Dictyota dichotoma* najbolji učinak imala također MAE, ali pri 50 °C, 30 minuta i 400 W.
4. Na prinos ukupnih klorofila kod ekstrakata algi *Dictyota dichotoma*, *Cutleria multifida*, *Fucus virsoides* i *Dasycladus vermicularis* najbolji učinak imala je MAE pri 30 °C, 25 minuta i 530 W, dok je kod ekstrakata alge *Dictyota fasciola* najbolji učinak imala MAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W.
5. MAE se pokazala učinkovitijom za prinos karotenoida i klorofila u odnosu na UAE.
6. Ekstrakti dobiveni primjenom MAE imali su veću AOA ispitanu DPPH metodom kod ekstrakata vrsti *Dictyota fasciola*, *Cutleria multifida* i *Dasycladus vermicularis*, dok se kod vrsti *Dictyota dichotoma* i *Fucus virsoides* boljom pokazala UAE. Kod rezultata AOA dobivenih ABTS metodom MAE je imala bolji učinak od UAE kod svih ekstrakata algi.
7. Kod ekstrakata algi *Dictyota fasciola* i *Dasycladus vermicularis* na AOA određen DPPH metodom najbolji učinak imala je MAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W, kod vrste *Dictyota dichotoma* UAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W, kod alge *Cutleria multifida* MAE pri 30 °C, 25 minuta i 530 W, a kod alge *Fucus virsoides* UAE pri 30 °C, 25 minuta i 530 W.
8. Kod ekstrakata algi *Dictyota fasciola*, *Dictyota dichotoma* i *Dasycladus vermicularis* na AOA određen ABTS metodom najbolji učinak imala je MAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W, kod alge *Cutleria multifida* UAE pri 50 °C, 30 minuta i 400 W, dok je kod alge *Fucus virsoides* najbolji učinak na AOA imala MAE pri 30 °C, 25 minuta i 530 W.

## 6. LITERATURA

- Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer JP, Mason TJ (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem* **11**, 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.015>
- Alves A, Sousa RA, Reis RL (2013) A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J Appl Phycol* **25**, 407–424. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9875-4>
- Antolić B, Nikolić V, Žuljević A (2011) Crveni popis morskih algi i morskih cvjetnica Hrvatske. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. Izvještaj projekta, str. 1–61.
- Arora M, Sahoo D (2015) Green algae. U: Sahoo D, Seckbach J (ured.), *The algae world*, (Springer, New York/London, str. 91–120.
- Azevedo E, *Dicyota dichotoma*, 2022., <https://www.inaturalist.org/observations/119633328>  
Pristupljeno 23. kolovoza 2022.
- Bachtler S, Bart H-J (2021) Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. *Food Bioprod Process* **125**, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.009>
- Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H (2013) *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem* **138**, 1764–1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Bárcenas Graniel JF, *Dasycladus vermicularis*, 2017., <https://www.inaturalist.org/photos/12212039> Pristupljeno 23. kolovoza 2022.
- Barsanti L, Gualtieri P (2014) *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology*, 2. izd., Taylor & Francis, Boca Raton, str. 1–48.
- Blaženčić J (1990) *Sistematika algi*, 2. izd., Naučna knjiga, Beograd.
- Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva: pregledni rad. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 32–47.
- Bold HC, Alexopoulos CJ, Delevoryas T (1987) *Morphology of Plants and Fungi*, 5. izd., Harper & Row Publishers, New York, str. 112–131.
- Bousbia N, Vian AM, Ferhat MA, Petitcolas E, Meklati BY, Chemat F (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chem* **114**, 355- 362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106>

- Brachet A, Christen P, Veuthey JL (2002) Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem Anal* **13**, 162–169. <https://doi.org/10.1002/pca.637>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* **28**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brnčić M, Tripalo B, Penava A, Karlović B, Ježek D, Vikić Topić D, i sur. (2009) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri obradi hrane. *Croat J Food Sci Technol* **4**, 32-37, <https://hrcak.srce.hr/49942>. Pristupljeno 2. siječnja 2023.
- Brnčić M, Karlović S, Rimac Brnčić S, Penava A, Bosiljkov T, Ježek D, i sur.(2010) Textural properties of infra-red dried apple slices as affected by high power ultrasound pre-treatment. *Afr J Biotech* **9**, 6907. <https://doi.org/10.4314/AJB.V9I41>
- Burrows EM (1991) Seaweeds of the British Isles: Chlorophyta, 2. izd., Natural History Museum, London.
- Camel V (2000) Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Anal Chem* **19**, 229–248. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00185-5)
- Castro-Puyana M, Pérez-Sánchez A, Valdés A, Ibrahim OHM, Suarez-Álvarez S, Ferragut JA, i sur.(2017) Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with antiproliferative activity against human colon cancer cells. *FoodRes Int* **99**, 1048–1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.021>
- Chakdar H, Pabbi S (2017) Algal Pigments for Human Health and Cosmeceuticals. U: Rastogi RP, Madamwar D, Pandey A, (ured.) Algal Green Chemistry, Elsevier, Amsterdam, str. 171-188.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire A-G, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier A-S, Abert-Vian M (2017a) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* **34**, 540–60. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier AS, i sur. (2017b) Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov Food Sci Emerg Technol* **41**, 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
- Conde E, Moure A, Domínguez H, Parajó JC (2010) Extraction of natural antioxidants from

plant foods. U: Rizvi SSH (ured.), Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 506-594.

Connan S (2015) Spectrophotometric assays of major compounds extracted from algae. *Methods Mol Biol* **1308**, 75–101. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_3)

Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Colombo I, Ingadottir B, Jonsdottir R, i sur. (2020) Characterization of antioxidant potential of seaweed extracts for enrichment of convenience food. *Antioxidants* **9**, 249. <https://doi.org/10.3390/antiox9030249>

Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, Perego P, Avogadro M, Cintas P (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrason Sonochem* **15**, 898–902. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.10.009>

Cuellar-Bermudez SP, Aguilar-Hernandez I, Cardenas-Chavez DL, Ornelas-Soto N, Romero-Ogawa MA, Parra-Saldivar R (2015) Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microb Biotechnol* **8**, 190-209. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12167>

Dang TT, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett J (2018) Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. *Int J Food Sci Technol* **53**, 174-181. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13571>

Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G (2007) Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry* **103**, 891-899. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.041>

Dawes C (2016) Chapter 4: Macroalgae Systematics. U: Florence J, Levine I, (ured.), Seaweed in Health and Disease Prevention, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, str. 107- 148.

Delgado-Vargas F, Jimenez A, Paredes-Lopez O (2000) Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* **40**, 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

Devgun M, Nanda A, Ansari SH (2012) Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus marsupium* Roxb. *Acta Pol Pharm*, **69**, 475–485.

Dey S, Rathod VK (2013) Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason Sonochem* **20**, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.010>

- Deyab MA, El-Katony TM, El-Adl MF, Ward FM (2017) Temporal variation in chemical composition of *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux (*Dictyotales, Phaeophyceae*) from Red Sea Coast, Egypt. *J Coast Life Med* **5**, 149–155. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J7-3>
- Dominguez H (2013) Algae as a source of biologically active ingredients for the formulation of functional foods and nutraceuticals. U: Dominguez H (ured.) Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 1-23.
- Duan X, Zhang W, Li X, Wang B (2006) Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem* **95**(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.015>
- Dujmić F, Brnčić M, Karlović S, Bosiljkov T, Ježek D, Tripalo B, i sur. (2013) Ultrasound-Assisted Infrared Drying of Pear Slices: Textural Issues. *J Food Process Eng* **36**, 397-406. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12006>
- El-Gamal AA (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* **18**, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
- Encyclopedia Britannica (2011) Plants, Algae And Fungi, Britannica Illustrated Science Library Series, Encyclopedia Britannica Inc, London, UK, str. 18-34.
- Eskilsson S, Bjorklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chrom A* **902**, 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)
- Fabrowska J, Messyas B, Szyling J, Walkowiak J, Łęska B (2018) Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods. *Phycol Res* **66**, 52-57. <https://doi.org/10.1111/pre.12191>
- Ferruzzi MG, Bohm V, Courtney PD, Schwartz SJ (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J Food Sci* **67**, 2589-2595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08782.x>
- Fратиanni A, Cinquanta L, Panfili G (2010) Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Sci Technol* **43**, 867–871. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.011>
- 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>

- Ganesan AR, Tiwari U, Rajauria G (2019) Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Sci Hum Well* **8**, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.08.001>
- 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**, 113. <https://doi.org/10.3390/md20020113>
- Georgiopoulou I, Tzima S, Louli V, Magoulas K (2023) Process Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Compounds from *Chlorella vulgaris* and Comparison with Conventional and Supercritical Fluid Extraction. *Appl Sci* **13**, 2740. <https://doi.org/10.3390/app13042740>
- Gljušić E, *Fucus virsoides*, 2016., <https://www.inaturalist.org/photos/50148972>  
Pristupljeno 23. kolovoza 2022.
- González L (2001) Determination of photosynthetic pigments, U: Reigosa RMJ (ured.), Handbook of Plant Ecophysiology Techniques, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str. 65-80.
- González M, Barrios S, Budelli E, Pérez N, Lema P, Heinzen H (2020) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds in fresh and freeze-dried *Vitis vinifera* cv *Tannat* grape pomace. *Food Bioprod Process* **124**, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.09.012>
- Griffiths M, Harrison STL, Smit M, Maharajh D (2016) Major commercial products from micro- and macroalgae. U: Bux F, Chisti Y (ured.), Algae biotechnology; products and processes, Springer International Publishing, Cham, str. 269–300.
- Herceg Z, Brnčić M, Jambreč Režek A, Rimac Brnčić S, Badanjak M, Sokolić I (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59**, 65-69.
- Heo SJ, Hwang JY, Choi JI, Han JS, Kim HJ, Jeon YJ (2009) Diphloretohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* **615**, 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.05.017>
- Heriyanto H, Shioi Y, Limantara L, Brotosudarmo THP (2017) Analysis of pigment composition of brown seaweeds collected from Panjang Island, Central Java, Indonesia. *Philipp J Sci* **146**, 323-330.

- Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK (2010) Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *Int J Chem Eng* **2010**, 11. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021) Alge. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=1687> Pristupljeno 9. kolovoza 2022.
- Jeon YJ, Wijesinghe WP, Kim SK (2012) Enzyme-assisted extraction and recovery of bioactive components from seaweeds. U: Kim S (ured.), Handbook of marine macroalgae: Biotechnology and applied phycology, John Wiley & Sons, West Sussex, str. 221-228.
- 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**, 4667- 4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>
- Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem Anal* **13**, 105–113. <https://doi.org/10.1002/pca.631>
- Khan S, Kong C, Kim J, Kim S (2010) Protective effect of *Amphiroa dilatata* on ROS induced oxidative damage and MMP expressions in HT1080 cells. *Biotechnol Bioprocess Eng* **15**, 191–198. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0052-9>
- Kim S, Wijesekara I (2010) Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J Funct Foods* **2**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- Kohen R, Nyska A (2002) Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**, 620-650. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Kong W, Liu N, Zhang J, Yang Q, Hua S, Song H, i sur. (2014) Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *J Food Sci Technol* **51**, 2006-2013. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0706-z>
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* **26**, 459-516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
- Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y (2005) Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J Food Compost Anal* **18**, 625-633. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.06.015>
- Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of

- bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: a review. *Ultrason Sonochem* **70**, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Lalegerie F, Gager L, Stiger-Pouvreau V, Connan S (2020) The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: Effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. *Adv Bot Res* **95**, 247-287. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.11.007>
- Le Lann K, Surget G, Couteau C, Coiffard L, Cerantola S, Gaillard F i sur. (2016) Sunscreen, antioxidant, and bactericide capacities of phlorotannins from the brown macroalga *Halidrys siliquosa*. *J Appl Phycol* **28**, 3547-3559. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0853-0>
- Leyton A, Pezoa-Conte R, Barriga A, Buschmann AH, Mäki-Arvela P, Mikkola JP, i sur. (2016) Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design. *Algal Res* **16**, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.019>
- 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**, 49. <https://doi.org/10.3390/md15020049>
- Lim SN, Cheung PC, Ooi VE, Ang PO (2002) Evaluation of antioxidative activity of extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agr Food Chem* **50**, 3862-3866. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020096b>
- Lovrić V, Putnik P, Bursać Kovačević D, Jukić M, Dragović-Uzelac V (2017) Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol Biotechnol* **55**, 243–250. <https://doi.org/10.17113/tb.55.02.17.4687>
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave Assisted Extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research:review article. *Pharmacogn Rev* **1**, 7-18.
- Marinho-Soriano E, Fonseca P, Carneiro M, Moreira W (2006) Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour Technol* **97**, 2402-2406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.014>
- Martin W, *Culteria multifida*, 2021., <https://www.inaturalist.org/photos/156450157>  
Pristupljeno 23. kolovoza 2022.
- Mason TJ, Luche JL (1996) Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. U: van Eldk R,



Hubbard CD (ured.), Chemistry under extreme or non classical conditions, John Wiley and sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, New York., str. 317-380.

Mejdandžić M (2015) Determinacijski ilustrirani ključ makroalgi Jadranskog mora (interni terenski ključ za studente), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Montero L, Herrero M, Ibanez E, Cifuentes A (2014) Separation and characterization of phlorotannins from brown algae *Cystoseira abies-marina* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Electrophoresis* **35**, 1644–1651. <https://doi.org/10.1002/elps.201400133>

Montero-Calderon A, Cortes C, Zulueta A, Frigola A, Esteve MJ (2019) Green solvents and ultrasound-assisted extraction of bioactive orange (*Citrus sinensis*) peel compounds. *Sci Rep* **9**, 16120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52717-1>

Namvar F, Mohamad R, Baharara J, Zafar-Balanejad S, Fargahi F, Rahman HS (2013) Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*). *BioMed Res Int*, 604787. <https://doi.org/10.1155/2013/604787>

Nguyen NHK, An NTD, Anh PK, Truc TT (2021) Microwave-assisted extraction of chlorophyll and polyphenol with antioxidant activity from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. in Vietnam. *Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Coimbatore, India, **1166**, 012039. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1166/1/012039>

Pagels F, Pereira RN, Vicente AA, Guedes AC (2021) Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria—A review on current methodologies. *Appl Sci* **11**, 5187. <https://doi.org/10.3390/app11115187>

Pangestuti R, Kim S (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods* **3**, 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>

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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>

Pellegrini N, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F, i sur.(2003) Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different *In Vitro* Assays. *J Nutr* **133**, 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>

- Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E (2008) In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci Technol* **19**, 31-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>
- Poojary MM, Barba FJ, Aliakbarian B, Donsi F, Pataro G, Dias DA i sur. (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Mar Drugs* **14**, 214. <https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Povey MJW, Mason TJ (1998) *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic and Professional, London.
- Rashad S, El-Chaghaby G, Lima EC, Simoes dos Reis G (2021) Optimizing the ultrasonic-assisted extraction of antioxidants from *Ulva lactuca* algal biomass using factorial design. *Biomass Convers Biorefin*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01516-8>
- Razi Parjikolaei B, Cardoso LC, Fernandez-Ponce MT, Serrano CM, Bruhn A, Christensen KV, i sur. (2014) Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Planta Med* **80**, <https://doi.org/10.1055/s-0034-1394616>
- Renoult J, *Dictyota fasciola*, 2018., <https://inaturalist.ala.org.au/photos/14815075a>  
Pristupljeno 23. kolovoza 2022.
- Režek Jambrak A, Lelas V, Herceg Z, Badanjak M, Werner Z (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kem Ind* **59**, 169–177 <https://hrcak.srce.hr/50494>.  
Pristupljeno 18. veljače 2023.
- Rindi F, Soler-Vila A, Guiry MD (2012) Taxonomy of Marine Macroalgae Used as Sources of Bioactive Compounds. U: Hayes M (ured.), *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, str. 1-53.
- Romero-Díez R, Matos M, Rodrigues L, Bronze MR, Rodríguez-Rojo S, Cocero MJ, i sur. (2019) Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food Chem* **272**, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.016>
- Safafar H, Van Wagenen J, Møller P, Jacobsen C (2015) Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Mar Drugs* **13**, 986-1002. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- 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**, 2974-2981.

<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1355-1>

Saini RK, Keum YS (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem* **240**, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>

Saito K, Suzuki T, Ishikita H (2018) Absorption-energy calculations of chlorophyll a and b with an explicit solvent model. *J Photochem Photobiol* **358**, 422-431. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.10.003>

Sathasivam R, Radhakrishnan R, Hashem A, Abd\_Allah EF (2017) Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J Biol Sci* **24**, 7339-7356. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>

Shahidi F, Rahman MJ (2018) Bioactives in seaweeds, algae, and fungi and their role in health promotion. *J Food Bioact* **2**, 58-81. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.2141>

Shang A, Luo M, Gan R-Y, Xu X-Y, Xia Y, Guo H, i sur. (2020) Effects of microwave-assisted extraction conditions on antioxidant capacity of sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.). *Antioxidants* **9**, 678. <https://doi.org/10.3390/antiox9080678>

Soroush DR, Solaimanimehr S, Azizkhani M, Kenari RE, Dehghan B, Mohammadi G, i sur. (2021) Optimization of microwave-assisted solvent extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil using RSM: Evaluation of oil quality. *J Food Meas Charact* **15**, 5191–5202. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01087-2>

Sumanta N, Haque CI, Nishika J, Suprakash R (2014) Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Res J Chem Sci* **4**, 63-69. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340072>

Suslick K (1990) Sonochemistry, *Science* **247**, 1439-1445. <https://doi.org/10.1126/science.247.4949.1439>

Suslick KS (1994) The chemistry of ultrasound. U: Calhoun D (ured.), *The Yearbook of Science and the Future 1994*; Encyclopaedia Britannica, Chicago, str. 138-155.

Tronholm A, Steen F, Tyberghein L, Leliaert F, Verbruggen H, Antonia Ribera Siguan M, i sur. (2010) Species delimitation, taxonomy, and biogeography of *Dictyota* in Europe (*Dictyotales*, *Phaeophyceae*), *J Phycol* **46**, 1301-1321. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00908.x>

Verma P, Arun A, Sahoo D (2015) Brown algae. U: Sahoo D, Seckbach J, (ured.), *The algae world*, Springer, New York/London, str. 177–204.

Vinatoru M (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive

- principles from herbs. *Ultrason Sonochem* **8**, 303-313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech* **17**, 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wijesinghe WJ, Jeon YJ (2013) Enzymatic extraction of bioactives from algae. U: Domínguez H, (ured.), *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 517-533.
- Wu SC, Wang FJ, Pan CL (2010) The comparison of antioxidative properties of seaweed oligosaccharides fermented by two lactic acid bacteria. *J Mar Sci Technol* **18**, 537-545. <https://doi.org/10.51400/2709-6998.1908>
- Xu BJ, Chang SKC (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* **72**, 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Yaich H, Garna H, Besbes S, Paquot M, Blecker C, Attia H (2013) Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocoll* **31**, 375-382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.013>
- Yuan YV, Bone DE, Carrington MF (2005) Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*. *Food Chem* **91(3)**, 485-494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.039>
- Zafra-Rojas QY, González-Martínez BE, Cruz-Cansino NDS, LópezCabanillas M, Suárez-Jacobo Á, Cervantes-Elizarrarás A i sur. (2020) Effect of ultrasound on *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of blackberry (*Rubus fruticosus*) Residues cv. Tupy. *Plant Foods Hum Nutr* **75**, 608–613. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00855-7>
- Zhang L, Fan G, Khan MA, Yan Z, Beta T (2020) Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues. *Food Chem* **323**, 126714. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126714>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUCIJA KOVAČEC 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