

Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz odabranih morskih algi i spužve

Špoljar, Željka

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:159:196651>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Željka Špoljar

**MIKROVALOVIMA
POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA
BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
ODABRANIH MORSKIH ALGI I
SPUŽVE**

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



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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ ODABRANIH MORSKIH ALGI I SPUŽVE

Željka Špoljar, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058205859

Sažetak: Cilj ovog rada bio je utvrditi maseni udio ukupnih fenola i pigmentata u ekstraktima morske spužve i raznih vrsta algi dobivenih ekstrakcijom uz pomoć mikrovalova. Više uzoraka algi vrsta *Fucus virsoides* i *Cystoseira barbata* uzorkovano je u različito vrijeme. Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski u analiziranim uzorcima u rasponu od 34,6 do 3607,8 mg/100 g s.tv. HPLC metodom određeni su i ukupni karotenoidi (13,83-770,95 mg/100 g s.tv.) i klorofili (1,34-292,01 mg/100 g s.tv.). Antioksidacijska aktivnost određena je ORAC (119,33-411,72 μmol Trolox/100 g s.tv.), ABTS (96,40-6473,86 μmol Trolox/100 g s.tv.) i DPPH metodom (1733,38-3200,85 μmol Trolox/100 g s.tv.). Utvrđene su statistički značajne razlike u masenim udjelima ukupnih fenola, karotenoida i klorofila u ispitivanim uzorcima. Maseni udio ukupnih fenola u smeđim algama *Fucus virsoides* i *Cystoseira barbata* varirao je ovisno o godišnjem dobu i bio je najveći u jesen.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, ukupni fenoli, pigmenti, alge, spužva

Rad sadrži: 42 stranice, 4 slike, 11 tablica, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Sandra Pedisić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Zrinka Čošić, Patricija Čulina, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Maja Repajić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Sandra Pedisić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (član)
4. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (zamjenski član)

Datum obrane: 25. rujna 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: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SELECTED MARINE ALGAE AND SPONGE

Željka Špoljar, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058205859

Abstract: The aim of this study was to determine the mass fraction of total phenols and pigments in extracts of marine sponge and various algal species obtained by microwave-assisted extraction. Several samples of algae species *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata* were sampled at different times. Total phenols were determined spectrophotometrically in the analyzed samples and ranged from 34.6 to 3607.8 mg/100 g dm. Total carotenoids (13.83-770.95 mg/100 g dm) and chlorophylls (1.34-292.01 mg/100 g dm) were also determined by the HPLC method. Antioxidant activity was determined by ORAC (119.33-411.72 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g dm}$), ABTS (96.40-6473.86 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g dm}$) and DPPH method (1733.38-3200.85 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g dm}$). Statistically significant differences were found in the mass fractions of total phenolics, carotenoids and chlorophyll in the studied samples. The mass fraction of total phenolics in the brown algae *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata* varied depending on the season and was highest in autumn.

Keywords: *antioxidant activity, total phenols, pigments, algae, sponge*

Thesis contains: 42 pages, 4 figures, 11 tables, 50 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Sandra Pedisić, assistant professor

Technical support and assistance: PhD Zrinka Čošić, Patricija Čulina, PhD Research Assistant

Reviewers:

1. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (president)
2. Sandra Pedisić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ivona Elez Garofulić, PhD, Associate professor (member)
4. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 25th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 MORSKI ORGANIZMI JADRANSKOG MORA	2
2.1.1. Morske alge i spužve	2
2.1.2. Značaj algi u prehrani i zdravlju	3
2.1.3. Bioaktivni spojevi algi	4
2.1.3.1. Fenolni spojevi	5
2.1.3.2. Pigmenti	6
2.1.3.2.1. Klorofili	6
2.1.3.2.2. Karotenoidi	7
2.1.3.2.3. Fikobiliproteini	10
2.2. METODE EKSTRAKCIJE	10
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)	10
2.3. ODREĐIVANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM SPEKTROFOTOMETRIJSKIH I KROMATOGRAFSKIH METODA	11
2.3.1. Spektrofotometrijske metode	11
2.3.2. Kromatografske metode	12
2.3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Uzorak	14
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE	16
3.2.1. MAE	16
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	17
3.2.3. Određivanje pigmenata primjenom HPLC-UV VIS/DAD metode	18
3.2.3.1. Kromatografska analiza	18
3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	20
3.2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom	20
3.2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH• metodom	22
3.2.4.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom	22
3.3. OBRADA PODATAKA	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. MASENI UDIO UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA ALGI I SPUŽVE	

DOBIVENIM PRIMJENOM MAE	24
4.2. MASENI UDIO KAROTENOIDA U EKSTRAKTIMA ALGI I SPUŽVE DOBIVENIM PRIMJENOM MIKROVALNE EKSTRAKCIJE	27
4.3 MASENI UDIO KLOROFILA U EKSTRAKTIMA ALGI I SPUŽVE DOBIVENIM PRIMJENOM MAE	31
4.4 ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ODREĐENA PRIMJENOM ORAC, ABTS I DPPH METODE	33
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

U posljednje vrijeme sve veća važnost pridaje se morskim organizmima jer su bogat izvor hranjivih i ljekovitih tvari te imaju veliki potencijal u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Alge su bogat izvor različitih bioaktivnih spojeva kao što su lipidi, karotenoidi, proteini, fenoli, vitamini i polisaharidi, a čija koncentracija ovisi o brojnim faktorima kao što su na primjer morska dubina, osvjetljenost, valovi, struje, vrsta morskog dna, godišnje doba odnosno o uvjetima okoliša (Herrero i sur., 2010). Brojna istraživanja pokazuju da zbog prisustva bioaktivnih spojeva alge pokazuju brojna biološka djelovanja kao što su antioksidativno, protuupalno, antibakterijsko, antitumorsko i antikoagulantno djelovanje. Biološki aktivni spojevi u algama koji su predmet ovog rada su fenolni spojevi te pigmenti karotenoidi i klorofili. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazuje brojne prednosti nad konvencionalnim metodama zbog značajnog smanjenja trajanja ekstrakcije i upotrebe otapala, poboljšanog prinosa i pogodna je za ekstrakciju termolabilnih spojeva. Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti maseni udio biološki aktivnih spojeva u algama, s obzirom na različito vrijeme probira unutar iste vrste te između različitih vrsta algi. Za izolaciju bioloških spojeva iz uzoraka algi korištena je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima iz liofiliziranih uzoraka algi pri uvjetima ekstrakcije 25 °C, 25 min, 300 W. U dobivenim ekstraktima udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom, a primjenom HPLC-UV-VIS/DAD metode identificirani i kvantificirani su karotenoidi i klorofili. Antioksidacijska aktivnost u dobivenim ekstraktima određena je primjenom ABTS, DPPH i ORAC metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 MORSKI ORGANIZMI JADRANSKOG MORA

Biološka raznolikost Jadranskog mora je velika i ovisi o dubini, o osvjetljenosti, tipu morskog dna i obale, valovima, morskim strujama. Iako većinu svojih karakteristika dijeli sa Sredozemnim morem, krška obala mu daje mnoge specifičnosti. U Jadranu je dosad zabilježeno 2597 vrsta algi (152 endema), 5647 vrsta beskraljeznjaka (1 endem), 451 vrsta riba (6 endema), 3 vrste morskih kornjača, 4 vrste sisavaca te vrsta poput sredozemne medvjedice i nekih kitova koji se povremeno pojavljuju (Prvan i sur., 2016).

2.1.1. Morske alge i spužve

Morske alge su skupina fotosintetskih organizama koji variraju s obzirom na veličinu i biološku strukturu. Mogu se podijeliti na mikroalge i makroalge. Makroalge izgledom podsjećaju na više biljke, no nemaju diferencirana tkiva (korijen, stabljika, list), a uključuju smeđe (*Phaeophyceae*), crvene (*Rhodophyceae*) i zelene alge (*Chlorophyceae*). Mikroalge uključuju cijanobakterije (*Cyanobacteria*), dinoflagelate (*Dinoflagellata*), dijatomeje (*Bacillariophyceae*) i zelene alge (*Chlorophyceae*) (Kılınç i sur., 2013). Na razini složenosti organizma alge mogu biti jednostanične, višestanične ili pak živjeti u kolonijama. S obzirom na razlike u unutarstaničnoj građi algi, razlikujemo eukariotske alge koje spadaju u carstvo Protista i prokariotske cijanobakterije koje nemaju razvijenu jezgru (jezgrinu ovojnicu) i spadaju u carstvo Monera. Njihova prirodna staništa su brojna, uključuju slatkovodne i slane tekućice, stijene te druge organizme gdje žive kao simbionti. Osnovni uvjeti za rast su im povoljna vlažnost i dostupnost svjetlosti za obavljanje fotosinteze, pri čemu konvertirajući energiju sunčevog zračenja i stvarajući vlastiti resurs kemijske energije u obliku složenih ugljikohidratnih spojeva iz ugljikovog dioksida, sudjeluju u kružnom ciklusu ugljika u prirodi. Kao nusproizvod procesa fotosinteze nastaje i kisik te su alge su i najveći proizvođač kisika na Zemlji. Kao sustav obrane od raznovrsnih vanjskih utjecaja (fizičkih, kemijskih) biljke sintetiziraju različite sekundarne metabolite, pohranjene unutar citoplazme stanice (Munir i sur., 2013). Uslijed te prilagodbe biljke na okoliš, iste vrste biljaka mogu imati različite koncentracije istih ili različitih biljnih metabolita (Jimenez-Lopez i sur., 2020). Kako je Jadransko more specifično stanište radi visokog saliniteta (35 – 28.5 ‰) i relativne male dubine (do 200 m), prisutni organizmi razvijaju prilagodbe na temperaturne oscilacije (7-27 °C) te povećano UVA i UVB zračenje (Grbec i sur., 2018). To je rezultiralo nastankom brojnih endemskih vrsta Jadranskog mora koje nastanjuju

152 endemske vrste od dosad zabilježenih ukupno 2 597 vrsta algi (Grozđanić i sur., 2019). Jedna od endemskih vrsta je smeđa alga Jadranski bračić (*Fucus virsoides*) koja je istraživana unutar ovoga rada. Smeđe alge najbrojnija su skupina algi u Jadranskom moru, a među njima najznačajnije su alge cistozire. U smeđe alge također spadaju *Sargasumi* koje su jedne su od većih algi Jadranskog mora. Od zelenih algi najpoznatija je morska salata *Ulva lactuca*, koja se nalazi u plićim djelovima mora pričvršćena za stijene. Najpoznatije crvene alge su koralinske alge roda *Lithothamnion* i *Phymatolithon* koje u svoja tijela ugrađuju kalcijev karbonat. Koralinske alge (*Corallina elongata*, *Peyssonnelia rubra*) zajedno sa spužvama, koraljima, mahovnjacima čine jedinstvenu koraligensku biocenozu karakterističnu za Jadransko more (Kovačev, 2014). Fotosinteza je proces koji se odvija pri visokim koncentracijama kisika i svjetlosti, no kako na stanicama algi koje su izložene takvim uvjetima ne nastaje očekivana šteta, zaključeno je da bi sekundarni metaboliti alga mogli istu protektivnu funkciju imati i u ljudskom organizmu zbog čega farmaceutske tvrtke stavljaju fokus na istraživanja njihovih bioloških aktivnosti, a naročito njihovo antioksidativno djelovanje (Munir i sur., 2013). Jedni od sekundarnih metabolita algi koji djeluju kao antioksidanti su pigmenti. Zbog prisustva dvostrukih veza u svojoj strukturi štite druge molekule od oksidativnog stresa, osiguravajući zdravstvenu dobit organizma. Od pigmenata su najzastupljeniji klorofili (fotosintetski pigment) i karotenoidi. Najznačajniji predstavnici skupine pigmenta crvene, žute i narančaste boje (karotenoidi) osim β -karotena su lutein (žuti pigment), astaksantin (crveni pigment), fikeoritrin (crveni pigment), fukoksantin (smeđi pigment) i fikocijanin (modri pigment) (Kitada i sur., 2009). Morske spužve su jako važan dio Jadranskog akvatorija, a iako su jednostavne građe pripadaju u životinje i beskralježnjake, a ne u biljke. Najpoznatije spužve su ružičasta cjevasta (*Haliclona mediterranea*), crvena (*Phorbis fictitius*), bubrežasta (*Chondrosia reniformis*) i dr. Zbog različitog sastava biološki aktivnih spojeva spužve imaju potencijalnu medicinsku ulogu (Prvan i sur., 2016).

2.1.2. Značaj algi u prehrani i zdravlju

Kvaliteta nutritivnog sastava algi, ali i njihovih organoleptičkih svojstava prepoznata je i dobro iskorištena u azijskoj kuhinji, gdje su alge važan sastojak mnogih jela i začina. U Kini upotreba algi u prehrani datira od 500 g. pr. Kr., a danas se po uporabi ističu Koreja i Japan. Iako se alge ne koriste dovoljno u Europi kod pripreme jela kao u Aziji, ipak postoje zapisi o uporabi algi u vrijeme Hipokrata (Mendes i sur., 2022). Alge su niskokalorične, sadrže visok udio vode uz dosta prehrambenih vlakana, što ih čini iznimno korisnom namirnicom kod poteškoća s

probavom i održavanja redukcijских dijeta. Trend koji prati razvijene zemlje zbog visokokalorične, neuravnotežene prehrane i smanjene tjelesne aktivnosti je porast incidencije krvožilnih bolesti, dijabetesa i pretilosti (Herrero i sur., 2010). Zbog blagotvornih učinaka na zdravlje, alge ovdje nalaze svoju primjenu, a na tržištu su najčešće prepoznate kao suplementi za mršavljenje i kao izvor vitamina B12 i B9 kod vegetarijanaca. Kod suplemenata na bazi algi u sastavu najčešće nalazimo fikocijanin, astaksantin, polisaharide, β -karoten, fikoeritrin, a uzimaju se u obliku kapsula, tableta ili praha (Ranga Rao, 2018). Nije zanemariv niti udio minerala, poglavito kalcija i magnezija te joda. Magnezij snižava vrijednosti krvnog tlaka, a uz omega-3 masne kiseline koje su također prisutne u algama povoljno djeluju na tijek liječenja bolesti krvožilnog sustava. Alge sadrže i visok udio joda, koji ima povoljno djelovanje na metabolizam joda kod bolesti štitnjače. Od vitamina, u značajnijem udjelu su vitamini A, C, E i B12. Koncentracije vitamina B12, B1, pantotenske i folne kiseline su uglavnom više u crvenim i zelenim algama, a smeđe alge sadrže višu koncentraciju joda. U sastavu algi je sadržano oko 50 % složenih šećera, 7 % bjelančevina, 30 % minerala i vitamina, oko 20 % vode i svega do 5 % masti (Kılınç i sur., 2013). Alge se sve više koriste za proizvodnju funkcionalne hrane koja osim svoje nutritivne vrijednosti povoljno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija tijela, smanjuje rizik pojave pojedinih bolesti i poboljšava opće zdravstveno stanje ljudi zbog prisutnosti fenolnih spojeva, omega-3 masnih kiselina, bioaktivnih peptida i proteina, karotenoida te polisaharida (Holdt i Kraan, 2011; Roberfroid, 2000). Brojna istraživanja provedena *in vivo* i *in vitro* modelima te kliničkim studijama ukazuju na povoljno djelovanje omega-3 masnih kiselina na bolesti srca, trombozu i aterosklerozu. Studije pokazuju smanjenje razine kolesterola u krvi kod dijeta sa sterolima algi. Vlakna algi, koja su po sastavu karagenati i sulfatirani galaktani, osim što vežu vodu te na taj način djeluju kao blagi laksativ i pogodujuć gubitku težine, također pokazuju i druge povoljne učinke kao npr. kod dijabetesa i hiperkolesterolemije smanjenje rizika od pojave raka i bolja imunološka aktivnost. Sulfatirani polisaharidi u crvene alge *Porphyra* sp. pokazali su svojstvo apoptoze kancerogenih stanica (Ranga Rao, 2018).

2.1.3. Bioaktivni spojevi algi

Alge su bogat izvor različitih bioaktivnih spojeva (lipidi, karotenoidi, proteini, fenoli, vitamini i polisaharidi), čija koncentracija ovisi o uvjetima okoliša (salinitetu, temperaturi, radijaciji, nutrijentima), a zbog prilagodljivosti uvjetima rasta, lako ih je uzgojiti te postoji mogućnost

kontroliranja produkcije bioaktivnih spojeva izmjenom uvjeta uzgoja ili korištenjem sofisticiranih metoda genetičkog inženjerstva (Herrero i sur., 2010).

2.1.3.1. Fenolni spojevi

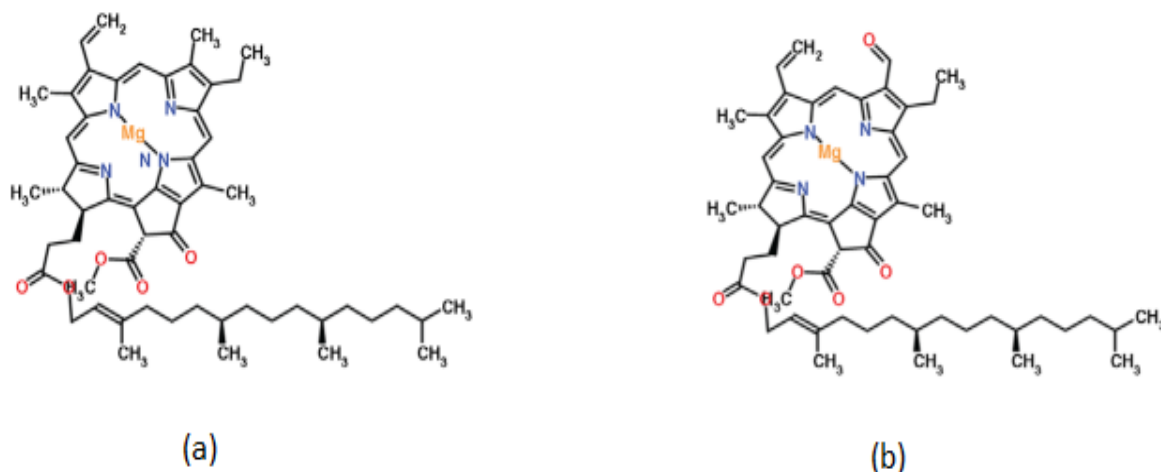
Fenoli su velika, raznolika grupa spojeva, široko rasprostranjena u prirodi, a osnovnu kemijsku strukturu fenola čini aromatski (benzenski) prsten supstituiran hidroksilnom grupom ili više njih. Podjela fenolnih spojeva je bazirana na razlikama u kemijskoj strukturi, odnosno broju vezanih hidroksilnih grupa i prisutnosti drugih strukturnih elemenata vezanih za njih. Glavne grupe fenolnih spojeva su: fenolne kiseline, kumarini, flavonoidi, stilbeni, tanini, lignani i lignini (Lopez i sur., 2020). Imaju antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva, zbog čega svoju primjenu nalaze u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji gdje se koriste kao aditivi i konzervansi (Al Mamari, 2021). Nekoliko studija ukazuje na korelaciju između koncentracije fenolnih spojeva i ukupnog antioksidativnog potencijala algi (Lopez i sur., 2020). Profil i udio fenola varira ovisno o vrsti alge, ovisno o godišnjem dobu, ali i o analiziranom dijelu biljke (Holdt i Kraan, 2011; Herrero i sur., 2010). U odnosu na zelene i crvene alge, smeđe alge imaju više koncentracije fenola (Lopez i sur., 2020). Najzastupljeniji fenoli algi su fenolne kiseline, flavonoidi, izoflavoni, flavonoli i ligani (Keyrouz i sur., 2011). Osobitu pozornost znanstvenika privukli su fenoli smeđih algi florotanini koji su karakteristični samo za te organizme, zbog svojih različitih bioloških svojstava, ali i zbog značajne uloge u razvoju stanične stijenke (Lopez i sur., 2020). Grupa polimera floratanina obuhvaća velike fenolne komponente kao što su fukoli, floretoli, fukofloretoli, halogenirani i sulfatirani florotanini. (Lopez i sur., 2020). Neki od prvih fenola detektiranih u algama *Fucus* i *Ascophyllum* spp. bili su florotanini koji se formiraju se iz floroglucinola (Herrero i sur., 2010). U crvenim algama (rod *Porphyra*) identificirani su rutin, hesperidin, morin, kafeinska kiselina, katehol, katehin i epigalokatehin galat (Herrero i sur., 2010). Kako bi se što bolje iskoristio industrijski potencijal fenola, potreban je razvoj što preciznijih metoda detekcije, izolacije i analize ovih spojeva (Al Mamari, 2021).

2.1.3.2. Pigmenti

Alge sadrže različite vrste pigmenata koji se mogu podijeliti na tri glavne grupe: klorofili, karotenoidi i fikobiliproteini (Pangestutia i Kima, 2011). Osim što se koriste u industriji kao prirodna bojila ti spojevi pokazuju razne korisne učinke na zdravlje ljudi.

2.1.3.2.1. Klorofili

Klorofili su spojevi topljivi u mastima, a u algama su smješteni u kromoplastima gdje sudjeluju u procesu fotosinteze. Apsorbiraju sve valne duljine osim zelene koju reflektiraju, zbog čega mnogim algama daju zelenu boju. Strukturno, klorofili su kompleksi tetrapiroleskog porfirinskog prstena s atomom magnezija vezanim u središtu (Pangestutia i Kima, 2011), a ovisno o supstituentima razlikujemo klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *c*, klorofil *d*, klorofil *e* i klorofil *f*. Apsorbiraju sve valne duljine osim zelene koju reflektiraju, zbog čega mnogim algama daju zelenu boju. Klorofili *a* i klorofili *b* su kemijski esteri dikarbonske kiseline klorofilina (slika 1). Klorofil *a* apsorbira valne duljine koje spadaju u spektar sunčeve svjetlosti, valne duljine pri 420 i 670 nm, dok između ovih valnih duljina ne apsorbira svjetlost. Klorofil *b* za razliku od klorofila *a* sadrži jednu formilnu skupinu umjesto metilne te apsorbira svjetlost pri 430 i 630 nm. Odnos klorofila *a* i *b* u biljkama je obično 3:1 (Holdt i Kraan, 2011). Udio klorofila *a* i klorofila *b* u algama korelira sa uvjetima staništa kao što su dubina, kloridi, nitrati, ukupne soli, ortofosfati, dok nepovoljni uvjeti utječu na morfološke promjene u strukturi alge što također utječe na udio klorofila (Nutautaitė i sur., 2022). Klorofil *a* je manje stabilan na toplinu nego klorofil *b* te se brže razgrađuje pod utjecajem topline. Klorofil prilikom procesiranja hrane prelazi u feofitin, pirofeofitin i feoforbid (Holdt i Kraan, 2011). Klorofil *c* je crveno – smeđi pigment, posjeduju ga određene smeđe alge, sličan je klorofilu *b* te pomaže apsorpciji svjetlosti no samo u početnoj fazi fotosinteze. Klorofil *d* je važan pigment crvenih algi, dok je klorofil *e* detektiran u žuto-zelenim algama. Klorofil *f* je određen u cijanobakterijama uzorkovanim u blizini Australije (Holdt i Kraan, 2011). Unos klorofila povezan je s manjim rizikom krvožilnih i kroničnih bolesti, a intravenozno se primjenjuje za smanjenje boli, upala i pankreatitisa (Pareek i sur., 2017).

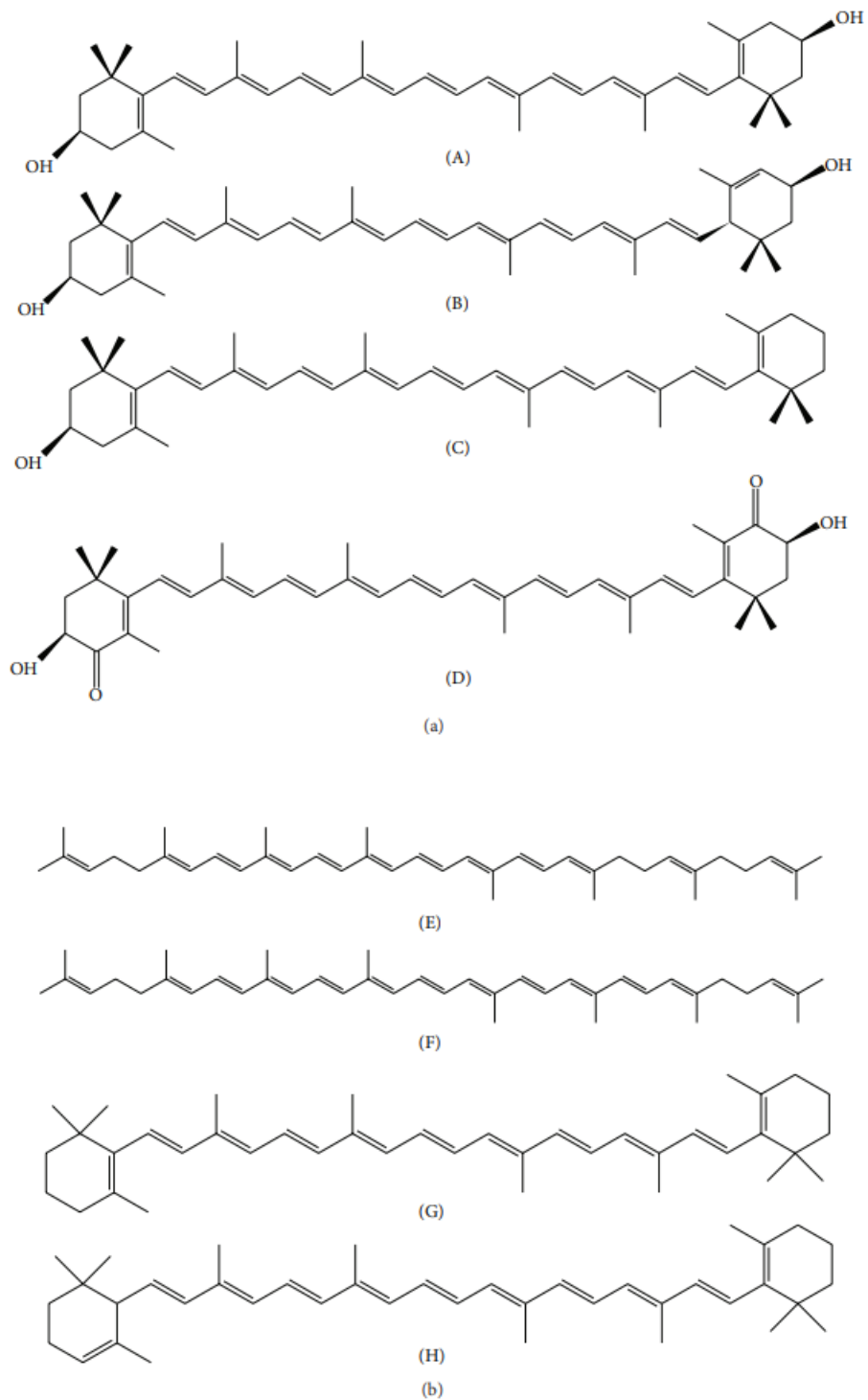


Slika 1. Klorofil *a* (a) i klorofil *b* (b) (Pareek i sur., 2017)

2.1.3.2.2. Karotenoidi

Karotenoidi su pigmenti koji služe kao skladišta svjetlosne energije i kao antioksidansi (Holdt i Kraan, 2011). Esencijalni su fotosintetski pigmenti, zajedno s klorofilima, dok su u nefotosintetskim dijelovima biljaka prekursori biljnih hormona. Po kemijskoj strukturi su tetraterpeni, sastavljeni od 8 molekula izoprena kondenziranih u dugački niz s više dvostrukih veza i s jononskim prstenovima na oba kraja (Holdt i Kraan, 2011). Imaju ulogu prijenosa svjetlošću pobuđenog stanja na klorofil (Nutautaite i sur., 2022). Također, njihova molekulska struktura stabilizira proteine tijekom smatanja u fotosintetskom komoleksu. Kao i kod klorofila, njihov udio ovisi o okolišnim čimbenicima, temperaturi, salinitetu, svjetlosti i dostupnim nutrijentima koji stimuliraju ili inhibiraju njihovu biosintezu (Herrero i sur., 2010). Pri nižim temperaturama i manjku sunčeve svjetlosti udio karotenoida je veći jer je zbog sporijeg metabolizma potrebno manje klorofila za sintezu te je veća sinteza karotenoida (Nutautaite i sur., 2022). U prirodi su prisutni u više boja, od žute i narančaste do crvene (Nutautaite i sur., 2022). Poznato je više od 600 različitih karotenoida, ne uključujući *cis* i *trans* izomere. Karotenoidi se mogu podijeliti u dvije grupe: karotenoide koji su nezasićeni ugljikovodici i ksantofile gdje su prisutne jedna ili više funkcionalnih grupa koje sadrže kisik (Pangestutia i Kima, 2011), kako je prikazano na slici 2. Crvene i zelene alge sadrže uglavnom α -karoten i β -karoten te lutein i zeaksantin, dok smeđe alge sadrže violaksantin i fukoksantin. U zelenim algama detektirani su β -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin i zeaksantin, u crvenim algama β -karoten, lutein i zeaksantin, te u smeđim algama β -karoten, violaksantin i fukoksantin. Svi fotosintetski eukarioti mogu sintetizirati likopen (Herrero i sur., 2010). β -karoten je termolabilan

narančast pigment osjetljiv na svjetlost i oksidaciju. Oksidacija LDL se smatra glavnim čimbenikom za razvoj ateroskleroze, a β -karoten inhibira lipoproteinsku oksidaciju. Unos β -karotena povezuje se s manjim rizikom od pojave srčanih bolesti (Maoka, 2019). Astaksantin, prisutan u lipidnim globulama izvan kloroplasta, smanjuje oštećenje molekulskih struktura izazvano svjetlošću, na način da smanjuje količinu svjetlosti raspoloživu proteinskim kompleksima zaduženim za apsorpciju i skladištenje svjetlosne energije (Herrero i sur., 2010). Astaksantin se pokazao kao 10 puta učinkovitiji antioksidans od β -karotena i 500 puta učinkovitiji od vitamina E (Maoka, 2019). Fukoksantin je karakterističan za smeđe alge te je određen u značajnim količinama, više od 10% ukupnih karotenoida (Herrero i sur., 2010). Ovaj ksantofil ima jedinstvenu strukturu te je stabilan u nepovoljnim uvjetima poput povišene temperature (Holdt i Kraan, 2011). Likopen u svojoj strukturi sadrži 11 konjugiranih veza te je jedan od najboljih supresora slobodnih radikala. Ima dvostruko veću antioksidativnu aktivnost u usporedbi s β -karotenom te smanjuje pojavnost raka prostate, ovarija te krvožilnih bolesti (Maoka, 2019). Više od 90 % ukupnih karotenoida (α -karoten, β -karoten, likopen, lutein, zeaksantin i β -kriptoksantin) unešenih hranom je određeno u krvi ljudi, jer se mogu akumulirati u eritrocitima. Epoksi karotenodi iz povrća međutim, nisu detektirani u krvi, moguće zbog kiselinske razgradnje u želucu. Nakon apsorpcije u tankom crijevu, dio karotenoida se konvertira u retinal u mukoznim stanicama, a dio se putem hilomikrona transportira do jetre i drugih organa. Karotenoidi su specifično raspoređeni po organima: lutein i zeaksantin na površini kože i subkutanom tkivu gdje apsorbiraju UV svjetlost, ksantofili kao β -kriptoksantin, lutein i zeaksantin akumuliraju se u mozgu, lutein i zeaksantin prisutni su u oku kao makularni pigmenti, dok se likopen akumulira u prostati. Nekoliko istraživanja potvrdilo je korelaciju između unosa karotenoida i nekih vrsta raka, primjerice unos likopena i smanjeni rizik pojave raka prostate. Istraživanja ukazuju da unos karotenoida stimulira imunološki sustav te utječe na zdravlje stanica kože (Maoka, 2019).



Slika 2. Strukture karotenoida:

(a) ksantofili : (A) zeaksantin, (B) lutein, (C) β -kriptoksantin i (D) astaksantin;

(b) karoteni: (E) neurosporen, (F) likopen, (G) β -karoten i (H) α -karoten (Mezzomo i Ferreira, 2016).

2.1.3.2.3. Fikobiliproteini

Fikobiliproteini su fluorescentni proteini topivi u vodi koji također doprinose apsorpciji svjetlosne energije, a apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra 450 – 650 nm. Nalaze se u algama rodova *Rodophyta*, *Cyanophyta* i *Cyptophyta*. Fikobiliproteini omogućuju fotosintezu na dubinama većim od 10 m gdje bi fotosinteza uz pomoć klorofila bila gotovo nemoguća (Sekar i Chandramohan, 2008). Kod mnogih algi organizirani su u stanične strukture fikobilisome koji svojim položajem u stanici osiguravaju optimalnu apsorpciju svjetlosti i prijenosa energije. Tri su glavne kategorije fikobiliproteina: fikocijanini, alofikocijanini i fikoeritrini, od kojih su fikoeritrini najzastupljeniji te se nalaze kod mnogih crvenih algi (Pangestutia i Kima, 2011).

2.2. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je metoda razdvajanja i koncentriranja tvari (Blekić i sur., 2011). Izdvajanje tvari iz homogenih smjesa temelji se na principu da spojevi imaju različitu topljivost u različitim otapalima. Općenito za ekstrakciju vrijedi slijedeće: kod ekstrakcije čvrstih tvari treba povećati površinu između faza (usitnjavanjem), u sredini povećati brzinu gibanja faza, a za povećanje količine izdvojene tvari, treba produljiti vrijeme trajanja. Za ekstrakciju se koriste konvencionalne metode poput destilacije, ekstrakcije otapalima, hladno prešanje ili napredne metode ekstrakcije kao npr., ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, potpomognuta pulsirajućim električnim poljem, mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim tekućinama, itd (Blekić i sur., 2011). Konvencionalne metode ekstrakcije zahtijevaju duže vrijeme, a nerijetko i velike količine otapala, što je skupo i ekološki neprihvatljivo te češće dolazi do degradacije analiziranih spojeva, dok su kod naprednih metoda ekstrakcije početne investicije veće no dugoročno su više isplative zbog bržeg procesa ekstrakcije te se napredne ekstrakcije sve više primjenjuju u industriji (Kadam i sur., 2013).

2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) je postupak koji koristi energiju mikrovalova za poboljšanu ekstrakciju komponenta uzorka u otapalo (Mukherjee i sur., 2020). Kemijski spojevi apsorbiraju energiju mikrovalova u omjeru njihovih dielektričnih konstanti pa će apsorbirana energija biti veća što je veća vrijednost dielektrične konstante. Izbor otapala vrlo je bitan jer utječe na apsorpciju mikrovalnog zračenja, ali i na topljivost analita. Za zagrijavanje djelovanjem energije mikrovalova prikladna su polarna otapala kao voda i etanol. Zbog oštećenja vodikovih veza polarnih molekula nastaje rotacija dipola, a kretanjem otopljenih iona

poboljšano je prodiranje otapala u biljni materijal, što poboljšava otapanje bioaktivnih spojeva (Mukherjee i sur., 2020; Blekić i sur., 2011). Povećanjem temperature povećava se učinak ekstrakcije no potrebno je izabrati optimalnu temperaturu kako ne bi došlo do degradacije termolabilnih spojeva uzorka. Osim temperature, treba obratiti pozornost i na snagu mikrovalova, kako bi se izbjegao rast temperature. Komercijalno su dostupne dvije vrste sustava za MAE: ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku (Blekić i sur, 2011).

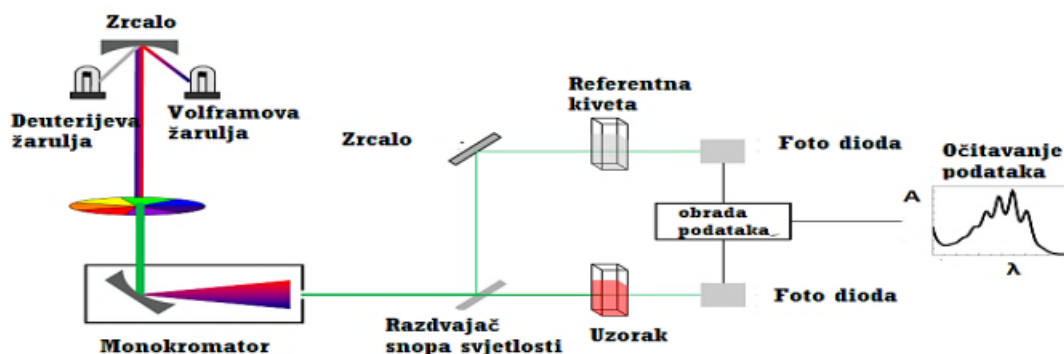
2.3. ODREĐIVANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM SPEKTROFOTOMETRIJSKIH I KROMATOGRAFSKIH METODA

2.3.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode su najčešće korištene analitičke metode, a kvantitativna analiza uzorka temelji se na Lambert-Beerovu zakonu apsorpcije prema kojem je količina apsorbiranog svjetla u otopini proporcionalna duljini optičkog puta i množinskoj koncentraciji otopljene tvari (Coulter, 2016). Glavne komponente spektrofotometra su: izvor zračenja, selektor valnih duljina (filteri, monokromatori) i detektor (Gorog, 1995) (slika 3). Izvor svjetlosti emitira elektromagnetsko zračenje, monokromator izolira svjetlost određene valne duljine koja prolazi kroz uzorak pri čemu dio svjetlosti uzorak apsorbira, a ostatak dolazi do detektora. Mjerenjem intenziteta svjetla koju je uzorak apsorbirao, odnosno apsorbancije, možemo odrediti koncentraciju analita u otopini. Ako su molarni apsorpcijski koeficijent i širina kivete poznati, tada se koncentracija c može izračunati iz Lambert - Beerova zakona:

$$c = A \varepsilon l \quad [1]$$

gdje je A - apsorbancija, ε - molarni apsorpcijski koeficijent (L/cm mol), b - duljina puta svjetlosti kroz uzorak (debljina kivete) (cm), c - množinska koncentracija (mol/L).



Slika 3. Shema spektrofotometra (Skoog, 1999)

2.3.2. Kromatografske metode

Kromatografija je metoda razdvajanja smjese pri čemu se sastojci smjese raspodjeljuju između stacionarne i mobilne faze (Skoog, 1999). Stacionarna faza je čvrsta tvar ili kapljevina koja se može nanositi na površinu plohe ili ispunjavati cijev, a može biti polarna ili nepolarna, anorganska ili organska tvar. Izbor odgovarajuće stacionarne faze povezan je s karakteristikama ispitivanog spoja, vrstom nastale veze između spoja koji se ispituje, kromatografske podloge i ravnotežom kromatografskog procesa (Ziberi i Rezić, 2015). Mobilna faza može biti plin ili tekućina koja se kreće kroz ili uzduž stacionarne faze u odgovarajućem smjeru. Otapalo koje nosi sastojke smjese kroz stacionarnu fazu naziva se eluens. Kromatogram je rezultat neke od funkcija koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu eluiranja. Kromatografski pik na osi označenoj vremenom služi za detekciju komponente, dok se ispod pika nalazi površina iz koje se može odrediti količina pojedinog sastojka (Skoog, 1999). Kromatografske metode prema mehanizmu separacije koji prevladava možemo podijeliti na adsorpcijsku kromatografiju (razdvajanje se temelji na različitim adsorpcijskim afinitetima sastojaka uzorka za površinu aktivne čvrste tvari), ionsku izmjenjivačku kromatografiju (temelji se na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni), kromatografija isključenjem (razdvajanje se temelji na razlici u veličini, obliku ili naboju molekula), afinitetnu kromatografiju (razdvajanje je na temelju specifične interakcije analita i liganda) i razdjelnu kromatografiju. Razdjelnu kromatografiju možemo podijeliti na plinsku i tekuću pri čemu se kod plinske razdjelne kromatografije separacija temelji na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske razdjelne kromatografije na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi (Cerjan-Stefanović i sur., 1999). Kromatografska analiza se sastoji od četiri osnovna koraka: injektiranje analita u mobilnu fazu, odvajanje analita u koloni (na temelju različite raspodjele

između stacionarne i mobilne faze), eluiranje iz kolone dodatkom novih količina otapala te identifikacija eluiranih komponenti. Pri eluiranju se uzima nepolarna mobilna faza ukoliko je stacionarna polarna i obrnuto, različiti spojevi eluiraju se u različitim vremenima, a na temelju mjerenja nekog fizikalnog svojstva vrši se identifikacija eluiranih spojeva (Douglas i sur., 2007).

2.3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili HPLC je vrsta kromatografije kromatografije korištena za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih spojeva. Princip rada temelji se na prolasku mobilne faze prolazi kroz zatvorenu kolonu ispunjenu finim punjenjem djelovanjem visokih tlakova pumpe (Malviya, 2010). Mobilna faza kod HPLC je otapalo koje nosi uzorak kroz kolonu, dok stacionarnu fazu čine čestice manjeg promjera vrlo finih zrna. Razdvajanje se temelji na međudjelovanju punjenja kolone i pokretne faze. Kod HPLC normalnih faza mobilna faza je nepolarna, a stacionarna faza polarna, dok je kod HPLC obrnutih faza mobilna faza polarna, a stacionarna faza nepolarna (Skoog, 1999). HPLC uređaj se sastoji od kolone sa stacionarnom fazom, pumpe koja pokreće mobilnu fazu niz kolonu te detektor koji pokazuje retencijsko vrijeme molekula uzorka (Malviya, 2010). Prolaskom mobilne faze kroz kolonu, narušava se ravnoteža, sastojci unutar uzorka imaju različite ravnotežne podjele između faza, pri čemu svaki sastojak ostvaruje različito retencijsko vrijeme, odnosno vrijeme prolaska analita kroz cijelu kolonu (Malviya, 2010). Rezultat kromatografskih metoda je kromatogram tj. dijagram koji na apscisi prikazuje vrijeme ili volumen mobilne faze, a na ordinati signal detektora. Na kromatogramu su vidljivi tzv. pikovi, a površina ili visina dobivenog pika proporcionalna je koncentraciji određenog spoja (Poole, 2003). Za identifikaciju sastojaka važno je retencijsko vrijeme tj. vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do pojave pika na kromatogramu. Usporedbom retencijskog vremena standarda i analita provodi se identifikacija spoja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

Za istraživanje korišteni su uzorci algi *Fucus virsoides*, *Cystoseira barbata*, *Ulva lactuca*, *Sargassum Hornschuchii*, *Corallina elengata*, *Dasycladus vermicularis*, *Halopteris scoparia* i uzorak spužve *Chondrosia reniformis* izronjenih u Jadranskom moru u okolici Zadra. U tablici 1 prikazani su analizirani uzorci kao i vrijeme probira u Jadranskom moru, a smeđe alge *Fucus virsoides* (uzorci 1, 2, 3, 4) i *Cystoseira barbata* (5, 6, 7) izronjene su kroz različito vrijeme. Nakon izrona uzorci su tri puta oprani vodovodnom vodom, a zatim destiliranom vodom nakon čega su zamrznuti pri $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ te liofilizirani i usitnjeni u prah. Do provođenja analiza uzorci su pohranjeni u Falcon epruветama u hladnjak pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tablica 1. Uzorci algi i spužve izronjenih u Jadranskom moru

uzorak	Uzorci	Vrijeme probira
1.	<i>Fucus virsoides</i>	11. 12. 2018.
2.	<i>Fucus virsoides</i>	22. 05. 2019.
3.	<i>Fucus virsoides</i>	16. 10. 2019.
4.	<i>Fucus virsoides</i>	18. 02. 2020.
5.	<i>Cystoseira barbata</i>	23. 05. 2019.
6.	<i>Cystoseira barbata</i>	20. 02. 2020.
7.	<i>Cystoseira barbata</i>	19. 10. 2020.
8.	<i>Ulva lactuca</i>	22. 05. 2019.
9.	<i>Chondrosia reniformis</i>	10. 7. 2019.
10.	<i>Sargassum Hornschuchii</i>	1. 12. 2021.
11.	<i>Corallina elongata</i>	24. 11. 2021.
12.	<i>Dasycladus vermicularis</i>	15. 02. 2022.
13.	<i>Halopteris scoparia</i>	30. 12. 2021.

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda (MilliQ-Plus, Millipore, Njemačka)
- Etanol (96 %, Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Mravlja kiselina (Lach-Ner, Prag, Češka)
- Acetonitril (Lach-Ner, Prag, Češka)
- Metanol (Fisher Chemicals, Merelbeke, Belgija)
- Metil tert-butil eter (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Destilirana voda
- 140 mM otopina kalijeva persulfata ($K_2S_2O_8$),
- 7 mM otopina ABTS⁺,
- 96 %-tni etanol (v/v)
- metanol,
- 0,5 mM otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal, DPPH (0,02 g DPPH) otopi se u odmjernoj tikvici od 100 mL s metanolom i nadopuni do oznake)

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura

- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- Tehnička vaga (točnost $\pm 0,01$ g) (Kern & Sohn, Njemačka)
- Analitička vaga (točnost $\pm 0,0001$ g) (Sartorius AG, Njemačka)
- Mikrovalni ekstraktor (Ethos Easy, Milestone Srl, Italija)
- Centrifuga (Hermle Z 206A, Njemačka)
- Vortex miješalica (Velp Scientifica, Italija)
- Spektrofotometar (UV-VIS UviLine 9400, Secomam, Francuska)
- CLARIOstar fluorospektrometar (BMG LabTech, Offenburg, Njemačka)
- Magnetska miješalica (Velp Scientifica, Italija)
- pH-metar (inoLab pH 7110, Njemačka)
- HPLC uređaj (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- UV-VIS/DAD detektor (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)
- HPLC uređaj (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- UV-VIS/DAD detektor (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

Pribor

- Falcon kivete (14 i 50 mL)
- Plastična žličica
- Laboratorijske čaše (150, 300, 600, 1000 i 2000 mL)
- Filter papir
- Stakleni lijevak
- Odmjerne tikvice (50, 100, 250, 500 i 1000 mL)
- Menzura (1000 mL)
- Automatske mikropipete (10-100 i 100-1000 μ L)
- Pipeta (10 mL)
- Propipeta
- Stakleni štapić
- Staklene epruvete
- Stalac za epruvete
- Kiveta
- Magneti
- Eppendorf epruvete (2,0 mL)
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Vijale (1,5 mL)
- 0,45 μ m filter Chromafil Xtra Pet (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka)
- Medicinska šprica i igla

3.2. METODE

3.2.1. MAE

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva provedena je primjenom MAE, a uvjeti ekstrakcije bili su 25 °C, 25 min i 300 W. Ekstrakcija je provedena uz miješanje magnetnim mješačem, snaga miješanja bila postavljena na 75 %, vrijeme zagrijavanja do željene temperature na 5 min, hlađenje nakon ekstrakcije na 2 min, dok se temperatura procesa održavala konstantnom. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju je prikazan na slici 4.

Postupak rada:

U epruvetu se odvaži $1 \pm 0,01$ g liofiliziranog uzorka algi i doda se 25 mL 96 %-tnog etanola. Uzorci se ekstrahiraju u mikrovalnom reaktoru pri navedenim uvjetima, a nakon ekstrakcije slijedi filtracija (Whatman filter papir) u odmjerne tikvice od 25 mL koje se do oznake nadopune

otapalom. Pripremljeni ekstrakti se skladište pri + 4 °C do daljnje analize.



Slika 4. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (vlastita fotografija)

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode

Koncentracija ukupnih fenola određena je primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa i polifenola pri čemu dolazi do nastanka plavo obojenog kompleksa. Jači intenzitet obojenja javlja se pri većem udjelu fenolnih spojeva, a mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja ukupnih fenola

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

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i

potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri 50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

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

$$Y = 0,0029 X \qquad R^2 = 0,9992 \qquad [2]$$

Gdje je:

Y = apsorbancija pri 765 nm

X = koncentracija galne kiseline (mg/L)

R² = koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg ekvivalentata galne kiseline (GAE)/100 g suhe tvari (mg GAE/100 g s.tv.) kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.3. Određivanje pigmenata primjenom HPLC-UV VIS/DAD metode

3.2.3.1. Kromatografska analiza

Određivanje pojedinačnih karotenoida (fukoksantina, β -karotena, diadinoksantina, luteina i neoksantina i njegovih derivata) i klorofila (klorofil *a* i *b* i njihovih derivata) u ekstraktima algi i spužve provedeno je prema metodi koju su prethodno opisali Castro-Puyana i sur. (2016) primjenom HPLC. Za izvođenje metode korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 Infinity sistem (Agilent Technologies, SAD) koji je opremljen s DAD detektorom. Određivanje je provedeno prema kromatografskim uvjetima prikazanim u tablicama 2 i 3. Identifikacija karotenoida i klorofila provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (*t*_R) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom karakterističnih

UV/VIS spektara. Određivanje karakterističnih UV/VIS spektara provedeno je skeniranjem spektra u području valnih duljina od 240 do 770 nm. Identifikacija karotenoida provedena je pri 450 nm, a klorofila pri 660 nm. Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih karotenoidnih i klorofilnih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva (tablica 4). Spojevi iz skupine karotenoida izraženi su kao ekvivalent luteina, dok su derivati klorofila *a* izraženi kao ekvivalent klorofila *a*, a derivati klorofila *b* kao ekvivalent klorofila *b*. Masene koncentracije analiziranih spojeva prikazane su kao mg/100 g suhe tvari uzorka.

Tablica 2. Prikaz kromatografskih uvjeta za HPLC-UV/PDA analizu karotenoida (prema Castro-Puyana i sur., 2016)

Kolona:	Develosil 3u RP-Aqueous C30 140A, 5 µm (250 × 4,6 mm I.D.)
Pokretna faza:	otapalo A : smjesa metanol (MeOH):metil terc-butil eter (MTBE):voda (90:7:3, v/v/v)
	otapalo B : smjesa MeOH:MTBE (10:90, v/v)
Detektor:	UV/VIS PDA
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 3.
Injektirani volumen:	10 µL
Detekcija valne duljine:	450 i 660 nm
• Za DAD detektor	240-770 nm

Tablica 3. Gradijent elucije za HPLC-UV/PDA analizu karotenoida (prema Castro-Puyana i sur., 2016)

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

Tablica 4. Baždarne jednadžbe standardnih spojeva

Spoj	Baždarna krivulja	R ²
Lutein	y= 43,069 x	0,99
β-karoten	y= 374,11 x	0,99
Klorofil a	y= 35,932 x	0,97
Klorofil b	y= 13,326 x	0,98

3.2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost određivana je u ekstraktima uzoraka algi dobivenim ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima primjenom trima metodama ABTS (Radikal kation 2,2',-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda.

3.2.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

Princip metode

Antioksidacijska aktivnost u ispitivanim uzorcima određena je prema metodi koja se temelji na sposobnosti molekula antioksidanata da uhvati ABTS, plavo zeleni kromofor sa karakterističnom apsorbcijom na 734 nm, čime reducira ABTS i uzokuje njegovo obezbojenje (Miller i Rice-Evans, 1997).

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 μL $K_2S_2O_8$ otopine prenese se 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:

1.) Na dan provođenja analiza, priprema se 1 %-tna otopina $ABTS^{*+}$;

100 μL $ABTS^{*+}$ otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 10 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:

40 μL 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 mmol Trolox ekvivalenta (TE)/ 100g uzorka.

Izrada baždarnog pravca: Baždarni pravac se izrađuje s razrijeđenim otopinama Troloxa poznate koncentracije: 0; 0,4; 0,8; 1; 1,2; 1,6 i 2 mM. Od otopina tih koncentracija otpipetira se 40 μL svake i 4 mL 1 % otopine ABTS. Kod slijepa probe umjesto Troloxa otpipetira se 40 μL etanola. Oduzimanjem apsorbancije pri 734 nm uzorka od apsorbancije slijepa probe dobije se vrijednost ΔA .

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,2679 X + 0,0081 \quad R^2 = 0,9989 \quad [3]$$

gdje je:

Y = izmjerene vrijednosti apsorbancije

X = ekvivalent Trolox-a (mmol/L)

Rezultati su izraženi u μmol TE/100 g s.tv.

3.2.4.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH• metodom

Princip metode

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata određena je u reakciji sa slobodnim radikalom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH•) (Brand-Williams i sur., 1995). Metoda se temelji na redukciji stabilnog DPPH u prisustvu antioksidanta pri čemu dolazi do promjene ljubičaste boje u žutu, a apsorbancija se mjeri na 517 nm.

Postupak određivanja:

Prije početka određivanja antioksidacijske aktivnosti potrebno je pripremiti 0,5 mM otopinu DPPH na način da se 0,02 g DPPH otopi u metanolu u odmjerne tikvici od 100 mL, a zatim nadopuni metanolom do oznake. U staklenu epruvetu se otpipetira 1 mL ekstrakta, 1 mL metanola, 0,5 mL 0,5 mM otopine DPPH, promućka te se ostave stajati 20 min pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 20 min mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, no osim 1 mL ekstrakta, dodaje se 1 mL metanola.

Izrada baždarnog pravca: Baždarni pravac se izrađuje s razrijeđenim otopinama Troloxa poznate koncentracije: 0, 25, 50, 100, 200 i 300 μM i na temelju izmjerenih apsorbancija pri 517 nm se dobije jednadžba pravca.

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,0014 X + 1,0164 \quad R^2 = 1 \quad [4]$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent Troloxa (μM)

Rezultati su izraženi u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$

3.2.4.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom

Princip metode

ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda je standardizirana metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti. Pripada skupini HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*)

metoda baziranih na prijenosu atoma vodika, a mjeri inhibiciju peroksil radikala koji nastaje pri raspadu azo-spoja, 2,2'-azobis (2-amidinopropionamid)-dihidroklorid (AAPH). Reakcija se provodi pri 37 °C i primjer je antioksidacijske aktivnosti sprječavanja lančanih reakcija radikala (Prior, 2015).

Postupak rada

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka fosfatnim puferom (75 mM, pH=7,5). U jažice mikrotitarske pločice se otpipetira 150 µL otopine fluoresceina i 25 µL uzorka (75 mM fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda Troloxa za izradu baždarnog pravca). Pločica s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča (30 minuta pri 37 °C) prije početka mjerenja i nakon se toga mjeri fluorescencija (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) svakih 90 s kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon tri ciklusa, 25 µL svježe pripremljenog 240 mM AAPH se softverski injektira uz pomoć unutarnjeg ubrizgivača, a mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 min. Trolox služi kao standard za izradu baždarnog pravca preko kojeg se izražavaju ORAC vrijednost analiziranih uzoraka. Za analizu podataka koristi se MARS softver (MARS 2.0 software, BMG Labtech, Offenburg, Njemačka) koji omogućuje automatsku evaluaciju. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost dvaju mjerenja iskazanih sa standardnom devijacijom, a ORAC vrijednosti se prikazuju kao µmol TE/L odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao µmol TE/100 g s.tv.

3.3. OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se utvrdilo postoji li statistička razlika između svih uzoraka. Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a sve srednje vrijednosti rezultata uspoređene su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj MAE na izolaciju fenolnih spojeva i pigmentata iz liofiliziranih uzoraka odabranih morskih organizama odnosno pet smeđih algi (*Fucus virsoides*, *Cystoseira barbata*, *Sargassum Hornschuchii* i *Halopteris scoparia*), dvije zelene alge (*Ulva lactuca* i *Dasycladus vermicularis*), jedna crvena alga (*Corallina elongata*) i spužve *Chondrosia reniformis* (tablica 1). Smeđe alge *F. virsoides* (uzorci 1, 2, 3, 4) i *C. barbata* (5, 6, 7) izronjene su kroz različito vrijeme kako bi se ispitaio utjecaj vremena probira na fenolne spojeve i pigmente te napravila usporedba sa drugim vrstama algi i spužvom Jadranskog mora. Ukupni fenolni spojevi u ekstraktima su određeni spektrofotometrijski, a primjenom HPLC-UV-VIS/DAD metode identificirani su i kvantificirani pigmenti karotenoidi i klorofili. Maseni udjeli ukupnih fenolnih spojeva prikazani su u tablici 5 i izraženi kao mg GAE/100 g s.tv., pojedinačni i ukupni karotenoidi i korofili prikazani su u tablicama 6 i 8 i izraženi su kao mg/100 g s.tv. uzorka. U dobivenim ekstraktima je također određena antioksidacijska aktivnost primjenom ABTS, DPPH i ORAC metoda te su rezultati izraženi kao $\mu\text{mol TE}/100\text{ g s.tv. uzorka}$ (tablica 10). 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 10.0, a rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

4.1. MASENI UDIO UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA ALGI I SPUŽVE DOBIVENIM PRIMJENOM MAE

U tablici 5 prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela ukupnih fenola analiziranih uzoraka.

Tablica 5. Maseni udjeli ukupnih fenola (mg GAE/100 g s.tv.) izoliranih iz analiziranih uzoraka algi primjenom MAE

uzorak	Morski organizmi	Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv.)
1.	<i>Fucus virsoides</i>	956,90 ± 8,60 ^h
2.	<i>Fucus virsoides</i>	2606,60 ± 4,05 ⁱ
3.	<i>Fucus virsoides</i>	714,80 ± 0,43 ^g
4.	<i>Fucus virsoides</i>	150,90 ± 0,42 ^d
5.	<i>Cystoseira barbata</i>	348,60 ± 0,42 ^d
6.	<i>Cystoseira barbata</i>	609,00 ± 0,43 ^f
7.	<i>Cystoseira barbata</i>	3607,80 ± 4,35 ^j
8.	<i>Ulva lactuca</i>	67,70 ± 0,43 ^b
9.	<i>Chondrosia reniformis</i>	34,60 ± 0,43 ^a
10.	<i>Sargassum Hornschuchii</i>	712,50 ± 0,43 ^g
11.	<i>Corallina elongata</i>	39,20 ± 0,44 ^a
12.	<i>Dasycladus vermicularis</i>	74,70 ± 0,43 ^b
13.	<i>Halopteris scoparia</i>	188,20 ± 0,43 ^d

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Spektrofotometrijskim određivanjem ukupni fenoli su određeni u analiziranim uzorcima algi u rasponu od 39,2 (*C. elongata*) do 3607,8 mg GAE/100 g s.tv. (*C. barbata*), dok spužva *C. reniformis* (uzorak 9) ima najmanju količinu ukupnih fenola od 34,6 mg GAE/100 g s.tv. (tablica 5). Veći udio fenola u padajućem nizu također imaju uzorci 2, 1, 3 i 10. Uzorci 2, 5 i 8 uzorkovani su u svibnju 2019. god. te je najveći maseni udio fenola određen u uzorku 2 alge *F. virsoides*, a u padajućem nizu slijede uzorak 5 *C. barbata* te uzorak 8 *U. lactuca*.

Rezultati statističke analize utjecaja vremena probira i vrste algi na maseni udio fenolnih spojeva prikazani su u tablici 6. Statistička analiza je pokazala da postoji statistička razlika između uzoraka. U uzorku 2 alge *F. virsoides* uzorkovanom u svibnju određen je najveći maseni udio ukupnih fenola u odnosu na vrijeme probira u veljači, listopadu i prosincu. U uzorcima algi 10 i 13 koji su izronjeni na istom staništu i u isto vrijeme u prosincu 2021. god utvrđene su velike varijacije masenog udjela fenola. Velike varijacije udjela ukupnih fenola kod različitih vrsta algi s istog staništa izronjenih u isto vrijeme sugeriraju veći genetički utjecaj (vrsta alge) na sintezu polifenolnih spojeva od okolišnih uvjeta. U radu Aminina i sur. (2020) gdje je istraživana sastav fenola smeđih algi *Agarum*, *Thalassiophyllum*, *Fucus* i *Cystoseira* utvrđeno je da je sastav polifenolnih spojeva uglavnom određen specifičnošću vrste i pripadnošću rodu. Prema dobivenim rezultatima ukupni fenoli se statistički razlikuju ($p \leq 0,05$) kod algi *Fucus virsoides* i *C. barbata* koje su analizirane kroz različita godišnja doba. Maseni udio fenola tijekom godine u algama varira pa možemo zaključiti da udio fenola u algama ovisi o vremenu izrona odnosno o godišnjem dobu. Dva uzorka *F. virsoides* koja su analizirana u isto godišnje doba (jesen) u razmaku od godine dana, također se statistički razlikuju ($p \leq 0,05$), vjerojatno zbog sezonskih utjecaja odnosno zbog utjecaja okolišnih i vremenskih uvjeta na sintezu fenolnih spojeva. Uzorci 10, *S. Hornschuchii* i 13, *H. scoparia* izronjeni u prosincu 2021. god. imaju sličan udio ukupnih fenola kao i uzorci 3 i 4 alge *F. virsoides* koje su izronjene na jesen 2019. god. odnosno u zimu 2020. god. Od navedenih uzoraka smeđih algi različitih vrsta, ne postoji statistički značajna razlika u udjelu ukupnih fenola bez obzira na vrijeme probira odnosno na različito godišnje doba izrona. Također nema statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) u udjelu ukupnih fenola zelenih algi *U. lactuca* (uzorak 8) i *D. vermicularis* (uzorak 12) izronjenih u svibnju 2019. god., odnosno u veljači 2022. god. Vjerojatno male promjene okolišnih uvjeta unutar godišnjih doba su od velikog značaja za sintezu fenola kod algi, no istraživanje u tom smjeru bi trebalo uključivati veći broj uzoraka algi iste vrste. U radu Fella i sur. (2017) proučavan je udio fenola kod tri vrste algi ovisno o godišnjem dobu te je primijećeno da je udio fenola unutar iste vrste alge povezan sa promjenom godišnjeg doba, odnosno da produkcija antioksidansa alge ovisi o biotičkim i abiotičkim faktorima. Nadalje, u istom radu, kod vrsta *S. coronopifolius* i *H. scoparia* značajni udjeli fenola detektirani su u jesen, a kod *H. scoparia* fenolni udio je iznosio 105,40 mg GAE/100g, što je niže nego u ovom radu. U radu Abkener (2022) istraživana je utjecaj godišnjih doba na svojstva i antioksidativnu aktivnost *U. lactuca* te su objavljeni preliminarni rezultati. Uzorci su uzeti s tri različite lokacije na području sjeverne obale Omanskog mora u razdoblju prije monsuna (proljeće) i nakon monsuna (jesen). Između tri različite lokacije Tang,

Chababar i Gowatr nisu pronađene značajne promjene u udjelu fenola *U. lactuca* prije i nakon monsuna ($p \leq 0,05$). Uzorci prije monsuna bili su u rasponu od 214 do 413 mg GAE/100 g s. tv. dok su uzorci nakon monsuna bili u rasponu od 215 do 495 mg GAE/100 g s.tv. U oba slučaja, raspon masenog udjela fenola *U. lactuca* je viši nego u ovom radu (tablica 5), što ukazuje na veći utjecaj pripadnosti vrsti od okolišnih uvjeta. U radu Grozdanić i sur. (2019) istraživan je utjecaj godišnjih doba na biološku aktivnost i udio fenola alge *F. virsoides*. Ljetne frakcije imale su niži udio fenola u usporedbi s jesenskim frakcijama, u rasponu 700 mg GAE/100 g s.tv. do 5357 mg GAE/100 g s.tv., što je više nego u ovom radu (tablica 5). I u našem istraživanju uzorci algi izronjeni u jesen također su imali viši udio ukupnih fenola od uzoraka alge izronjenih u zimu. U radu Güner i sur. (2019) kod smeđe alge *H. scoparia* L. Sauvageau u metanolnom ekstraktu ukupni fenoli iznosili su 3320 mg GAE/100 g s.tv., što je više nego u ovom radu.

4.2. MASENI UDIO KAROTENOIDA U EKSTRAKTIMA ALGI I SPUŽVE DOBIVENIM PRIMJENOM MIKROVALNE EKSTRAKCIJE

Ukupni karotenoidi analiziranih uzoraka bili su u rasponu od 13,83 mg/100 g s.tv. (*C. elongata*) do 770, 95 mg/100 g s.tv. (*S. Hornschuchii*) (tablica 6). U uzorcima alge *F. virsoides* ukupni karotenoidi bili su u rasponu od 24,87 (uzorak 4) do 216,43 mg/100 g s.tv. uzorka (uzorak 1). Najmanji udio ukupnih fenola određen je u uzorcima *F. virsoides* izronjenim u zimskom periodu (u veljači 2020. god), a najveći u uzorcima izronjenim u jesenskom periodu (u prosincu 2018. god. odnosno listopadu 2019. god.). Alga *F. virsoides* od ukupnih karotenoida u najvećem udjelu sadrži derivat 1 lutein, zatim u padajućem nizu derivate 3 i 2 neoksantina, lutein te β -karoten. Veći udio luteina, derivata 1 luteina, derivata 3 neoksantina te β -karotena imaju uzorci izronjeni u jesen. U uzorku *F. virsoides* izronjen u zimu određen je samo derivat luteina, a u uzorku 3 osim derivata luteina određeni su i derivat 3 neoksantina, lutein i derivat 2 neoksantina, fukoksantin te β -karoten u značajno nižem udjelu.

Tablica 6. Maseni udjeli karotenoida (mg/100 g s.tv.) u analiziranim ekstraktima algi određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

Uz.	Fukoksantin	der 1 lutein	der 1 neoksantin	der 2 neoksantin	der 3 neoksantin	diadinoksa ntin	lutein	β karoten	UK
1.	nd	154,2 \pm 1,9	nd	10,0 \pm 0,5	38,6 \pm 0,5	nd	12,8 \pm 0,9	0,8 \pm 0,0	216,4
2.	nd	100,3 \pm 1,7	nd	10,8 \pm 0,0	25,6 \pm 0,3	nd	nd	0,7 \pm 0,0	137,2
3.	8,2 \pm 0,5	147,3 \pm 1,8	nd	12,4 \pm 0,6	34,0 \pm 0,5	nd	12,7 \pm 0,9	0,8 \pm 0,0	215,4
4.	nd	24,9 \pm 0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	24,9
5.	7,9 \pm 0,4	29,1 \pm 0,2	nd	nd	5,8 \pm 0,1	nd	nd	nd	42,8
6.	6,6 \pm 0,2	63,8 \pm 0,5	nd	nd	13,7 \pm 0,8	nd	nd	nd	84,1
7.	nd	44,0 \pm 0,2	nd	nd	7,0 \pm 0,5	nd	nd	nd	51,1
8.	nd	29,6 \pm 0,1	9,40	12,7 \pm 0,5	5,5 \pm 0,2	nd	85,8 \pm 0,9	nd	143,0
9.	nd	25,2 \pm 0,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	25,2
10.	nd	228,7 \pm 2,8	nd	9,0 \pm 0,4	45,2 \pm 0,9	nd	nd	0,7 \pm 0,0	283,7
11.	nd	nd	nd	nd	nd	13,4 \pm 0,8	nd	0,4 \pm 0,0	13,8
12.	nd	25,9 \pm 0,5	11,5 \pm 0,2	9,3 \pm 0,3	5,5 \pm 0,3	7,4 \pm 0,4	82,9 \pm 0,8	0,9 \pm 0,1	143,5
13.	241,7 \pm 3,5	143,8 \pm 2,8	94,2 \pm 1,6	170,7 \pm 1,8	31,2 \pm 0,9	36,6 \pm 1,1	49,9 \pm 1,5	2,9 \pm 0,1	770,9

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost \pm standardna devijacija; nd- neidentificiran spoj; der-derivat

Statistička analiza je pokazala da kod *F. virsoides* uzoraka 1 i 3, oba izronjena u jesen, nema statistički značajne razlike u udjelu ukupnih karotenoida ($p \leq 0,05$) (tablica 7), što može ukazivati da sinteza karotenoida kod alge *F. virsoides* ovisi o vremenu izrona. Kod alge *C. barbata* ukupni karotenoidi bili su u rasponu od 42,82 do 84,09 mg/100 g s.tv. Najmanji udio ukupnih karotenoida određen je u uzorku 5 izronjenom u proljeće (u svibnju 2019. god.), a najveći udio ukupnih karotenoida sadrži uzorak 6 izronjen u zimu (u veljači 2020. god.). U oba uzorka od pojedinačnih karotenoida u najvećem udjelu je određen derivat 1 luteina. Kod analiziranih uzoraka *C. barbata* statistički je značajna razlika u udjelima ukupnih karotenoida ($p \leq 0,05$) (tablica 7). Rezultati ukazuju da sinteza karotenoida kod alge *C. barbata* ovisi o vremenu izrona. U radu Jujnović (2019) gdje se izolacija pigmenta iz alge *Cystoseira sp.* provodila primjenom različitih tehnika ekstrakcije, prosječna vrijednost karotenoida u 36 uzoraka *Cystoseira sp.* iznosila je 44 mg/100 g s.tv., što je niže nego u ovom radu gdje je prosječna vrijednost karotenoida 3 uzorka iste alge iznosila 59,03 mg/100 g s.tv. U radu Matanić (2018) gdje je promatran utjecaj različitih parametara ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE) na masene udjele klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima smeđe alge *Cystoseira*, na 36 uzoraka određena je prosječna vrijednost karotenoida 54 mg/100 g s.tv., što je nešto niže nego u ovom radu. U analiziranim zelenim algama *U. lactuca* (uzorak

8) i *D. vermicularis* (uzorak 12) ukupni karotenoidi su određeni u sličnim udjelima, a od pojedinačnih karotenoida najzastupljeniji su lutein i derivat 1 luteina (tablica 6). U uzorcima nije prisutan fukoksantin, pigment koji je uglavnom karakterističan za smeđe alge, dajući im smeđu ili maslinastozelenu boju. U uzorcima zelenih algi 8 (*U. lactuca*) i 12 (*D. vermicularis*) te u uzorcima 4 (*F. virsoides*) i 9 (*C. reniformis*) (spužva), nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelu ukupnih karotenoida (tablica 7). Rezultati statističke analize karotenoida sugeriraju da sinteza karotenoida kod ove dvije zelene alge ima sličan mehanizam, budući da su alge izronjene u različito vrijeme (svibanj 2019. i veljača 2022. god.). Od pojedinačnih karotenoida, fukoksantin je detektiran u četiri uzorka, *H. scoparia*, dva uzorka *C. barbata* i jednom uzorku *F. virsoides*, u rasponu od 6,64 do 241,66 mg/100 g s.tv. Alga *H. scoparia* ima najveći udio fukoksantina dok je u ostalim uzorcima raspon udjela fukoksantina znatno niži. Kod smeđih algi *S. Hornschuchii* i *C. elongata* te spužve *C. reniformis* nije detektiran fukoksantin. U 7 od 13 analiziranih uzoraka u najnižem udjelu određen je β -karoten odnosno u rasponu od 0,40 do 2,89 mg/100 g s.tv. uzorka. Lutein je određen u 5 uzoraka u rasponu od 12,73 do 85,83 mg/100 g s.tv. Najviše luteina sadrže *U. lactuca* (uzorak 8) i *D. vermicularis* (uzorak 12), a najmanje *F. virsoides* u uzorcima 1 i 3. Derivat 1 luteina zastupljen je u svim uzorcima u značajnim udjelima, u rasponu od 24,87 do 228,69 mg/100 g s.tv. uzorka, osim u algi *C. elongata*. Najviši udio derivat 1 luteina sadrže uzorak 10, *S. Hornschuchii* i uzorci 1 i 3 alge *F. virsoides*. Diadinoksantin je detektiran u tri analizirana uzorka, u uzorku 12 (*D. vermicularis*), uzorku 11 (*C. elongata*) i u uzorku 13 (*H. scoparia*), u rasponu od 7,43 do 36,63 mg/100 g s.tv. uzorka. Derivat 3 neoksantina detektiran je u 10 od 13 uzoraka u rasponu od 5,46 do 45,24 mg/100 g s.tv. uzorka, a derivat 2 neoksantina određen je u rasponu od 9,02 do 170,74 mg/100 g s.tv., u 7 od 13 uzoraka. Derivat 1 neoksantina je detektiran u uzorcima 8 (*U. lactuca*), 12 (*C. elongata*) i 13 (*H. scoparia*) u rasponu od 9,40 do 94,17 mg/100 g s.tv. U radu Jankov (2022) gdje je proučavan utjecaj uvjeta MAE na udio ukupnih karotenoida, smeđe alge *H. scoparia* izronjene u studenom 2021. god., maseni udio ukupnih karotenoida u analiziranom ekstraktu pri optimalnim uvjetima (25 °C, 25 min i 300 W) iznosio je 309,78 mg/100 g s.tv., što je niže nego u uzorku *H. scoparia* izronjene u prosincu 2021. god. Nadalje, u spomenutom istraživanju najzastupljeniji karotenoid bio je derivat luteina (141,59 mg/100 g s.tv.), čiji udio je sličan udjelu derivata luteina u ovom istraživanju, ali je u uzorku *H. scoparia* korištenom u ovom istraživanju najzastupljeniji pigment bio fukoksantin (241,66 mg/100 g s.tv.). U radu Jankov (2022) u nižim udjelima određeni su fukoksantin (41,79 mg/100 g s.tv.), derivat 2 neoksantina (39,82 mg/100 g s.tv.), derivat 1 neoksantina (32,20 mg/100 g s.tv.), lutein (21,85 mg/100 g s.tv.), derivat 3 neoksantina (18,24

mg/100 g s.tv.), diadinoksantin (8,95 mg/100 g s.tv.) te β -karoten (5,34 mg/100 g s.tv.). U radu Manev i Petkova (2021) udio pigmenata karotenoida alge *C. barbata* izronjene na obali blizu Crnog mora bio je sličan uzorku 7, alge *C. barbata* izronjene u listopadu 2020. god. te je iznosio 51,58 mg/100 g s.tv. U ovom radu udio ukupnih karotenoida alge *C. barbata* je u rasponu od 42,82 do 84,09 mg/100 g s.tv. U radu Ozgun i sur. (2015) udio β -karotena kod alge *C. barbata* uzorkovane na mediteranskom dijelu obale Turske, iznosio 0,180 mg/100 g s.tv., dok u ovom radu β -karoten nije identificiran niti u jednom od tri uzorka *C. barbata*.

Tablica 7. Rezultati statističke analize utjecaja vremena uzorkovanja i vrste algi na maseni udio karotenoida

Uzorak	Karotenoidi ($p < 0,001$)
1.	$216,33 \pm 0,21^h$
2.	$137,06 \pm 0,21^f$
3.	$215,47 \pm 0,21^h$
4.	$24,89 \pm 0,21^b$
5.	$42,38 \pm 0,21^c$
6.	$84,10 \pm 0,21^e$
7.	$51,11 \pm 0,21^d$
8.	$143,07 \pm 0,21^g$
9.	$25,19 \pm 0,21^b$
10.	$283,10 \pm 0,21^i$
11.	$13,84 \pm 0,21^a$
12.	$143,53 \pm 0,21^g$
13.	$770,92 \pm 0,21^j$

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

4.3 MASENI UDIO KLOOROFILA U EKSTRAKTIMA ALGI I SPUŽVE DOBIVENIM PRIMJENOM MAE

U tablici 8 prikazani su rezultati HPLC-UV/VIS PDA određivanja masenih udjela pojedinačnih i ukupnih klorofila (zbroj pojedinačnih klorofila) u ekstraktima dobivenim primjenom MAE.

Tablica 8. Maseni udijeli klorofila (mg/100 g s.tv.) u analiziranim ekstraktima algi određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

UZ.	klorofil <i>b</i>	der 1 klorofil <i>b</i>	der 2 klorofil <i>b</i>	klorofil <i>a</i>	der 1 klorofil <i>a</i>	der 2 klorofil <i>a</i>
1.	nd	nd	nd	74,01±0,90	nd	11,91±0,20
2.	nd	nd	nd	47,63±0,40	nd	4,96±0,10
3.	nd	nd	nd	72,07±0,70	2,41±0,01	2,91±0,01
4.	27,96±0,40	nd	nd	4,02±0,10	nd	7,04±0,30
5.	nd	nd	nd	1,45±0,01	nd	nd
6.	nd	nd	nd	33,68±0,40	nd	nd
7.	nd	nd	nd	15,96±0,80	nd	3,22±0,01
8.	47,63±0,80	nd	nd	63,41±1,30	10,02±0,10	5,29±0,30
9.	nd	nd	nd	1,34±0,01	nd	nd
10.	nd	nd	nd	78,04±1,01	2,99±0,01	nd
11.	nd	nd	nd	16,54±0,60	nd	nd
12.	38,67±0,70	nd	nd	58,70±0,30	nd	nd
13.	197,26±1,80	16,18±0,4	10,35±0,3	58,72±0,40	9,50±0,20	nd

Rezultati su izraženi kao mg 100/g s.tv. uzorka (prosječna vrijednost ± standardna devijacija);
nd- neidentificiran spoj

Tablica 9. Rezultati statističke analize utjecaja vremena uzorkovanja i vrste algi na maseni udio klorofila

Uzorak	Klorofili ($p < 0,001$)
1.	85,87 ± 0,05 ⁱ
2.	52,57 ± 0,05 ^f
3.	77,48 ± 0,05 ^g
4.	39,06 ± 0,05 ^e
5.	1,42 ± 0,05 ^a
6.	33,66 ± 0,0 ^d
7.	19,135 ± 0,05 ^c
8.	126,34 ± 0,05 ^k
9.	1,28 ± 0,05 ^a
10.	81,07 ± 0,05 ^h
11.	16,52 ± 0,05 ^b
12.	97,32 ± 0,05 ^j
13.	291,00 ± 0,05 ^l

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Ukupni maseni udio klorofila analiziranih uzoraka bili su u rasponu od 1,34 (*C. reinformis*) do 292,01 (*H. scoparia*) mg/100 g s.tv. uzorka (tablica 8). Rezultati statističke analize su pokazali značajnu razliku ($p \leq 0,05$) u udjelima ukupnih klorofila kod analiziranih uzoraka osim u uzorcima 5 i 9 (tablica 9). Kod alge *F. virsoides* raspon ukupnih klorofila bio je od 39,02 do 85,91 mg/100 g s.tv. uzorka. Najviše udjele ukupnih klorofila sadrže uzorci 1 i 3 izronjeni u jesen, dok uzorak 4 izronjen u zimu ima najmanji udio ukupnih klorofila. Od ukupnih klorofila u uzorcima *F. virsoides* u najvećem udjelu je prisutan klorofil *a*, osim u uzorku 4 koji u većim udjelima sadrži klorofil *b*, i derivat 2 klorofila *a* te sadrži i najniži udio ukupnih klorofila. Od uzoraka *F. virsoides*, jedino je u uzorku 4 detektiran klorofil *b*. Kod uzoraka alge *C. barbata* raspon ukupnih klorofila bio je od 1,45 (uzorak 5) do 33,68 mg/100 g s.tv. uzorka (uzorak 6) odnosno najmanje u uzorcima izronjenim u proljeće, a najviše u uzorcima izronjenim u zimu. U uzorcima alge *C. barbata* detektiran je samo klorofil *a* u rasponu od 1,45 do 33,68 mg/100 g s.tv. uzorka, dok je alga *C. barbata* (uzorak 7) izronjena u jesen sadržavala i derivat 2 klorofila *a*. Maseni udjeli klorofila kod uzoraka 5, alge *C. barbata* i uzorka 9, spužve *C. reinformis* statistički se značajno ne razlikuju ($p \leq 0,05$) (tablica 9). Od pojedinačnih klorofila, klorofil *b* je detektiran u zelenim algama odnosno u uzorcima 8 (*U. lactuca*) i 12 (*D. vermicularis*) te u uzorku smeđe alge *H. scoparia* (uzorak 13), u rasponu od 38,67 do 197,26 mg/100 g s.tv. uzorka. Samo u uzorku *H. scoparia* su detektirani derivat 1 klorofila *b* i derivat 2 klorofila *b*. Klorofil *a* je detektiran u svim analiziranim uzorcima, te je u većini uzoraka najzastupljeniji klorofil u rasponu od 1,34 (*C. reinformis*) do 78,04 mg/100 g s.tv. (*S. Hornschuchii*). U radu Golub (2018) ekstrakcijom klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida iz zelene mikroalge *C. vulgaris* pri optimalnim parametrima ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (metanol kao otapalo, vrijeme ekstrakcije 15 min) klorofil *a* je određen u značajno većem udjelu (5,71 mg g⁻¹ s.tv.) u usporedbi s rezultatima našeg istraživanja. Derivat 1 klorofil *a* određen je u rasponu od 2,41 do 10,02 mg/100 g s.tv., samo u uzorcima 3, 8, 10 i 13. Derivat 2 klorofila *a* nalazi se u rasponu 2,91 do 11,91 mg/100 g s.tv. u uzorcima 1, 2, 3, 4, 7 i u uzorku 8. U radu Jankov (2022) maseni udio ukupnih klorofila u ekstraktu smeđe alge *H. scoparia* iznosio je 452,30 mg/100 g s.tv., što je znatno više nego u ovom istraživanju, a najzastupljeniji spojevi bili su klorofil *a* (223,72 mg/100 g s.tv.) i klorofil *b* (126,24 mg/100 g s.tv.). U usporedbi s rezultatima ovog istraživanja, klorofil *a* je određen u manjem, a klorofil *b* u većem masenom udjelu. Također, derivati klorofila *a* i *b* određeni su u rasponu od 2,40 do 49,23 mg/100 g s.tv., dok je u ovom radu raspon derivata klorofila *a* i klorofila *b* bio od 9,50 do 16,18 mg/100 g s.tv. U radu Ozgun i sur. (2015) udio

klorofila *a* kod smeđe alge *C. barbata* iznosio je 105,6 mg/100 g, dok je u ovom radu udio klorofila *a* kod iste alge bio značajno veći. U radu Jujnović (2019) prosječne vrijednosti klorofila *a* u 36 uzoraka algi iznosile su 99 mg/100 g s.tv., što je više nego u ovom radu, a za klorofil *b* prosječna vrijednost iznosila je 20 mg/100 g s.tv., što je niže nego u ovom radu. U radu Matanić (2018) na 36 uzoraka *Cystoseira sp.* određena je prosječna vrijednost klorofila *a* 147 mg/100 g s.tv., dok je u ovom radu na tri uzorka *C. barbata* prosječna vrijednost iznosila 17,03 mg/100 g s.tv. U ovom istraživanju u analiziranim uzorcima *C. barbata* nije izoliran klorofil *b* dok je u radu Matanić (2018) prosječna vrijednost klorofila *b* na 36 uzoraka *Cystoseira sp.* iznosila 39 mg/100 g s.t.

4.4 ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ODREĐENA PRIMJENOM ORAC, ABTS I DPPH METODE

U tablici 10 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g s.tv.}$) dobivenih ekstrakata određene primjenom ORAC, ABTS i DPPH metode.

Tablica 10. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$) određena u analiziranim ekstraktima algi primjenom ORAC, ABTS i DPPH metoda

uzorak	ORAC ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$)	DPPH ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$)
1.	172,93 \pm 9,20 ^d	5667,41 \pm 4,63 ^j	3057,86 \pm 5,89 ^h
2.	170,41 \pm 8,80 ^c	5775,11 \pm 0,46 ^k	2977,43 \pm 7,89 ^f
3.	220,57 \pm 11,10 ^e	4308,05 \pm 11,58 ^h	3050,57 \pm 12,99 ^h
4.	331,42 \pm 14,10 ⁱ	1048,73 \pm 6,95 ^e	2688,03 \pm 18,95 ^e
5.	353,80 \pm 17,24 ^j	2293,76 \pm 2,31 ^f	2987,39 \pm 18,92 ^g
6.	279,66 \pm 14,81 ^g	3821,63 \pm 2,31 ^g	3200,85 \pm 22,99 ⁱ
7.	119,33 \pm 4,23 ^a	6473,86 \pm 2,32 ^l	3191,79 \pm 20,59 ⁱ
8.	354,19 \pm 20,23 ^j	430,11 \pm 6,95 ^c	2007,86 \pm 18,49 ^d
9.	411,72 \pm 14,85 ^l	122,98 \pm 1,39 ^a	1986,21 \pm 9,79 ^c
10.	255,08 \pm 17,30 ^f	4416,02 \pm 6,95 ⁱ	3006,07 \pm 13,69 ^g
11.	307,42 \pm 16,55 ^h	96,40 \pm 4,63 ^a	1915,00 \pm 15,53 ^b
12.	380,95 \pm 21,20 ^k	361,60 \pm 2,31 ^b	3199,08 \pm 20,773 ⁱ
13.	162,33 \pm 7,74 ^b	664,47 \pm 1,85 ^d	1733,38 \pm 15,94 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Primjenom ORAC metode određena je antioksidacijska aktivnost analiziranih algi u rasponu od 119,33 do 411,72 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$ (tablica 10). Najveća antioksidacijska aktivnost prema ORAC metodi određena je u uzorku 9, spužve *C. reniformis*, a najmanja u uzorku 7, alge *C. barbata*. U radu Gentscheva i sur. (2022) gdje je istraživana udio ukupnih fenola i pigmenta te antioksidativna aktivnosti na algama Crnog mora, *E. crinita* je imala najvišu antioksidacijsku aktivnost prema ORAC metodi koji je iznosio 46330 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$, što je više od nego u ovom istraživanju. Alga *E. crinita* također je imala i najveći maseni udio fenola od svih analiziranih algi, što je vjerojatno utjecalo na veću antioksidacijsku aktivnost. Kod uzoraka algi *F. virsoides* izronjenih kroz različito vrijeme najvišu ORAC vrijednost ima uzorak 4 izronjen u zimu (331,42

μmol TE/100 g s.tv.), a najnižu uzorak 2 izronjen u proljeće (170,41 μmol TE/100 g s.tv.) dok kod alge *C. barbata* najvišu vrijednost ima uzorak 5 izronjen u proljeće (353,80 μmol TE/100 g s.tv.), a najnižu uzorak 7 izronjen na jesen (119,33 μmol TE/100 g s.tv.). Primjenom ABTS metode antioksidacijska aktivnost analiziranih algi bila je u rasponu od 96,40 do 6473,86 μmol TE/100 g s.tv. uzorka (tablica 10). Najveća antioksidacijska aktivnost prema ABTS metodi određena je u uzorku 7 (*C. barbata*), a najmanja u uzorku 11 (*C. elongata*). Kod uzoraka algi *F. virsoides* izronjenih kroz različito vrijeme najvišu ABTS vrijednost ima uzorak 2 izronjen u proljeće (5775,11 μmol TE/100 g s.tv.), a najnižu uzorak 4 izronjen u zimu (1048,73 μmol TE/100 g s.tv.), što je u suprotnosti s rezultatima dobivenim ORAC metodom. Isti trend je primjećen i kod uzoraka alge *C. barbata*. Primjenom DPPH metode određena je antioksidacijska aktivnost analiziranih algi u rasponu 1733,38 do 3200,85 μmol TE/100 g s.tv. uzorka (tablica 10) te su najveće vrijednosti određene u uzorcima 6 (*C. barbata*) i 12 (*D. vermicularis*), a najmanja u uzorku 13 odnosno u smeđoj algi *H. scoparia*. Ekstrakti algi koji pokazuju veću aktivnost hvatanja radikala DPPH dovode se u vezu s njihovom sposobnosti doniranja vodika (de Lima i sur., 2016). Kod *F. virsoides* izronjenih kroz različito vrijeme najvišu vrijednost DPPH antioksidacijske aktivnosti ima uzorak 1 (3057,86 μmol TE/100 g s.tv.) izronjen u jesen, a najnižu uzorak 4 (2688,03 μmol TE/100 g s.tv.) izronjen u zimu, iako nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tablica 11. Rezultati statističke analize utjecaja vremena uzorkovanja i vrste morskog organizma na antioksidacijsku aktivnost

UZ.	ALGA	ORAC	ABTS	DPPH
		p<0,001	p<0,001	p<0,001
1.	<i>Fucus virsoides</i>	172,72 ± 0,16 ^d	5672,05 ± 5,09 ^j	3056,96 ± 2,57 ^h
2.	<i>Fucus virsoides</i>	170,41 ± 0,16 ^c	5774,68 ± 5,09 ^k	2976,59 ± 2,57 ^f
3.	<i>Fucus virsoides</i>	220,55 ± 0,16 ^e	4319,86 ± 5,09 ^h	3051,45 ± 2,57 ^h
4.	<i>Fucus virsoides</i>	331,40 ± 0,16 ⁱ	1055,55 ± 5,09 ^e	2687,15 ± 2,57 ^e
5.	<i>Cystoseira barbata</i>	353,80 ± 0,16 ^j	2296,04 ± 5,09 ^f	2996,15 ± 2,57 ^g
6.	<i>Cystoseira barbata</i>	279,69 ± 0,16 ^g	3823,93 ± 5,09 ^g	3199,96 ± 2,57 ⁱ
7.	<i>Cystoseira barbata</i>	119,42 ± 0,16 ^a	6476,18 ± 5,09 ^l	3190,89 ± 2,57 ⁱ
8.	<i>Ulva lactuca</i>	354,23 ± 0,16 ^j	437,06 ± 5,09 ^c	2006,96 ± 2,57 ^d
9.	<i>Chondrosia reniformis</i>	411,72 ± 0,16 ^l	124,36 ± 5,09 ^a	1985,33 ± 2,57 ^c
10.	<i>Sargassum Hornschuchii</i>	255,31 ± 0,16 ^f	4422,97 ± 5,09 ⁱ	3005,18 ± 2,57 ^g
11.	<i>Corallina elengata</i>	306,95 ± 0,16 ^h	101,04 ± 5,09 ^a	1914,11 ± 2,57 ^b
12.	<i>Dasycladus vermicularis</i>	381,07 ± 0,16 ^k	363,90 ± 5,09 ^b	3198,20 ± 2,57 ⁱ
13.	<i>Halopteris scoparia</i>	162,36 ± 0,16 ^b	666,31 ± 5,09 ^d	1734,26 ± 2,57 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$

Statistička analiza antioksidacijske aktivnosti prema ORAC metodi (tablica 11) pokazuje da kod uzorka 5 smeđe alge, *C. barbata* i uzorka 8 zelene alge, *U. lactuca* izronjenih u proljeće 2019. god. ne postoji značajna statistička razlika ($p \leq 0,05$), iako postoji statistički značajna razlika u udjelu ukupnih fenola i pigmenata (tablice 5, 7 i 9). Kod spužve *C. reniformis* (uzorak 9) izronjene na ljeto i crvene alge *C. elongata* (uzorak 11) izronjene na jesen ne postoji statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj ABTS metodom (tablica 11), kao ni statistički značajna razlika u udjelu fenola (tablica 5), dok je utvrđena statistički značajna razlika u udjelima karotenoida i klorofila (tablice 7 i 9). U istraživanju Aminina i sur. (2020) utvrđeno je da se antioksidacijska aktivnost povećava s porastom ukupnog udjela polifenola, što ukazuje da bi polifenoli mogli imati glavnu ulogu u antioksidativnim procesima i određivati antioksidativna svojstva ekstrakata. Međutim, vodeni ekstrakti *S. miyabei* pokazali su manju aktivnost hvatanja DPPH ($0,8 \pm 0,03$ mg askorbinske kiseline g^{-1}) i ABTS ($38,6 \pm 2,5$ μ mol ekvivalenta Trolox g^{-1}) radikala u odnosu na etanolne ekstrakte ($1,1 \pm 0,05$ mg askorbinske kiseline g^{-1} za DPPH i $68,7 \pm 2,3$ μ mol ekvivalenta Trolox g^{-1} za ABTS) iako su sadržavali više ukupnih fenola u vodenim ekstraktima od etanolnih ekstrakata. Ovo sugerira na sinergiju molekula uključenih u antioksidativne procese te da viša antioksidativna vrijednost može ukazivati na viši udio polifenola, no druge molekule prisutne u vodenim ekstraktima algi, poput pigmenata, proteina ili peptida također mogu uvelike utjecati na njihovu aktivnost hvatanja slobodnih radikala i odraziti se na konačni antioksidativni potencijal ekstrakta. U radu Dang i sur. (2017) gdje je istraživano šest vrsta smeđih algi, tri smeđe alge *H. banksii*, *S. vestitum* i *Padina sp.* imale su statistički značajno ($p < 0,05$) veći udio ukupnih fenola i ABTS, DPPH i FRAP antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s drugim analiziranim vrstama algi i kontrolnim grupama (butilirani hidroksitoluen, askorbinska kiselina i α -tokoferol u koncentracijama 0.06–1 mg/mL) odnosno utvrđena je korelacija fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti uzoraka, te je pigment fukoksantin pokazao razmjerno visoku antioksidacijsku aktivnost. Prema Koduvayur Habeebullah i sur. (2018) fukokoksantin ima veću sposobnost uklanjanja DPPH radikala od drugih karotenoida kao što su β -karoten, zeaksantin i lutein u anoksičnim uvjetima nego u aerobnim uvjetima. U ovom radu, kod *F. virsoides* fukoksantin je detektiran samo u uzorku 3 izronjenom u jesen (tablica 6), a nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelima karotenoida između uzoraka 1 i 3 (tablica 7). Kod uzoraka alge *C. barbata* izronjenih kroz različito vrijeme određene su visoke vrijednosti DPPH antioksidacijske aktivnosti (od 2987,39

do 3200,85 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g s.tv.}$), najviša u uzorku 6 izronjenom u zimu, a najniža u uzorku 5 izronjenom u proljeće. Uzorak 5 ima najveći udio fukoksantina, dok u uzorku 7 fukoksantin nije detektiran (tablica 6). Nije utvrđena statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između uzoraka 6 i 7 alge *C. barbata* te zelene alge *D. vermicularis* (uzorak 12), iako je utvrđena statistički značajna razlika u udjelu karotenoida (tablica 7) i ukupnih fenola (tablica 5). Između uzorka 5 (*C. barbata*) i uzorka 10 (*S. Hornschuchii*) također nije utvrđena statistički značajna razlika u DPPH antioksidativnoj aktivnosti. U radu Jankov (2022) u ekstraktu smeđe alge *H. scoparia* dobivenom pri optimalnim uvjetima MAE antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom je iznosila 2393,57 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g s.tv.}$ uzorka, što je značajno više nego u ovom radu. Usporedbom rezultata mjerenja različitim antioksidacijskim metodama, najmanja ABTS i DPPH antioksidacijska aktivnost određena je crvenoj algi *C. elongata* (uzorak 11), a ORAC metodom u algi *C. barbata* u uzorku 7. Najveća ORAC vrijednost određena je u spužvi (uzorak 9), ABTS vrijednost u uzorku 7, a DPPH vrijednost u uzorcima 6 i 12. Različite vrijednosti antioksidacijske aktivnosti su vjerojatno rezultat različitosti mehanizama djelovanja metoda te je zbog kompleksnosti oksidoredukcijskih reakcija koje se odvijaju poželjno koristiti nekoliko različitih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. ORAC metoda se ubraja u direktne metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti, a DPPH i ABTS metoda se ubrajaju u indirektne te se temelje na inhibiciji slobodnih radikala pomoću sintetičkih, odnosno radikalnih kationa.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i prezentiranih rezultata može se zaključiti:

1. Udio fenolnih spojeva smeđih algi *F. virsoides* i *C. barbata* varira ovisno o godišnjem dobu, odnosno ovisi o vremenu izrona, a najviši je u jesen.
2. Najviši maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorku 7 smeđe alge *C. barbata* izronjene u jesen (3607, 8 mg GAE/100 g s.tv.), a najmanji u uzorku spužve *C. reniformis* (34, 6 mg GAE/100 g s.tv.).
3. Najveći maseni udio karotenoida i klorofila određen je u uzorku smeđe alge *H. scoparia* (770, 95 mg/100 g s.tv. odnosno 292, 01 mg/100 g s.tv. uzorka), a u uzorcima *F. virsoides* i *C. barbata* udio karotenoida i klorofila bio je veći u jesen i zimu. Najzastupljeniji pojedinačni karotenoidi bili su derivati luteina i neoksantina, a od pojedinačnih klorofila najzastupljeniji je bio klorofil *a*.
4. U uzorcima različitih vrsta algi te algi izronjenih u isto vrijeme utvrđene su statistički značajne razlike u masenom udjelu fenola, karotenoida i klorofila.
5. Najveća antioksidativna aktivnost ORAC metodom određena je u uzorku spužve *C. reniformis* (411,72 μ mol Trolox/100 g s.tv.). U uzorku smeđe alge *C. barbata* izronjene u jesen određena je najmanja ORAC (119, 33 μ mol Trolox/100 g s.tv.), ali najveća ABTS antioksidacijska aktivnost (6473, 86 μ mol Trolox/100 g s.tv.) te u uzorku iste alge izronjene u zimu određena je najveća DPPH antioksidacijska aktivnost (3200, 85 μ mol Trolox/100 g s.tv.). U crvenoj algi *C. elongata* određena je najmanja DPPH antioksidacijska aktivnost (1915, 00 μ mol Trolox/100 g s.tv.).

6. LITERATURA

- Abkener AM (2022) Seasonal variation of antioxidant activity and properties in *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753: A compression study in pre and post monsoon to the northern coasts of the Oman Sea. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1657482/v1>
- Al Mamari HH (2021) Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. *IntechOpen*, str. 1-18.
- Aminina NM, Karaulova EP, Vishnevskaya TI, Yakush EV, Kim YK, i sur. (2020) Characteristics of Polyphenolic Content in Brown Algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules* **25(17)**, 3909. <https://doi.org/10.3390/molecules25173909>
- Blekić M, Režek-Jambrak A, Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology* **3(1)**, 32-47. <https://hrcak.srce.hr/file/105563>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28(1)**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Castro-Puyana M, Pérez-Sánchez A, Valdés A, Ibrahimd OHM, Suarez-Álvarez S, Ferragut JA, Micol V, Cifuentes A, Ibáñez E, García-Cañas V (2016) Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with antiproliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International* **99**, 1048-1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.021>
- Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Medić-Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S (1999) Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINUS i Sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.
- Cigler V (2019) Usporedba spektrofotometrijske metode s metodom induktivno suspregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) za određivanje cinka u sjemenjnoj plazmi (diplomski rad), Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Dang TT, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett CJ (2017) Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. *International Journal of Food Science & Technology* **53**, 174-181. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13571>
- de Lima RL, dos Santos Pires-Cavalcante KL, de Alencar DB, Viana FA, Sampaio AH, Saker-Sampaio S (2015) In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts obtained from seaweeds endemic to the coast of Ceará, Brazil. *Acta Scientiarum Technology* **38 (2)**, 247-255. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13571>
- Fellah F, Louaileche H, Dehbi-Zebboudj A, Touati N (2017) Seasonal variations in the phenolic compound content and antioxidant activities of three selected species of seaweeds from Tiskerth islet, Bejaia, Algeria. *Journal of Materials and Environmental Science* **8 (12)**, 4451-4456.
- Gentsheva G, Milkova-Tomova I, Pehlivanov I, Gugleva V, Nikolova K, Petkova N, Andonova V, Buhalova D, Pisanova E (2022) Chemical Characterization of Selected Algae and Cyanobacteria from Bulgaria as Sources of Compounds with Antioxidant Activity. *Applied Sciences* **12(19)**, 9935. <https://doi.org/10.3390/app12199935>

Golub N (2018) Usporedba različitih metoda ekstrakcije pigmenata iz alge *Chlorella vulgaris* (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Gorog S (1995) Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis, CRC Press, New York, str. 7-20.

Grozdanić N, Zdunić G Šavikin K, Đuričić I, Kosanić M, Mačić V, Matić IZ, Stanojković TP (2019) Seasonal variation in biopharmaceutical activity and fatty acid content of endemic *Fucus Virsoides* algae from Adriatic sea. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research* **76** (5) 833-844. <http://dx.doi.org/10.32383/appdr/108920>

Güner A, Nalbantsoy A, Sukatar A, Karabay YNU (2019) Apoptosis-inducing activities of *Halopteris scoparia* L. Sauvageau (Brown algae) on cancer cells and its biosafety and antioxidant properties. *Cytotechnology* **71**, 687-704. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00314-5>

Herrero M, Mendiola JA, Plaza M, Ibañez E (2010) Screening for Bioactive Compounds from Algae. U: Lee J. W. (ured.) *Advanced Biofuels and Bioproducts*, Springer Science+Business Media, New York, str. 833 – 872. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_35

Holdt SL, Kraan S (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation. *Journal of applied phycology* **23**, 543-597.

Jankov L (2022) Izolacija bioaktivnih spojeva smeđe alge *Halopteris scoparia* primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jimenez-Lopez C, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, Garcia-Oliveira P, Cassani L, Fraga M i sur. (2020) Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supportin potential health benefits. *Food Chemistry* **341**, 128262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128262>

Jujnović A (2019) Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira sp.* primjenom različitih tehnika ekstrakcije (diplomski rad), Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Kadam SU, Brijesh K, Tiwari BK, O'Donnell CP (2013) Application of novel extraction technologies for extraction of bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(20), 4667-4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>

Kılınç B, Cirik S, Turan G, Tekogul H, Koru E (2013) Seaweeds for food and industrial applications. U: Muzzalupo I (ured.) *Food Industry, InTech*, str. 735-748.

Kitada K, Machmudah S, Sasaki M, Goto M, Nakashima Y, Kumamoto S, Hasegawa T (2009) Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **84**, 657-661.

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

Kovačev A (2014) Zanimljiv svijet morskih algi <https://www.bioteka.hr/modules/zivisvijet/index.php/zivi-svijet.%C4%8Clanci.56/Zanimljiv-svijet-morskih-almi.html> Pristupljeno 4. rujna 2023.

- Malviya R, Bansal V, Pal OP, Sharma PK (2010) High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology* **2(5)**, 22-26.
- Manev ZK, Petkova NT (2021) Component composition and antioxidant potential of *Cystoseira barbata* from the Black Sea. *Agricultural Food Engineering* **14(63)** 163-169. <https://doi.org/10.31926/but.fwiafe.2021.14.63.1.15>
- Maoka T (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* **74**, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Matanić M (2018) Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira* primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Mateos R, Pérez-Correa JR, Domínguez H (2020) Bioactive Properties of Marine Phenolics. *Marine Drugs* **18(10)**, 501. [10.3390/md18100501](https://doi.org/10.3390/md18100501)
- Mendes MC, Navalho S, Ferreira A, Paulino C, Figueiredo D, Silva D i sur. (2022) Algae as Food in Europe: An Overview of Species Diversity and Their Application. *Foods* **11(13)**, 1871. <https://doi.org/10.3390/foods11131871>
- Mezzomo N, Ferreira SRS (2016) Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *Journal of Chemistry* **2016**, 3. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3164312>
- Mukherjee PK, Harwansh RK, Bahadur S, Chanda J, Biswas S, Banerjee S (2020) Enzyme inhibition assay for metabolic disorders—exploring leads from medicinal plants. U: Verma AS, Singh A, (ured.) *Animal Biotechnology* (Second Edition) Academic Press, str. 631-653. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00033-1>
- Munir N, Sharif N, Naz S, Manzoor F (2013) Algae: A potent antioxidant source. *Sky Journal of Microbiology Research* **1(3)**, 22 – 31.
- Nutautaitė M, Racevičiūtė-Stupelienė A, Bliznikas S, Jonuškienė I, Karosienė J, Koreivienė J, Vilienė V (2022) Evaluation of Phenolic Compounds and Pigments in Freshwater *Cladophora glomerata* Biomass from Various Lithuanian Rivers as a Potential Future Raw Material for Biotechnology. *Water* **14(7)** 1138. <https://doi.org/10.3390/w14071138>
- Ozgun S, Tura F, Çinar ME, Bakir K, Öztürk B, Katağan T i sur. (2015) Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of the Black Sea / Mediterranean Environment* **21(2)**, 125- 134.
- Pangestutia R, Kima SK (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* **3(4)**, 255 – 266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Pareek S, Sagar AN, Sharma S, Kumar V, Agarwal T, González-Aguilar GA (2017) Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions. U: Yahia E. M. (ured.) *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2. izd., Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd, str. 269-280.
- Poole CF (2003) *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science, Amsterdam, str 6-9.

Prior RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods* **18**, 797-810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

Prvan M, Berković B, Jakl Z, Žuljević A, Bitunjac I, Plepel I i sur. (2016) Priručnik za zaštitu mora i prepoznavanje živog svijeta Jadrana II. prošireno izdanje, Udruga za prirodu, okoliš i održivi razvoj Sunce, Split.

Ranga Rao A, Ravishankar GA (2018) Algae as Source of Functional Ingredients for Health Benefits. *Agricultural Research and Technology Open Acces Journal* **14(2)** 52-54. <http://dx.doi.org/10.19080/ARTOAJ.2018.14.555911>

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science* **2**, 152-159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)

Roberfroid MB (2000): Defining functional foods. U: Gibson G. R i Williams C. M (ured.) Functional foods Concept to product, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, str. 9-25.

Sekar S, Chandramohan M (2008) Phycobiliproteins as a commodity: trend sin applied research, patents and commercialization. *Journal of applied phycology* **20**, 113-136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>

Severović M (2020) Kromatografija kao analitička metoda za određivanje bioloških uzoraka (diplomski rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek.

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

Skoog DA, West DM, Holler FJ (1999) Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, str. 60-84.

Takaichi S (2011) Carotenoides in Algae: Distribution, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* **9(6)**, str. 1101-1118. <https://doi.org/10.3390%2Fmd9061101>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Željka Špoljar) 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