

# Biološki potencijal odabranih crvenih algi

---

**Nikolov, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:213038>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**BIOLOŠKI POTENCIJAL ODABRANIH CRVENIH ALGI**

**DIPLOMSKI RAD**

**NIKOLINA NIKOLOV**

**Matični broj: 5**

**Split, listopad 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**BIOLOŠKI POTENCIJAL ODABRANIH CRVENIH ALGI**

**DIPLOMSKI RAD**

**NIKOLINA NIKOLOV**

**Matični broj: 5**

**Split, listopad 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**BIOLOGICAL POTENTIAL OF SELECTED RED ALGAE**

**DIPLOMA THESIS**

**NIKOLINA NIKOLOV**

**Parent number: 5**

**Split, September 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско tehnološkog fakulteta održanoj 15. i 16. prosinca 2020. godine.

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

**Pomoć pri izradi:** Mag. ing. agr. Martina Čagalj, doktorand

### BIOLOŠKI POTENCIJAL ODABRANIH CRVENIH ALGI

Nikolina Nikolov, 5

**Sažetak:** Crvene alge (Rhodophyta) su široko rasprostranjena grupa jednostaničnih i višestaničnih vodenih fotoautotrofnih organizama. Odličan su izvor bioaktivnih komponenti kao što su vitamini, minerali, vlakna i polisaharidi. Upravo njihov sastav ih čini odličnim izvorom antioksidansa. U ovom radu određen je sadržaj ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom te antioksidacijski potencijal tri vrste crvenih algi (*Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* i *Peyssonnelia squamaria*) iz Jadranskog mora, korištenjem DPPH (eng. 2,2,-*Diphenyl-picrylhydrazyl assay*), FRAP (eng. *Ferric-reducing antioxidant power*) i ORAC (eng. *Oxygen radical absorbing capacity*) metoda. Dodatno, određen je i utjecaj dviju ekstrakcija, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) na ukupan broj fenola. Iz rezultata se može zaključiti da od tri ispitivane vrste alga *P. squamaria* ima najbolji antioksidacijski potencijal, a MAE se pokazala kao bolja metoda za ekstrakciju jer omogućava ekstrahiranje veće količine fenola, a time i veću antioksidacijsku aktivnost odabranih crvenih algi.

**Ključne riječi:** crvene alge, ukupni fenoli, antioksidansi, DPPH, FRAP, ORAC

**Rad sadrži:** 33 stranice, 20 slika, 64 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - član
3. Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat - član-mentor

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijско – tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study of Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6 on December 15th and 16 2020.

**Mentor:** Associate Professor Vida Šimat, Ph. D.

**Technical assistance:** PhD. Student, Martina Čagalj, MSc in Marine Fishery

### BIOLOGICAL POTENTIAL OF SELECTED RED ALGAE

Nikolina Nikolov, 5

**Abstract:** Red algae (Rhodophyta) are a widespread group of unicellular and multicellular aquatic photoautotrophic organisms. They are an excellent source of bioactive components such as vitamins, minerals, fiber and polysaccharides. It is their composition that makes them an excellent source of antioxidants. In this paper, the content of total phenols via Folin-Ciocalteu method and the antioxidant potential of three species of red algae from Adriatic (*Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* and *Peyssonnelia squamaria*) were determined using DPPH (2,2, -Diphenyl-picrylhydrazyl assay), FRAP (Ferric-reducing antioxidant power) and ORAC (Oxygen radical absorbing capacity) methods. In addition, the influence of two extractions, ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) on the total phenolics was determined. From the results it can be concluded that of the three tested algae species *P. squamaria* had the best antioxidant potential, and MAE proved to be a better method for extraction because it allows extraction of higher amounts of phenols, and thus higher antioxidant activity of selected red algae.

**Keywords:** red algae, total phenolics, antioxidants, DPPH, FRAP, ORAC

**Thesis contains:** 33 pages, 20 figures, 64 references

**Original in:** Croatian

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D. – chair person
2. Associate Professor Ivana Generalić Mekinić, Ph. D. - member
3. Associate Professor Vida Šimat, Ph. D. - supervisor

**Datum obrane:**

**Printed and in electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35

*Diplomski rad je izrađen na Zavodu za prehrambenu tehnologiju, Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Vide Šimat, u razdoblju od travnja do listopada 2021. godine.*

*Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood (ID 1467).*



## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Vidi Šimat na ukazanom povjerenju i uloženom vremenu i trudu tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i asistentici Martini Čagalj na savjetima i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj podršci kroz teške i sretne trenutke studiranja, bez njih ništa od ovog ne bi bilo moguće.*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Pripraviti ekstrakte odabranih crvenih algi: *Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* i *Peyssonnelia squamaria* primjenom metoda ultrazvučne (UAE) i mikrovalne (MAE) ekstrakcije.
- U pripremljenim ekstraktima odrediti udio ukupnih fenola i ispitati antioksidacijsku aktivnost korištenjem različitih metoda: FRAP (eng. *Ferric – reducing antioxidant power*), ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbing Capacity*) i DPPH (eng. *2,2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl assay*).
- Usporediti dobivene rezultate i zaključiti koja metoda ekstrakcije i koja vrsta alge imaju potencijal za daljnje istraživanje s obzirom na udio fenola i antioksidacijski potencijal ekstrakata.

## SAŽETAK

Crvene alge (Rhodophyta) su široko rasprostranjena grupa jednostaničnih i višestaničnih vodenih fotoautotrofnih organizama. Odličan su izvor bioaktivnih komponenti kao što su vitamini, minerali, vlakna i polisaharidi. Upravo njihov sastav ih čini odličnim izvorom antioksidansa. U ovom radu određen je sadržaj ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom te antioksidacijski potencijal tri vrste crvenih algi (*Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* i *Peyssonnelia squamaria*) iz Jadranskog mora, korištenjem DPPH (eng. 2,2,-Diphenylpicrylhydrazyl assay), FRAP (eng. Ferric-reducing antioxidant power) i ORAC (eng. Oxygen radical absorbing capacity) metoda. Dodatno, određen je i utjecaj dviju ekstrakcija, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE) i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) na ukupan broj fenola. Iz rezultata se može zaključiti da od tri ispitivane vrste alga *P. squamaria* ima najbolji antioksidacijski potencijal, a MAE se pokazala kao bolja metoda za ekstrakciju jer omogućava ekstrakciju veće količine fenola, a time i veću antioksidacijsku aktivnost odabranih crvenih algi.

**Ključne riječi:** crvene alge, ukupni fenoli, antioksidansi, DPPH, FRAP, ORAC

## **SUMMARY**

Red algae (Rhodophyta) are a widespread group of unicellular and multicellular aquatic photoautotrophic organisms. They are an excellent source of bioactive components such as vitamins, minerals, fiber and polysaccharides. It is their composition that makes them an excellent source of antioxidants. In this paper, the content of total phenols via Folin-Ciocalteu method and the antioxidant potential of three species of red algae from Adriatic (*Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* and *Peyssonnelia squamaria*) were determined using DPPH (2,2, -Diphenyl-picrylhydrazyl assay), FRAP. Ferric-reducing antioxidant power) and ORAC (Oxygen radical absorbing capacity) methods. In addition, the influence of two extractions, ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) on the total phenolics was determined. From the results it can be concluded that of the three tested algae species *P. squamaria* had the best antioxidant potential, and MAE proved to be a better method for extraction because it allows extraction of higher amounts of phenols, and thus higher antioxidant activity of selected red algae.

**Keywords:** red algae, total phenolics, antioxidants, DPPH, FRAP, ORAC

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Crvene alge.....	2
1.1.1. <i>Laurencia obtusa</i> .....	3
1.1.2. <i>Corallina officinalis</i> .....	4
1.1.3. <i>Peyssonnelia squamaria</i> .....	6
1.2. Biološki potencijal .....	6
1.2.1. Fenoli .....	9
1.3. Metode određivanja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti .....	10
1.3.1. Određivanje ukupnih fenola.....	10
1.3.2. FRAP .....	11
1.3.3. DPPH.....	12
1.3.4. ORAC .....	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
2.1. Materijali.....	15
2.2. Uređaji.....	15
2.3. Kemikalije.....	15
2.4. Priprema ekstrakata.....	16
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) .....	17
2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) .....	17
2.5. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti .....	17
2.5.1. Folin – Ciocalteau metoda .....	17
2.5.2. FRAP metoda.....	18
2.5.3. DPPH metoda .....	19
2.5.4. ORAC metoda.....	19
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola .....	21
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti .....	22
4. ZAKLJUČCI .....	26
5. LITERATURA.....	27

## UVOD

Crvene alge (Rhodophyta) su široko rasprostranjena grupa jednostaničnih i višestaničnih vodenih fotoautotrofnih organizama. Razlikujemo oko 6 000 različitih vrsta crvenih algi od kojih 98% vrsta pronalazimo u morima, a 2% u slatkim vodama. Karakteristična crvena boja rezultat je različitih fotosintetskih pigmenata klorofila i karotenoida, kao i pigmenata topivih u vodi, fitoeritrina, fitocijanina i alofitocijanina. Crvene alge služe kao proizvođači kisika za okoliš, hrana za heterotrofne organizme, ali imaju i veliku ekonomsku važnost. Diljem svijeta se koriste u različite industrijske i proizvodne svrhe, veliki značaj imaju u industriji hrane, ali i u proizvodnji hidrokoloida i agara (1).

Crvene alge su bogat izvor biološki aktivnih spojeva (fitokemikalija), koje ih između ostalog štite od oksidativnih oštećenja. Uz smeđe alge, smatraju se važnim izvorom bioaktivnih spojeva. Od osobitog značaja među fitokemikalijama koje pronalazimo u algama su fenolni spojevi, jedni od najznačajnijih sekundarnih metabolita (2).

Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidacijski potencijal i količinu ukupnih fenola odabranih crvenih algi metodama: Folin-Ciocalteu (FC), DPPH (eng. *2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl assay*), FRAP (eng. *Ferric-reducing antioxidant power*) i ORAC (eng. *Oxygen radical absorbing capacity*).

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Crvene alge

Alge su fotosintetski vodeni organizmi koje pripadaju kraljevstvu Protista. Najveći udio algi pronalazimo u moru, a smatra se da u svijetu postoji preko 25 000 vrsta algi (3).

Veličina im varira od mikroskopskih vrsta, takozvanih mikroalgi, koje nemaju korijen, talus ni cvjetove do izrazito velikih vrsta koje mogu dosegnuti visinu i do 60 m. Alge koje su vidljive okom, nazivamo makroalgama. Mikroalge su bogatije lipidima, dok kod makroalgi pronalazimo veći udio polisaharida (4).

Osim što su najveći proizvođači kisika i hrana za skoro sve morske organizme, alge imaju i veliku ekonomsku važnost u proizvodnji goriva, ali i u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (3).

Bogat su izvor nutritivnih i ljekovitih tvari, minerala, vitamina, prehrambenih vlakana, ali i proteina i aminokiselina. Fotosintetski pigmenti algi su različiti od onih koje pronalazimo kod biljaka, a njihove stanice, zbog ekstremnih uvjeta u kojima rastu i razvijaju se, imaju karakteristike različite od onih kod kopnenih biljaka (3).

Prema pigmentima koje pronalazimo u kemijskom sastavu makroalgi razlikujemo: zelene (Chlorophyta), smeđe (Phaeophyta) i crvene alge (Rhodophyta) (5).

Važnost makroalgi, kao bogatog izvora antioksidansa, sve više raste. Zbog zahtjevne okoline u kojoj rastu i izloženosti ekstremnim uvjetima te obrane od biljojeda, makroalge proizvode širok spektar biološki aktivnih metabolita koje ne možemo pronaći kod nijednog drugog organizma (6).

Crvene alge su široko rasprostranjene alge koje nastanjuju područja od Arktika do tropa (slika 1). Najveći broj vrsta živi u toplim vodama, tropskim te suptropskim područjima. Zbog svoje posebnosti, pigmenta koje sadrže, crvene alge mogu apsorbirati plavo svjetlo koje dopire do dubokih voda pa ih u nekim tropskim područjima možemo pronaći i na dubinama do 200 m (7).



**Slika 1.** Crvene alge (8)

Karakterističnu crvenu boju crvene alge duguju kombinaciji fotosintetskih pigmenata klorofila, karotenoida i fikobilisoma, svijetlo upijajućeg kompleksa sastavljenog od tri proteinska pigmenata topiva u vodi (fitoeritrina, fitocijanina, alofitocijanina (9).

Crvene alge imaju ekonomsku važnost u mnogim zemljama, posebno u Japanu, gdje je uzgoj algi iz roda *Pyropia*, za proizvodnju svjetski poznatih suhih prešanih listova tzv. *noria* i drugih proizvoda od algi, multi-milijunska industrija. Crvene alge se također koriste i u proizvodnji agara (7).

Eksperimentalni dio ovog rada temeljio se na ispitivanju tri vrste crvenih algi: *Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* i *Peyssonnelia squamaria*.

### ***1.1.1. Laurencia obtusa***

*L. obtusa* je vrsta crvene alge koja pripada porodici Rhodomelaceae, raste u umjerenim i tropskim obalnim područjima, u primorskim do sublitoralnim staništima, na dubinama do 65 m. Duljina joj nije veća od 5 cm (10).

Vrste roda *Laurencia* imaju talus koji je uspravan ili ležeći s razgranatim, kovitlastim ili radijalnim granskim rasporedom (slika 2) (11).



*L. obtusa* je hrskavična alga s izduženim, mekim bradavicama. Vrh svake bradavice je narančast i okrugao. Pod mikroskopom se može vidjeti da je vrh bradavice udubljen, a u njegovom središtu može se naći čuperak.



**Slika 2.** *Laurencia obtusa* (12)

Raste u Sredozemlju i u Atlantskom, Indijskom te Tihom oceanu. Postoji relativno veliki broj istraživanja o spojevima koje sadrži *L. obtusa* (13). Neki imaju antimikrobno djelovanje (14), dok drugi inhibiraju staničnu diobu i razvoj morskih životinja, uključujući morske ježeve. *L. obtusa* također sadrži spojeve koji su otrovni za insekte, što ukazuje na ekonomske mogućnosti za razvoj alternative pesticidima (15).

### **1.1.2. *Corallina officinalis***

*C. officinalis* vapnenačka je crvena morska alga koja raste u donjem i srednjem litoralu na stjenovitim obalama (slika 3) (16). Ime *Corallina* je izvedenica od latinske riječi *corallum*, što znači koralj (17).



**Slika 3.** *Corallina officinalis* (18)

Algu *C. officinalis* možemo prepoznati po blijedo ružičastim ili ljubičastim, kalcificiranim frondovima, visokim od 6 do 7 cm i perastim, nepravilnim granama. Talus je visok od 2 do 12 cm, uspravan i grmolik te pričvršćen na osnove (slika 4) (19).

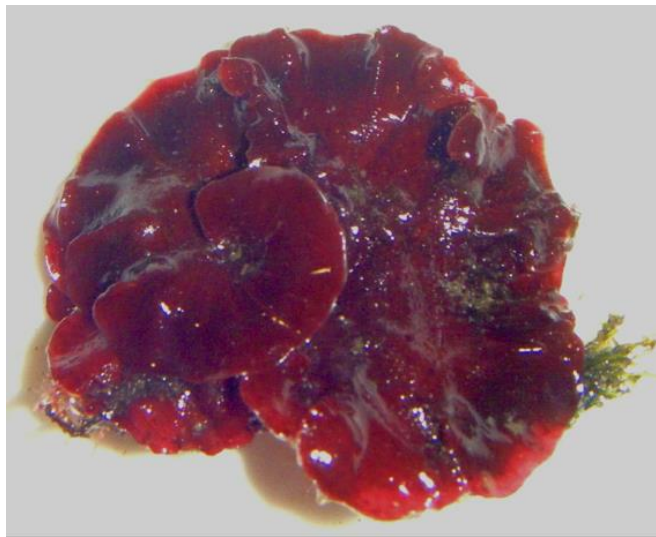
Alga *C. officinalis* se može osušiti i pretvoriti u hidroksiapatit, koji je jedna od osnovnih komponenata zuba i kostiju, stoga neka istraživanja razmatraju ovu algu kao potencijalni materijal za oblikovanje umjetnih kostiju u medicini (20). Također, koristi se u industriji boja, tekstila i kozmetičkoj industriji (17).



**Slika 4.** Uvećani segment alge *Corallina officinalis*. (21)

### 1.1.3. *Peyssonnelia squamaria*

*P. squamaria* je dobila ime po francuskom znanstveniku J. A. Peyssonnelu. Ime vrste znači "skala" te odlično opisuje izgled ove alge. Algu *P. squamaria* prepoznajemo po ravnim, okruglim i nepravilnim ljuskama, skalasto povezanima (slika 5). Površina alge je sjajna, a na površini možemo uočiti i paralelne zaobljene linije poredane u prstene. Ravne linije su zapravo višestanični rizoidi koji se razvijaju na donjoj strani alge. Oni pomažu algi da se prilijepi za podlogu (22).

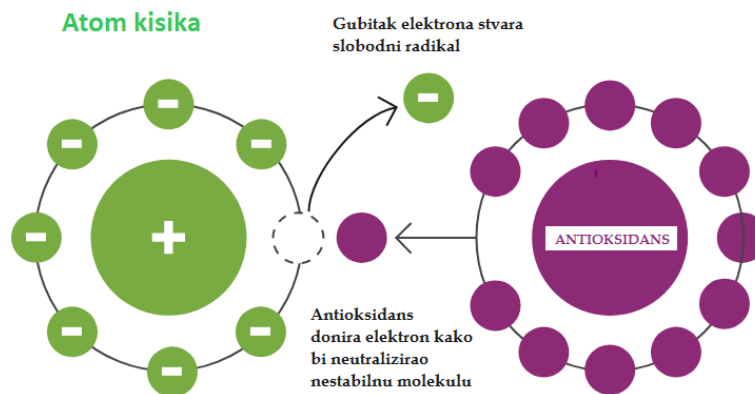


**Slika 5.** Crvena alga *Peyssonnelia squamaria* (23)

Algu *P. squamaria* najčešće pronalazimo pričvršćenu za grebene na dubini od 1 do 60 m, a može narasti do visine od 10 cm. Najčešće obitava u Atlantskom oceanu i u Mediteranu (24).

## 1.2. Biološki potencijal

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od posljedica koje potencijalno mogu uzrokovati štetne, nestabilne molekule koje nazivamo slobodnim radikalima. Iako su reakcije oksidacije nužne za održavanje života, one također mogu biti štetne za samu stanicu i organizam. Antioksidansi stoga djeluju na način da stabiliziraju slobodne radikale (slika 6) (25).



**Slika 6.** Djelovanje antioksidansa (26)

Razlikujemo:

- a) Antioksidanse koje dobivamo iz hrane – kao što su vitamin C, tokoferol i karotenoidi.
- b) Enzime koji imaju antioksidativno djelovanje – kao što je superoksid dismutaza i glutathion peroksidaza.
- c) Proteine koji vežu metale – mioglobin i feritin, koji vežu željezo, laktoferin i albumin (vežu bakar).
- d) Fitonutrijente iz različitih biljaka (27).

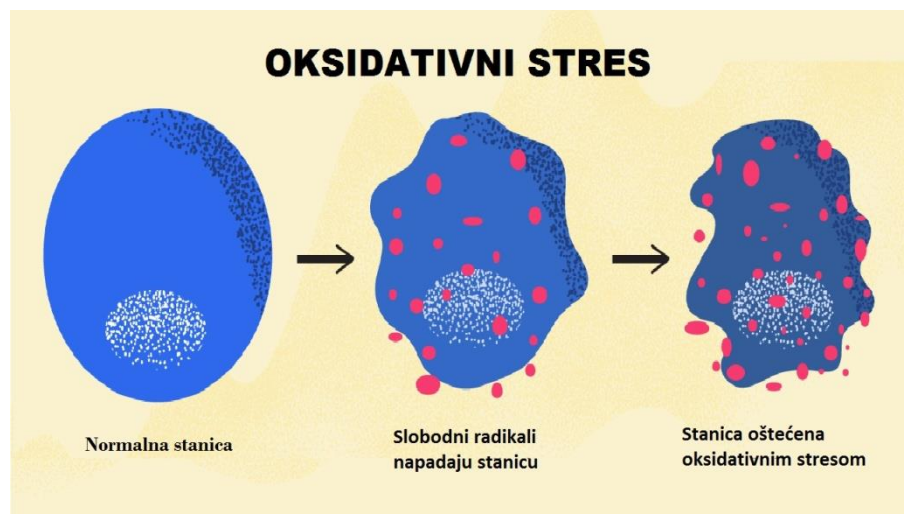
Antioksidanse najčešće dijelimo u dvije skupine, primarne ili prirodne antioksidanse i sekundarne ili sintetske antioksidanse (25). Primarni antioksidansi su prirodni spojevi koje pronalazimo u biljkama, voću i povrću, cjelovitim žitaricama i orašastim plodovima. Najpoznatiji antioksidansi prirodnog porijekla su: pigmenti (karotenoidi, antocijani), vitamini (A, C, E), minerali, fitokemikalije (fenoli, terpeni, itd.) (28).

Sekundarni ili sintetski antioksidansi su spojevi čija je uloga da zaustave lančane reakcije slobodnih radikala. Najpoznatiji sintetski antioksidansi su: butil hidroksianisol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT), propilen glikol (PG), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), tercijalni butil hidrokinon (TBQH) i nordihidroguaretična kiselina (NDGA) (25).

Slobodni radikali su vrlo nestabilne molekule koje u svojoj kemijskoj strukturi u vanjskoj ljusci imaju nesparen elektron. Ovakva struktura ih čini vrlo reaktivnima, a u reakcijama s pojedinim dijelovima (sastojcima) stanica mogu dovesti do ozbiljnih degradacija i posljedica kao što su rak, infekcije, bolesti srca i slabljenje moždanih funkcija (29).

Slobodni radikali nastaju lančanim kemijskim reakcijama koja se odvijaju u tri koraka (Slika 7):

1. Inicijacija – kovalentna veza puca, od jedne molekule nastaju dva slobodna radikala (broj slobodnih radikala je povećan),
2. Propagacija – od stvorenog slobodnog radikala dobivamo novi radikal i stabilni produkt (broj slobodnih radikala ostaje isti),
3. Terminacija – dva slobodna radikala se spajaju, nastaje slobodni neradikalni produkt (broj slobodnih radikala se smanjuje) (30).



**Slika 7.** Nastanak slobodnih radikala (31)

Slobodni radikali neprekidno traže zdrave stanice koje bi mogli napasti. Ovakvi napadi izazivaju oštećenja stanica i naposljetku samu smrt stanice. Također, slobodni radikali mogu uzrokovati nepravilnosti i poremećaje kod normalne RNA, kao i mijenjati genetski materijal DNA. Kako bi spriječili ovakav destruktivni niz događaja potrebno je neprestano obnavljati količinu antioksidansa njihovim unosom (25).

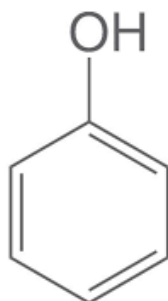
Kako bi se odredila antioksidacijska aktivnost prirodnih antioksidansa razvijeni su različiti principi i metode. U ovom radu za određivanje antioksidacijskog potencijala u tri vrste algi, korištene su DPPH, FRAP i ORAC metoda, te metoda određivanja ukupnih fenola FC reagensom.

### 1.2.1. Fenoli

Fenoli su velika skupina aktivnih spojeva, sekundarnih metabolita koji imaju širok spektar bioloških funkcija (slika 8) (32).

Fenoli kod kopnenih biljaka su vrlo dobro istraženi dok su makroalge tek posljednjih godina postale predmet istraživanja znanstvenika kao novi izvor fenola.

Zbog uvjeta u kojima žive makroalge su često izložene štetnim faktorima iz okoline, ali njihov učinak nije vidljiv što ukazuje na to da imaju sposobnost proizvodnje različitih metabolita kao što su: pigmenti, polisaharidi, vitamini, tokoferoli, fenoli i enzimi koji ih štite od vanjskih utjecaja (33).



**Slika 8.** Kemijska struktura fenola (34)

Fenolima se pripisuju mnogi pozitivni učinci na zdravlje pa su neizostavni sastojak u prehrambenoj, farmaceutskoj, medicinskoj i kozmetičkoj industriji. Njihova široka upotreba rezultat je njihovog antioksidativnog, protuupalnog, antimutagenog i antikancerogenog djelovanja. Također, poznati su kao inhibitori nekih enzima (35).

U prirodi, organizmi koriste fenole kao obrambeni mehanizam od stresa iz okoliša, kao što su jako UV zračenje, niske temperature, patogene infekcije i nedostatak

nutrijenata. Fenoli doprinose i smanjenju proizvodnje slobodnih radikala i drugih oksidativnih vrsta kod nekih organizama (36).

Danas je poznato više od 8 000 različitih fenolnih spojeva, a većina fenolnih spojeva izoliranih iz morskih izvora pronađena je u makroalgama. Struktura im varira od sasvim jednostavnih molekula do vrlo kompleksnih spojeva. Relativno visoka koncentracija fenolnih spojeva u algama doprinosi njihovim dobrim antioksidativnim svojstvima (37).

Morske alge se smatraju potencijalnim obnovljivim izvorom iz mora. Karakterizira ih fotosintetska priroda i jednostavna reprodukcija. Također su odličan izvor bioaktivnih komponenata kao što su vitamini, minerali, vlakna i polisaharidi, a upravo takav sastav ih čini odličnim izvorom antioksidansa (6).

### **1.3. Metode određivanja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti**

#### **1.3.1. Određivanje ukupnih fenola**

Fenolne spojeve možemo pronaći u gotovo svim vrstama algi, a u fenolne spadaju spojevi različite kemijske strukture, od jednostavnih kiselina do vrlo složenih struktura kao što su tanini (38).

U prehrambenoj industriji određivanje ukupnih fenola često je korištena analitička metoda (39), a često nam mjerenje ukupnih fenola daje i bitne informacije o antioksidativnom kapacitetu uzorka. Najčešće su u upotrebi spektrofotometrijske metode (40).

Najpoznatija metoda mjerenja sadržaja ukupnih fenola je Folin–Ciocalteu (FC) metoda (41).

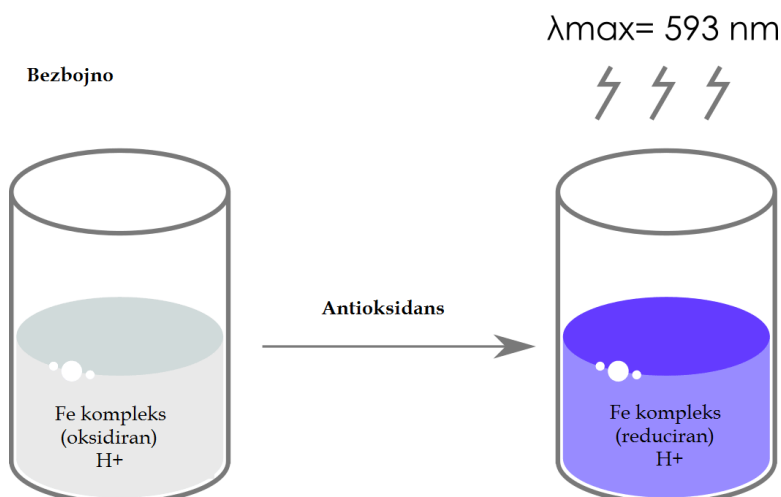
FC reagens se sastoji od dvije kiseline, fosfovolframove i fosfomolibdenske, koje se u reakciji s fenolnim spojevima reduciraju u okside obojene u plavo u lužnatom mediju (pH 10). Proporcionalno količini prisutnih fenola mijenja se intenzitet plavog obojenja. Promjenu boje pratimo na valnoj duljini 765 nm. Rezultate izražavamo kao ekvivalent galne kiseline (engl. *gallic acid equivalents*, GAE) po gramu ekstrakta, gramu suhe alge ili litri ekstrakta (42).

Najveća prednost ove metode određivanja ukupnih fenola je jednostavnost i preciznost metode, kao i njezina ponovljivost i ekonomičnost (33).

### 1.3.2. FRAP

FRAP (*eng. Ferric reducing antioxidant power*) je često korištena metoda koja kao reductante u kalorimetrijskoj, redoks vezanoj reakciji koristi antioksidanse. Kod ove metode se  $\text{Fe}^{3+}$  reducira do  $\text{Fe}^{2+}$ , pri niskom pH (3,6) čime se iz bezbojnog kompleksa stvara plavo obojeni kompleks (slika 9) (43).

Intenzitet nastale plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm, a proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (44).



**Slika 9.** Nastajanje plavo obojenog kompleksa tokom redukcije  $\text{Fe}^{2+}$  iona (45)

Reakcija se može dogoditi s antioksidansom koji ima redoks potencijal manji od 0,7 V, a apsorbancija se može mjeriti testom koji mjeri količinu reduciranog željeza i povezati s količinom antioksidansa. Standardni antioksidansi koji se koriste kod ove metode su askorbinska kiselina, otopina željezovog sulfata ili Trolox, dok se kao standardna otopina u većini slučajeva koristi otopina željezovog sulfata (46).

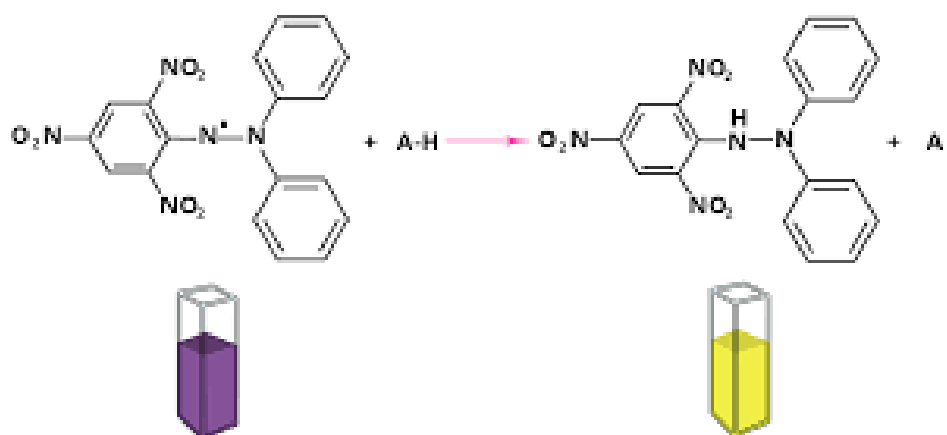
Ova metoda je brz, jednostavan i ekonomičan način mjerenja antioksidacijske sposobnosti bioloških uzoraka. Nedostatak FRAP metode je to što će svaka tvar, bez obzira na njenu antioksidacijsku sposobnost, koja ima niži redoks potencijal od



potencijala ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ/  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ) dovesti do redukcije tog kompleksa i utjecati na rezultate analize (43).

### 1.3.3. DPPH

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) je stabilan dušikov radikal. Ima svojstvo delokalizacije slobodnog elektrona zbog kojeg molekula ne dimerizira i tom svojstvu duguje svoju stabilnost. Ljubičasto obojen DPPH radikal se djelovanjem antioksidansa reducira u DPPH spoj blijedožute boje (slika 10) (47).



**Slika 10.** Mehanizam reakcije antioksidansa s DPPH radikalom uz promjenu boje iz ljubičaste u žutu (48)

Mehanizam reakcije antioksidansa s DPPH radikalom temelji se na doniranju atoma vodika DPPH radikalumu koji se pri tom procesu reducira i kao rezultat reakcije nastaju DPPH-H i radikal antioksidansa (49).

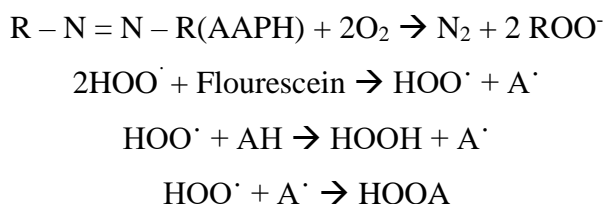
Mjerenjem promjene apsorbancije na 517 nm prati se sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH radikal a antioksidacijski kapacitet ispitivanog uzorka se izračunava na temelju postotka obezbojenja DPPH radikala (47).

Antioksidacijski kapacitet nekog uzorka može se izraziti i preko  $\text{IC}_{50}$ , točnije koncentracije antioksidansa ili količine uzorka koja je potrebna da bi se početna koncentracija DPPH radikala smanjila za 50%. Što je veća dobivena  $\text{IC}_{50}$  vrijednost, uzorak ima manji antioksidativni kapacitet (50).

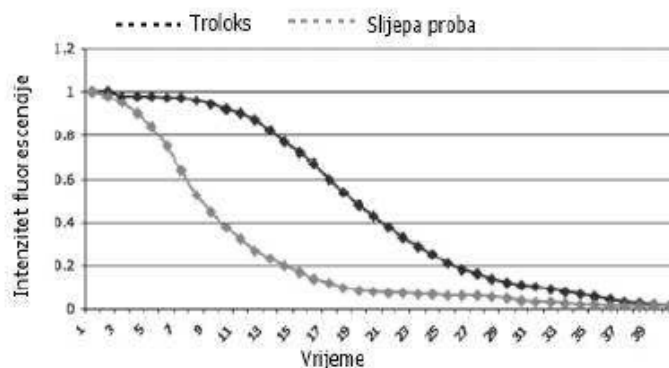
Obzirom da je i DPPH metoda spektrofotometrijska smatra jednostavnom i brzom metodom određivanja antioksidacijske aktivnosti. Nedostaci ove metode su vezani uz topljivost DPPH radikal. Radikal je topljiv samo u organskim otapalima kao što je alkohol, a na apsorbanciju mogu utjecati vanjski čimbenici kao što su svjetlo i kisik, ali i druge vrste otapala (44).

#### 1.3.4. ORAC

ORAC (*engl. Oxygen radical absorbance capacity*) je antioksidacijska metoda pri kojoj antioksidansi (AH) doniraju proton peroksilnom radikalu kako bi ga neutralizirali. Nastali radikal ulazi u reakciju s fluoresceinom pri čemu dobivamo nefluorescentni produkt i dolazi do pada fluorescencije. Mjerenja se provode pri ekscitaciji na 485 nm i emisiji od 520 nm (51).

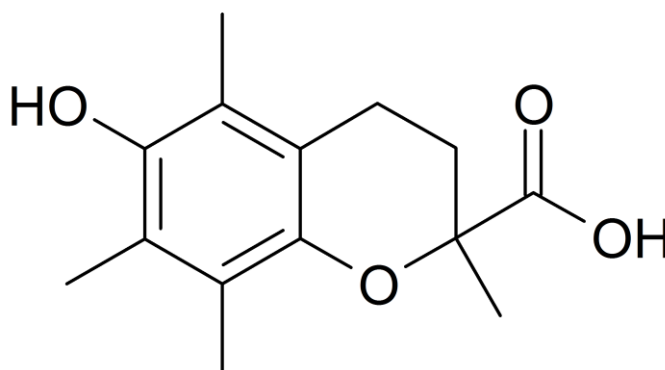


Nastali slobodni radikali, u nedostatku inhibitora, brzo „gase“ fluorescenciju. Prateći vrijeme potrebno da dođe do gubitka fluorescencije bez dodatka uzorka i uz dodani uzorak, određujemo antioksidacijsku aktivnost. Antioksidacijska aktivnost uzorka je bolja, što je veća razlika u brzini reakcije između fluorescentne probe i peroksilnog radikala te peroksilnog radikala i antioksidansa. Antioksidacijski kapacitet kod ORAC metode izražava se preko ukupne površine ispod krivulje promjene fluorescencije (%) u ovisnosti o vremenu (min) tj. kao razlika površine ispod krivulje za slijepu probu i ispitivani uzorak (slika 11) (52).



**Slika 11.** ORAC antioksidacijski kapacitet uzorka (53)

Najčešći antioksidans koji se koristi kao standard kod ORAC metode kao standardna otopina je Trolox (6–hidroksi–2,5,7,8–tetrametilkroman–2–karboksilna kiselina) (slika 12) pa se rezultati najčešće se izražavaju preko Trolox ekvivalenta (TE) kao  $\mu\text{M TE/L}$  uzorka (54).



**Slika 12.** Trolox (55)

ORAC metoda je automatizirana, jednostavna metoda ispitivanja antioksidacijskog kapaciteta, ima definirani kemijski mehanizam i ponovljivost rezultata mjerenja. Nedostaci su nemogućnost provođenja bez spektrofluorimetra, iako može istovremeno mjeriti veliki broj uzoraka, duljina mjerenja je 1 h i 20 min, a tokom analize potrebno je termostatiranje ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (51).

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Materijali

Uzorci crvenih algi *L. obtusa*, *C. officinalis* i *P. squamaria* prikupljeni su u kolovozu 2020. godine u uvali Mavarčica na južnoj strani otoka Čiovo u Jadranskom moru. Isprane su vodom kako bi se uklonili epifiti i nečistoće te su zamrznute i potom osušene postupkom liofilizacije. Prije provođenja ekstrakcija, suhe alge su pulverizirane korištenjem električnog mlinca.

### 2.2. Uređaji

U eksperimentalnom dijelu završnog rada korišteni su uređaji:

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

### 2.3. Kemikalije

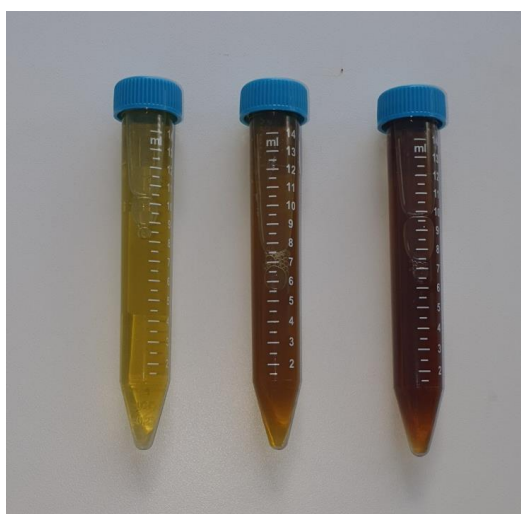
Korištene kemikalije u eksperimentalnom dijelu rada su:

- Folin - Ciocalteu reagens
- Otopina natrijeva karbonata, 20%-tna

- Otopina standarda za određivanje fenola (galna kiselina)
- acetatni pufer,  $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH} = 3,6$
- Klorovodična kiselina  $c(\text{HCl}) = 40 \text{ mmol/L}$ ,  $0,1 \text{ M}$
- TPTZ (2, 4, 6 – tripiridil – s – triazin) (TPTZ)  
 $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$ ,  $\text{Mr} = 10 \text{ mmol/L}$
- otopina  $\text{FeCl}_3$ ,  $c(\text{Fe}^{3+}) = 20 \text{ mmol/L}$
- fosfatni pufer,  $\text{pH} = 7$ ,  $c = 0,2 \text{ M}$
- fosfatni pufer,  $\text{pH} = 7,4$ ,  $c = 0,075 \text{ M}$
- Florescein,  $c = 4,2 \text{ mM}$
- AAPH,  $c = 0,15 \text{ mol/L}$ , 2,2-azobis (2-metilpropionamid)–dihidroklorid)
- otopina standarda – Trolox (6–hydroxy–2,5,7,8–ttramethylchroman–carboxylic acid);  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ,  $\text{Mr} = 250,29 \text{ g/mol}$ , 97% čistoće
- DPPH (2,2–diphenyl–2–picryl–hydrazyl, free radical)  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_6$
- etanol 96%

#### 2.4. Priprema ekstrakata

U ovom radu za pripremu ispitivanih ekstrakata koristili smo dvije metode ekstrakcije: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) (slika 13).



**Slika 13.** Pripremljeni ekstrakti algi *Laurencia obtusa*, *Corallina officinalis* i *Peyssonnelia squamaria*.

#### **2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)**

Kako bi povećali prinos ciljanih tvari prehrambeni tehnolozi se danas sve više okreću ne toplinskim obradama poput ultrazvuka. Djelovanje ultrazvuka ne smanjuje učinkovitost i svojstva tvari, omogućava poboljšanu biorasplošivost, također izbjegnuta je degradacija bioaktivnih spojeva. Kako bi postigli maksimalnu učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom potrebno je optimizirati uvjete temperature, snage ultrazvuka te pomno odabrati otapalo (56). U ovom radu ekstrakti su pripremljeni ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom jačine 40 Hz u trajanju od jednog sata pri temperaturi od 60 °C.

#### **2.4.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)**

Zahvaljujući ograničenom energetske potencijalu mikrovalovi ne mijenjaju strukturu spojeva pa se ova metoda ekstrakcije mikrovalovima često koristi kao pripremni proces u analizi organskih spojeva u uzorcima, ali i za ekstrakciju spojeva kao što su fenoli. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima u vremenu kraćem od onog potrebnog kod standardnih metoda ekstrakcije daje slične i pouzdane rezultate (57). U ovom radu ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provedena je pri uvjetima od 200 W i 60 °C u trajanju od 15 minuta.

### **2.5. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti**

U ovom radu za određivanje ukupnih fenola korištena je metoda Folin – Ciocalteu, a za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta korištene su metode: FRAP, DPPH i ORAC.

#### **2.5.1. Folin – Ciocalteu metoda**

Baždarni pravac odnosa koncentracije prema apsorbanciji izrađena je korištenjem otopina galne kiseline različitih koncentracija (od 50 do 500 mg/L).

Otpipetirano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka u kivete od 10 mm te dodano 1,5 mL destilirane vode i 125  $\mu\text{L}$  Folin – Ciocalteu reagensa. Nakon 1 minute dodano je 375  $\mu\text{L}$  20% - tne otopine natrijeva karbonata, te još 475  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Ovako pripremljena otopina ostavljena je 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo čitanje apsorbancije na spektrofotometru (slika 14) pri valnoj dužini od 765 nm. Rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline (GAE) po litri ekstrakta, kao srednja vrijednost tri ponavljanja.



**Slika 14.** Spektrofotometar

### **2.5.2. FRAP metoda**

U otvore mikrotirarske pločice otpipetirana je svježa otopina FRAP reagensa (300  $\mu\text{L}$ ) i očitana apsorbancija pri 592 nm. U reagens je nakon očitavanja dodano po 10  $\mu\text{L}$  uzorka i praćena je promjena apsorbancije u vremenu koja se mjerila nakon 4 minute. Promjena apsorbancije izračunata je kao razlika konačne vrijednosti apsorbancije smjese po dodatku uzorka i apsorbancije čistog FRAP reagensa. Kao standard je korišten Trolox (u koncentracijama od 50 do 700  $\mu\text{M}$ ), a rezultati su izraženi kao  $\mu\text{M}$  Trolox ekvivalent (TE).

### 2.5.3. DPPH metoda

U mikrotitarske pločice otpipetirano je 10  $\mu\text{L}$  uzorka i dodano 290  $\mu\text{L}$  otopine DPPH radikala. Tijekom jednog sata bilježile su se promjene apsorbancije na 492 nm.

Antioksidacijska aktivnost DPPH izračunata je prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH}' = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/A_{C(0)}] \times 100$$

$A_{C(0)}$  – apsorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) kod  $t = 0$  min

$A_{(t)}$  – apsorbancija reakcijske smjese nakon  $t = 60$  min

Promjena boje iz ljubičaste u žutu rezultat je gašenja DPPH radikala (slika 15).



**Slika 15.** Promjena boje usred gašenja DPPH radikala.

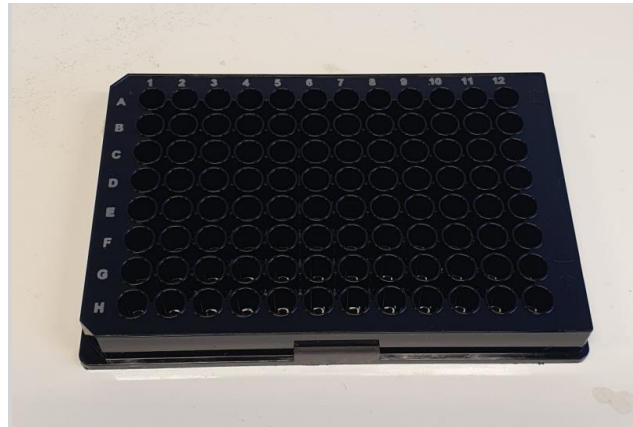
### 2.5.4. ORAC metoda

Kod provođenja ORAC metode mjerenja su se provodila na spektrofleurimetru pri  $\lambda_{\text{eks}} = 485$  nm i  $\lambda_{\text{em}} = 520$  nm, uz prethodno termostatiranje uređaja na  $37^\circ\text{C}$  kako bi stvaranje radikala bilo konstantne brzine.

U poru mikrotitarske pločice (slika 16) dodano je 150  $\mu\text{L}$  fluoresceina i 25  $\mu\text{L}$  uzorka fosfatnog pufera za slijepu probu ili pak otopine Troloxa za izradu baždarnog pravca. Pripremljena otopina termostatirana je na  $37^\circ\text{C}$  u trajanju od 30 min. Nakon



termostatiranja dodano je 25  $\mu\text{L}$  AAPH te je mjerena promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu tijekom 80 minuta mjerenja.



Slika 16. Mikrotitarske pločice

U ovom radu sve analize i mjerenja rađeni su u tri ponavljanja, a dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

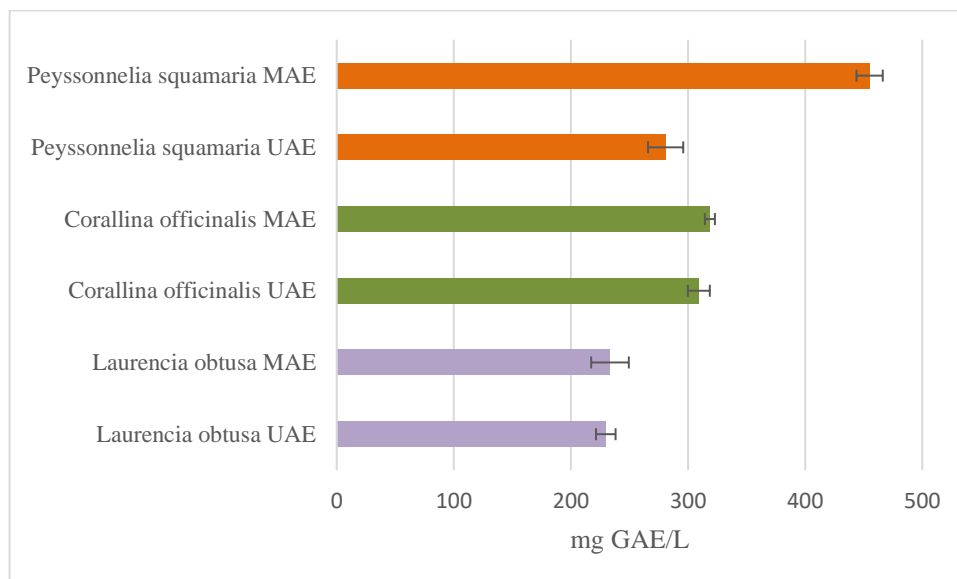
### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Zadatak ovog rada bio je analizirati uzorke odabranih vrsta crvenih algi. Odabranim uzorcima određen je udio ukupnih fenola FC metodom te antioksidacijska aktivnost DPPH, FRAP i ORAC metodama, koje se često primjenjuju u praksi.

#### 3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Rezultati sadržaja ukupnih fenola razlikuju se ovisno o primijenjenoj metodi pripreme uzorka odnosno ekstrakcije (Slika 17). Sva tri ekstrakta algi su imala više vrijednosti ukupnih fenola kod primjene ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Kod uzoraka pripremljenih pomoću ultrazvuka najvišu vrijednost sadržaja ukupnih fenola imala je *C. officinalis* ( $309,17 \pm 9,39$  mg GAE / L), dok je najnižu vrijednost imao ekstrakt *L. obtusa* ( $229,72 \pm 8,35$  mg GAE / L).

Najveću koncentraciju ukupnih fenola kod algi pripremljenih pomoću MAE (slika 18) pokazao je ekstrakt *P. squamaria*  $455,00 \pm 11,21$  mg GAE / L, a najmanju koncentraciju kao i kod UAE, *L. obtusa*,  $233,33 \pm 16,07$  mg GAE / L.



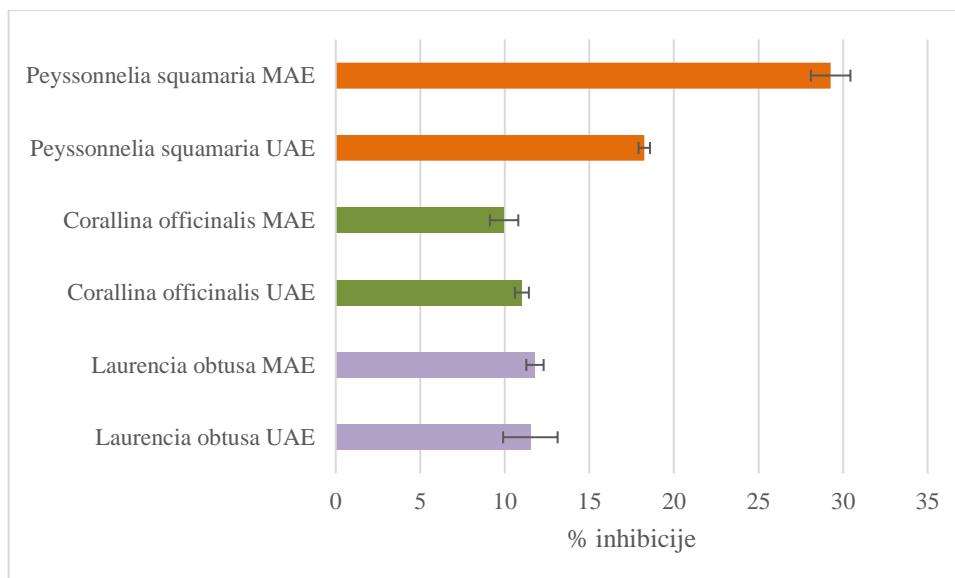
**Slika 17.** Usporedni prikaz udjela ukupnih fenola u testiranim uzorcima

Proučavanjem literature i dostupnih istraživanja na vrstama koje su istraživane i u ovom radu, ali i ostalim vrstama crvenih algi, kao i pripadnicima roda *Laurencia*, možemo uočiti razliku u sadržaju ukupnih fenola ovisno o vrsti otapala korištenom za ekstrakciju, kao i samoj metodi ekstrakcije. Istraživanje koje su proveli Al – Amro i Al – Mutlaq na algama vrste *Laurencia* prikupljenim u Perzijskom zaljevu, pokazalo je kako sadržaj ukupnih fenola varira od 0,83 do 18,99 mg GAE/g ovisno o korištenom otapalu (58). Chakraborty i Joseph su proučavali ukupan sadržaj fenola nekoliko vrsta crvenih algi prikupljenih na jugoistočnoj obali Indije. Najveći ukupan sadržaj fenola kod istraživanih vrsta imala je *Hypnea musciformis*, 205,5 mg GAE/g, dok je sadržaj fenola kod drugih vrsta bio znatno niži, kod vrste *Hypnea valentiae* on je iznosio 72,9 mg GAE/g, a *Jania rubens* 37,2 mg GAE/g (59). Hsaine i Samri su proučavali sadržaj fenola kod crvene alge roda *Laurencia*, točnije vrste *Laurencia pinnatifida* i kod njih je sadržaj fenola je varirao od 3,82 do 22,39 mg GAE/g ovisno o vrsti otapala korištenom prilikom ekstrakcije (60). Nadalje, usporedba rezultata njihovih istraživanja s rezultatima ovog istraživanja je otežana zbog izražavanja dobivenih rezultata u drugim mjernim jedinicama.

### **3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti**

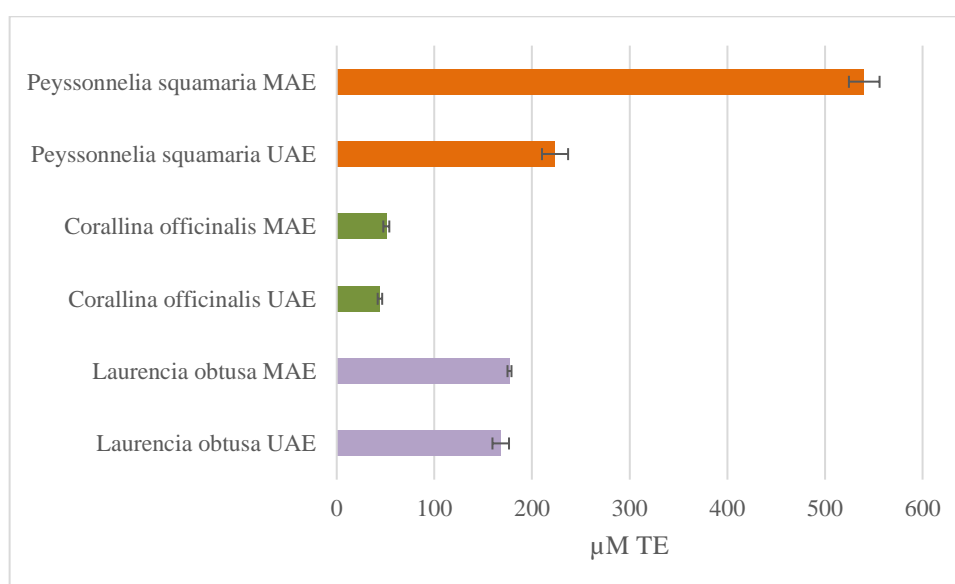
Sposobnost hvatanja slobodnih radikala određena je DPPH metodom i izražena kao % inhibicije. Rezultati prikazani na slici 18 pokazuju da neovisno o metodi ekstrakcije uzorka najveću DPPH vrijednost imao ekstrakt *P. squamaria*, uzorci pripremljeni UAE metodom  $18,25 \pm 0,34$  % inhibicije, dok je za uzorke ekstrahirane pomoću MAE ta vrijednost veća i iznosi  $29,27 \pm 1,17$  %.

DPPH vrijednosti algi *L. obtusa* i *C. officinalis* se ne razlikuju značajno; za algu *L. obtusa* DPPH vrijednosti iznose  $11,51 \pm 1,61$  % (UAE) i  $11,78 \pm 0,51$  % (MAE), dok su za algu *C. officinalis* one  $11,01 \pm 0,41$  % (UAE) i  $9,96 \pm 0,84$  % (MAE).



**Slika 18.** Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta određeni DPPH metodom

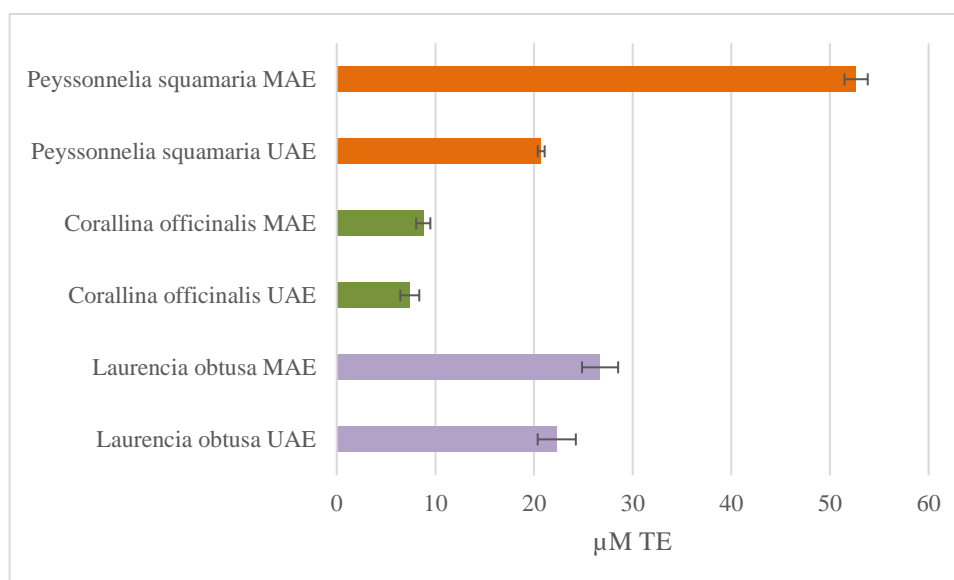
Antioksidacijski kapacitet odabranih uzoraka algi određen je i metodom FRAP. Neovisno o metodi pripreme uzorka, najveći antioksidacijski kapacitet izmjeren ovom metodom pokazuje alga *P. squamaria*, što možemo vidjeti na slici 19. Alga *P. squamaria* pripremljena UAE metodom, pokazuje FRAP vrijednost od  $223,59 \pm 13,38 \mu\text{M TE}$ , dok je za uzorke pripremljene MAE metodom ta vrijednost dvostruko veća i iznosi  $540,26 \pm 15,70 \mu\text{M TE}$ . Najnižu FRAP vrijednost kod obje metode pripreme ima alga *C. officinalis*,  $44,23 \pm 2,31 \mu\text{M TE}$  kod uzoraka pripremljenih UAE i  $50,77 \pm 3,08 \mu\text{M TE}$  kod onih pripremljenih korištenjem MAE.



**Slika 19.** Rezultati određivanja antioksidacijske sposobnosti određeni FRAP metodom

Rezultati antioksidacijske aktivnosti uzoraka određeni metodom ORAC se najčešće izražavaju u  $\mu\text{M}$  Trolox ekvivalenta (TE) uzorka. Razrjeđenje uzoraka je i kod UAE i MAE bilo isto, 1 : 100. Ovisno o načinu pripreme uzorka, rezultati se razlikuju i prikazani su na slici 20. Najveću antioksidacijsku vrijednost, određenu ORAC metodom, kod UAE pokazuje alga *L. obtusa* ( $22,31 \pm 1,93 \mu\text{M TE}$ ), nešto manju vrijednost ima alga *P. squamaria* ( $20,73 \pm 0,35 \mu\text{M TE}$ ), dok najmanju antioksidacijsku sposobnost pokazuje UAE metodom pripremljen uzorak alge *C. officinalis* ( $7,41 \pm 0,96 \mu\text{M TE}$ ).

Alga *C. officinalis* ima najmanju antioksidacijsku sposobnost od tri ispitivana uzorka i kod MAE, uzorak pripremljen na ovaj način ipak pokazuje nešto veću antioksidacijsku vrijednost u iznosu od  $8,77 \pm 0,72 \mu\text{M TE}$ . Veću antioksidacijsku sposobnost pokazuje alga *L. obtusa*,  $26,70 \pm 1,83 \mu\text{M TE}$ , dok najsnažnija antioksidacijska svojstva pokazuje alga *P. squamaria*,  $52,66 \pm 1,18 \mu\text{M TE}$ .



**Slika 20.** Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti određeni ORAC metodom

Brojna istraživanja dokazala su dobar antioksidacijski potencijal crvenih algi. Demirel i Ozdemir u svom istraživanju proučavali su antioksidacijsku aktivnosti vrste *L. obtusa* DPPH metodom. Rezultati njihovog istraživanja variraju od 1,99 do 9,08 ovisno o vrsti korištenog otapala prilikom pripreme ekstrakta. Kao najbolji izbor otapala pokazao kloroform, a kao najlošiji heksan (14). Blamo i Thuy Pam u svom radu ispitivali su antioksidacijski kapacitet vrste *Laurencia intermedia* DPPH i FRAP metodom koristeći ultrazvučnu ekstrakciju. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali vrijednosti  $32,30 \pm$

1,20 mg TE/100g kod DPPH i 87,77 mg TE/100g kod FRAP metode (61). Al-Enazi i Awaad u svom istraživanju proučavali su dvije alge roda *Laurencia*, točnije *Laurencia majuscula* i *Laurencia catarinensis*. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom dala je rezultate od 77,07%,  $IC_{50} = 14,3 \mu\text{g/ml}$  za vrstu *L. majuscula*, dok je za vrstu *L. catarinensis* rezultat bio 67,65%,  $IC_{50} = 53,8 \mu\text{g/mL}$  (62). Vrstu *C. officinalis* ispitivali su Matloub i Hamad u svom istraživanju antioksidacijski i antivirusnih svojstava morskih algi. U njihovom eksperimentu alga je ekstrahirana petrolejskim eterom u trajanju od 2 h, a potom je postupak ponovljen s 80% etanolom. Kao metodu određivanja antioksidacijskih svojstava koristili su DPPH metodu, a rezultati, izraženi kao  $LC_{50}$  (pola maksimalne inhibitorne koncentracije), su bili sljedeći:  $LC_{50} = 82,72 \mu\text{g/mL}$ , dok je  $LC_{90} = 144,95 \mu\text{g/mL}$  (63). *C. officinalis* bila je predmet istraživanja antioksidacijskih aktivnosti i u radu koji su proveli Benattouche i Raho. Koristeći DPPH metodu oni su dokazali kako bi ova crvena alga mogla biti potencijalni izvor bioaktivnih molekula. Utvrdili su da *C. officinalis* pri  $IC_{50}$  ima inhibicijsku koncentraciju u iznosu od 1,3 mg/mL (64). Isto kao i za uspoređivanje rezultata ukupnih fenola, i rezultate antioksidacijskih metoda je jako teško uspoređivati jer ne postoji standardizirani način njihovog prikaza. Ipak, u usporedbi s drugim istraživanjima i crvene alge iz Jadranskog mora pokazuju antioksidacijski potencijal te je potrebna daljnja karakterizacija spojeva iz dobivenih ekstrakata.

#### 4. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih ispitivanja možemo izvesti sljedeće zaključke:

- Način pripreme uzorka, UAE ili MAE metodom, utječe na sadržaj (ili udio) fenola u ekstraktima. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da se boljom pokazala metoda potpomognuta mikrovalovima jer omogućava ekstrakciju veće količine fenola, a time i bolju antioksidacijsku uzoraka.
- Najveću DPPH vrijednost ima *P. squamaria*.
- Ekstrakti alge *P. squamaria* i *L. obtusa* pokazuju značajno veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na ekstrakt alge *C. officinalis* određeni FRAP metodom.
- Najbolja antioksidacijska svojstva primjenom ORAC metode je pokazala alga *P. squamaria*.
- Na osnovu svih rezultata analize možemo zaključiti da alga *P. Squamaria*, između ostalih testiranih vrsta crvenih algi ima najbolji antioksidacijski potencijal.

## 5. LITERATURA

1. Gurgel CF, Deluqui F, Lopez-Bautista J. (2007). Red Algae. Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2007. pp. 1-5.
2. Raja A, Vipin C, Aiyappan A. Biological importance of Marine Algae - An overview. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2013; 2(5):222-227.
3. Lewin RA, Andersen, R A. Algae. Encyclopedia Britannica. Dostupno sa: <https://www.britannica.com/science/algae>. Pristupljeno: 7.7.2021.
4. Blažina M, Magić, L. Procjena potencijala jadranskih algi za kogeneracijsku proizvodnju biogoriva 3. generacije. Zagreb, Zeleni festival, 2017. Dostupno sa: <file:///C:/Users/Vida%20%C5%A0imat/Downloads/Zeleni-festival.pdf>. Pristupljeno: 7.7.2021.
5. Algae – Definition and examples; 2021. Dostupno sa: <https://www.biologyonline.com/dictionary/algae>, Pristupljeno: 7.7.2021.
6. Gamze Y, Özgür V, Serap Ç, Şükran D. Determination of the phenolic compounds and antioxidative capacity in red algae *Gracilaria bursa-pastoris*. Int. J. Food Prop. 2011;14(3):496-502.
7. Red Algae – Rhodophyta; 2014. Dostupno sa: [https://courses.pbsci.ucsc.edu/eeb/bioe120/lecturenotes\\_2014/7%20%20Red%20Lab%202014.pdf](https://courses.pbsci.ucsc.edu/eeb/bioe120/lecturenotes_2014/7%20%20Red%20Lab%202014.pdf), Pristupljeno: 15.9.2021.
8. Atlantis Diving; 2019. Dostupno sa: [https://www.atlantisgozo.com/wp-content/uploads/2019/01/Asparagopsis-taxiformis-Red-Algae\\_1.jpg](https://www.atlantisgozo.com/wp-content/uploads/2019/01/Asparagopsis-taxiformis-Red-Algae_1.jpg). Pristupljeno: 29.8.2021.
9. Fredericq S, Schmidt EW. Red Algae. In: eLS. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2016.
10. Guiry MD. AlgaeBase. *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V.Lamouroux 1813. 2021. Dostupno sa: [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=168](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=168) Pristupljeno: 15.9.2021.
11. Laurencia. Wikipedia. 2021. Dostupno sa: <https://en.wikipedia.org/wiki/Laurencia> Pristupljeno: 5.7.2021.
12. Valero A. Flickr. 2009. Dostupno sa: [https://live.staticflickr.com/2425/3847006946\\_182aff4e86\\_c.jpg](https://live.staticflickr.com/2425/3847006946_182aff4e86_c.jpg) Pristupljeno: 27.8.2021.



13. Einav R. Rhodophyta, Red Algae. Blue Ecosystems. Dostupno sa: [https://www.blue-ecosystems.com/rachelSeaWeed/English/Laurencia-obtusa-\(Hudson\)-Lamouroux](https://www.blue-ecosystems.com/rachelSeaWeed/English/Laurencia-obtusa-(Hudson)-Lamouroux), Pristupljeno: 15.9.2021.
14. Demirel Z, Yilmaz F, Sukatara A. Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts and the essential oil composition of *Laurencia obtusa* var. *pyramidata*. Rom. Biotechnol. Lett. 2011; 1224 – 5984
15. Salvador-Neto O, Gomes SA, Silva AR. Larvicidal Potential of the Halogenated Sesquiterpene (+)-Obtusol, Isolated from the Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Cerariales: Rhodomelaceae), against the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). Mar Drugs. 2016; 14(2)
16. Corallina Officinalis. Wikipedia. 2021. Dostupno sa: [https://en.wikipedia.org/wiki/Corallina\\_officinalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Corallina_officinalis)  
Pristupljeno: 15.9.2021.
17. Corallina Officinalis. CodifR&N. Dostupno sa: <http://www.codif-recherche-et-nature.com/wp-content/uploads/2016/02/CONCENTRE-CORALLINE-FICHE-BOTANIQUE-GB.pdf>  
Pristupljeno: 15.9.2021.
18. The Seaweed Site. Dostupno sa: [https://www.seaweed.ie/images/MG3\\_0469.png](https://www.seaweed.ie/images/MG3_0469.png)  
Pristupljeno: 27.8.2021.
19. Guiry MD. The Seaweed Site: information on marinae algae. 2014. Dostupno sa: [https://www.seaweed.ie/descriptions/Corallina\\_officinalis.php](https://www.seaweed.ie/descriptions/Corallina_officinalis.php)  
Pristupljeno: 15.9.2021.
20. Gomes S, Rodrigues MT, Leonor IB, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Conversion of *Corallina officinalis* into calcium phosphates by using hydrothermal treatment and their potential for bone tissue engineering application. Tissue Eng. Part A. 2008; 14.
21. Heinrich GK. *Corallina officinalis*. Wikipedia. Dostupno sa: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/71/Corallina\\_officinalis\\_Helgoland.JPG/220px-Corallina\\_officinalis\\_Helgoland.JPG](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/71/Corallina_officinalis_Helgoland.JPG/220px-Corallina_officinalis_Helgoland.JPG)  
Pristupljeno: 27.8.2021.
22. Rhodophyta, Red Algae. Blue Ecosystems. Dostupno sa: [https://www.blue-ecosystems.com/rachelSeaWeed/English/Peyssonnelia-squamaria-\(Gmelin\)-Decaisne-](https://www.blue-ecosystems.com/rachelSeaWeed/English/Peyssonnelia-squamaria-(Gmelin)-Decaisne-)  
Pristupljeno: 15.9.2021.

23. Fredreicq S. *Peyssonnelia squamaria*. ResearchGate. Dostupno sa: <https://www.researchgate.net/profile/Suzanne-Fredericq-2/publication/282131845/figure/fig1/AS:391447158247426@1470339683399/Habit-of-Peyssonnelia-squamaria-from-the-Azores.png>  
Pristupljeno: 27.8.2021.
24. *Peyssonnelia squamaria*. Dostupno sa: <http://pictolife.net/pages/popup.php?espece=Algues&id=42&menu=12>  
Pristupljeno: 27.8.2021.
25. Hamid AA. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. Afr. J. Pure Appl. Chem. 2010; 4 (8) 142-151.
26. Antioxidants. WildBlueBerries. Dostupno sa: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.wildblueberries.com%2Fhealth-benefits%2Fantioxidants%2F&psig=AOvVaw0EEi-DXmEaxtkagr5qELN&ust=1630172555399000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCNDb15ng0fICFQAAAAAdAAAAABAD>  
Pristupljeno: 29.8.2021.
27. Percival M. Antioxidants. In: Clinical Nutrition Insights. Advanced Nutrition Publications. 1996; NUT031 1/96 Rev. 10/98
28. Antioxidants. The University of North Dakota. 2010. Dostupno na: <https://und.edu/student-life/dining/files/docs/fact-sheets/antioxidants.pdf>  
Pristupljeno: 29.8.2021.
29. Antioxidants. American Dietetic Association. 2010. Dostupno na: [https://www.womenfirst.net/pdf/ADA/ADA\\_Antioxidants.pdf](https://www.womenfirst.net/pdf/ADA/ADA_Antioxidants.pdf)  
Pristupljeno: 29.08.2021.
30. Knez M. Antioksidansi. [Završni rad] Osijek, Hrvatska. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera; 2014.
31. Baldwin M. Free Radicals. Greatist. Dostupno na: <https://post.greatist.com/wp-content/uploads/sites/2/2020/09/244583-Free-Radicals-Body02-1296x728-1.jpg>  
Pristupljeno: 15.7.2021.
32. Karak P. Biological Activities of Flavonoids: An Overview. IJSPR. Bankura. 2018; 3. 0975 – 8232.
33. Generalić Mekinić I, Skroza D, Šimat V, Hamed I, Čagalj M, Popović Perković Z. Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. Biomolecules. 2019. 9(6). 244.

34. NEUROtiker. Kemijska struktura fenola. Wikipedia. Dostupno na: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8b/Phenol2.svg/1200px-Phenol2.svg.png>  
Pristupljeno: 29.8.2021.
35. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr. Sci. 2016. 5 e47.
36. Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. In: Natural Products. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013. 1543-1580.  
ISBN: 978-3-642-22144-6.
37. Pelegrin Y, Freile A, Robledo D. Bioactive Phenolic Compounds from Algae. Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources. John Wiley & Sons Ltd; 2013. 113 – 129.  
ISBN: 9781118412848
38. Antonio J, Rogerio N, Gonzales MC, Escarpa A. “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. Anal. Chim. Acta. 2004. 539 (1 – 2): 237 - 244
39. Moreno CL, Rudner PC, Garia JM. Development of a Sequential Injection Analysis Device for the Determination of Total Polyphenol Index in Wine. MCA. 2014. 148 (1 – 2): 93 – 98
40. Matrix E, Castro MD. Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I280) and density in wines by flow injection. Analyst. 2000. 126(2): 251-5.
41. Berend S, Grabarić Z. Određivanje Polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. [Stručni rad] Zagreb, Hrvatska: Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada; 2008.
42. Flanjak I, Primorac Lj, Kenjeric D, Bilić B. Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of everlasting, *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don, honey. 8. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma - Zbornik sažetaka. Osijek, Hrvatska: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2013.
43. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay. Sigma Aldrich. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/document/s/368/820/mak369bul.pdf>  
Pristupljeno: 15.9.2021.

44. Kardag A, Ozelic B, Saner S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods*; 2009. 2: 41 – 60
45. Bioquochem. FRAP metoda. 2020. Dostupno na: <https://bioquochem.com/wp-content/uploads/2018/12/Fast-FRAP-Assay-Principle.png>  
Pristupljeno: 29.8.2021.
46. Mohram HA, Youssef MM. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex J. Food Sci. Technol.* 2014. 11(1): 31 – 42
47. Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *Int J Pharm. Sci. Res.*; 2015. 6 (6 2):546-566
48. Chimactiv. DPPH. Dostupno na: [https://lh3.googleusercontent.com/proxy/YCZudQo38i37DxAw3o9CGz0ugweOOFPa\\_T3xpp5TtUrQNpe1sYBhlg0Io2tWI-7DmghTiKF0FrSiUpqBj5FazZOxtUeXL5blde5dXj-WsUpzrRbzSw\\_MhSSaMd-L-WZFjBnT8JZpSi4VRjxc\\_4qOnqp7NE8NdEmjewhC5wjr6S-CfH57WnQ](https://lh3.googleusercontent.com/proxy/YCZudQo38i37DxAw3o9CGz0ugweOOFPa_T3xpp5TtUrQNpe1sYBhlg0Io2tWI-7DmghTiKF0FrSiUpqBj5FazZOxtUeXL5blde5dXj-WsUpzrRbzSw_MhSSaMd-L-WZFjBnT8JZpSi4VRjxc_4qOnqp7NE8NdEmjewhC5wjr6S-CfH57WnQ)  
Pristupljeno: 29.08.2012.
49. Bondet V, Williams W. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT – Food Sci and Technol. Int.* 1997. 30(6): 609 – 615
50. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric. Food Chem.*; 2005. 53(6):1841–1856
51. Prior RL. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct. Foods.* 2015. 8: 797 – 810
52. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic. Res.* 2015. 49(5):633-49
53. Mišković A. Određivanje antioksidacijskog-prooksidacijskog karaktera odabranih boroksina pomoću DPPH metode. [Diplomski rad] Split, Hrvatska: Kemijsko – tehnološki fakultet; 2017.
54. Garret AR. Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. *Methods Mol Biol*; 2010. 594: 251 – 262
55. Lemi NW. Wikipedia.; 2017. Dostupno na: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/50/Trolox.png/1200px-Trolox.png>  
Pristupljeno: 29.08.2021.

56. Drmić H, Jambrak AR. Ultrazvučna ekstrakcija biokativnih spojeva. Zagreb, Hrvatska: Croat. J. Food Sci. Technol. 2010. 2(2): 22-33.
57. Blekić M, Jambrak AR. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Zagreb, Hrvatska: Croat. J. Food Sci. Technol. 2011. 3: 32-47.
58. Al – Amro A, Al – Mutlaq MA, Al – Moauther S, Haq SH. Antioxidant Activity of Rhodophyta Algae *Polysiphonia* and *Laurencia* Collected from the Arabian Gulf. Asian J. Appl. Sci.; 2019, 12: 71 – 75.
59. Chakraborty K, Joseph D, Praveen NK. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. J Food Sci. Technol.; 2015; 52(4):1924-1935.
60. Hsaine L, Samri N, Klifi S. Phenolic Compounds and Radical Scavenging Activity of Red Seaweeds Harvested from the Atlantic Coast of Sidi Bouzid Morocco. Int. J. Pharm. Sci. Res. 2019. 56 (1): 73-81
61. Blamo Jr PA, Thuy Pham HN, Nguyen TH. Maximising phenolic compounds and antioxidant capacity from *Laurencia intermedia* using ultrasound-assisted extraction. AIMS Agric. Food; 2021. 6(1): 32 – 48
62. Al – Enazi NM, Awaad AS, Zain ME, Alqasourmi SI. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of *Laurencia catarinensis*, *Laurencia majuscula* and *Padina pavonica* extracts. Saudi Pharm. J; 2018. 26 (1): 44 - 52.
63. Matloub A, Elsouda S, Senousy W. In vitro Antiviral, Cytotoxic, Antioxidant and Hypolipidemic Activities of Polysaccharide Isolated From Marina Algae. Cairo, Egypt: Int J Pharamacog. Phytochem. Res.; 2015. 7: 0975 – 4873
64. Benattouche Z, Raho GB, Sahnouni F. Antioxidant Activities of Sulfated Polysaccharide Obtained From Red Algae *Corallina Officinalis*. Int J Pharamacog. Phytochem. Res. 2017. 4: 2348 - 3962