

Primjena mikrovalne ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate*

Mihajlovski, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:278325>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER ZAŠTITA OKOLIŠA

**Primjena mikrovalne ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih
spojeva iz smeđe alge *Dictyota Dichotoma* var. *Intricate***

DIPLOMSKI RAD

MARIJA MIHAJLOVSKI

Matični broj: 184

Split, srpanj 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

ORIENTATION: ENVIRONMENTAL PROTECTION

**Application of microwave-assisted extraction for isolation of
bioactive compounds from brown algae *Dichyota Dihotoma*
var. *Intricate***

MASTER THESIS

MARIJA MIHAJLOVSKI

Parent number: 184

Split, July 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Diplomski studij kemijske tehnologije; smjer Zaštita okoliša

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

Primjena mikrovalne ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate*

Marija Mihajlovski, 184

Sažetak:

U ovom radu ispitan je utjecaj primjene različite snage mikrovalova (150, 250, 500 i 1000 W) kod mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate*. Pripravljenim ekstraktima određen je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i tanina te antioksidacijska svojstva metodom FRAP, Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom i DPPH metodom. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da primjena različite snage mikrovalova kod mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih fenolnih spojeva iz jadranske smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* nema značajan utjecaj na fenolni profil i antioksidacijska svojstva ekstrakata.

Ključne riječi: mikrovalna ekstrakcija, smeđe alge, fenoli, antioksidacijska aktivnost.

Rad sadrži: 38 stranica, 19 slika, 12 tablica, 52 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek – predsjednik Povjerenstva
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza – član
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - mentor

Datum obrane: 20. srpnja 2018. g.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Undergraduate study of Chemical Technology; Orientation: Environmental Protection

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3

Mentor: Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

Application of microwave-assisted extraction for isolation of bioactive compounds from brown algae *Dictyota Dichotoma* var. *Intricate*

Marija Mihajlovski, 184

Abstract:

In this research the influence of different microwave's power (150, 250, 500 and 1000 W) for microwave-assisted extraction of bioactive constituents from brown algae *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* was studied. The extracts were analysed for total phenolics, flavonoids and tannins and antioxidant activity using the FRAP, Briggs-Rauscher and DPPH method. From the obtained results it could be concluded that application of different powers for the extraction of bioactive constituents from brown algae *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* had no effect on phenolic profile and antioxidant properties of the extracts.

Keywords: microwave-assisted extraction, brown algae, phenolics, antioxidant activity.

Thesis contains: 38 pages, 19 figures, 12 tables, 52 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph.D. Mario Nikola Mužek, Assist. Prof. – chair person
2. Ph.D. Danijela Skroza, Assist. Prof. – member
3. Ph.D. Ivana Generalić Mekinić, Assist. Prof. - supervisor

Defence date: 20th July 2018.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od ožujka do srpnja 2018. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na ukazanom povjerenju, vodstvu i pomoći pri izradi ovog rada.

Također, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na nesebičnoj podršci tijekom školovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada bio je odrediti utjecaj snage valova kod mikrovalne ekstrakcije na sadržaj bioaktivnih komponenti smeđe alge, *Dictyota Dichotoma* var. *Intricate*. U pripremljenim ekstraktima je određen sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i tanina te antioksidacijska svojstva metodom FRAP, Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom i DPPH metodom.

Sažetak

U ovom radu ispitan je utjecaj primjene različite snage mikrovalova (150, 250, 500 i 1000 W) kod mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate*. Pripremljenim ekstraktima određen je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i tanina te antioksidacijska svojstva metodom FRAP, Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom i DPPH metodom. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da primjena različite snage mikrovalova kod mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih fenolnih spojeva iz jadranske smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* nema značajan utjecaj na fenolni profil i antioksidacijska svojstva ekstrakata.

Ključne riječi: mikrovalna ekstrakcija, smeđe alge, fenoli, antioksidacijska aktivnost

Abstract

In this research the influence of different microwave's power (150, 250, 500 and 1000 W) for microwave-assisted extraction of bioactive constituents from brown algae *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* was studied. The extracts were analysed for total phenolics, flavonoids and tannins and antioxidant activity using the FRAP, Briggs-Rauscher and DPPH method. From the obtained results it could be concluded that application of different powers for the extraction of bioactive constituents from brown algae *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* had no effect on phenolic profile and antioxidant properties of the extracts.

Keywords: microwave-assisted extraction, brown algae, phenolics, antioxidant activity

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. ALGE	2
1.1.1 Smeđe alge.....	4
1.1.2. <i>Dictyota dichotoma</i> var. <i>Intricate</i>	5
1.1.3. Bioaktivni sastojci smeđih algi.....	6
1.2. EKSTRAKCIJA.....	8
1.2.1. Klasične metode ekstrakcije.....	9
1.2.2. Moderne metode ekstrakcije.....	9
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
2.1. REAGENSI I UREĐAJI.....	12
2.2. UZORKOVANJE I PREDOBRAĐA BILJNOG MATERIJALA	12
2.3. POSTUPAK EKSTRAKCIJE	13
2.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	15
2.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONIDA	17
2.6. ODREĐIVANJE UKUPNIH TANINA	19
2.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI.....	21
2.7.1. Oscilacijska Briggs-Rauscher metoda	21
2.7.2. DPPH metoda	22
2.7.3. FRAP metoda	23
3. REZULTATI	25
3.1 REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA	25
3.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOIDA.....	26
3.3. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH TANINA	27
3.4. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI	28
3.4.1. Briggs-Rauscher metoda	28
3.4.2. DPPH metoda	29
3.4.3. FRAP metoda	30
4. RASPRAVA.....	31
5. ZAKLJUČAK.....	33
6. LITERATURA	34

UVOD

Alge predstavljaju skupinu autotrofni, fotosintetskih i uglavnom vodenih organizama koji su posljednjih godina privukli pažnju znanstvenika obzirom da obiluju bioaktivnim komponentama kao što su fenolni spojevi, polisaharidi, pigmenti, terpeni, itd. Smeđe alge kao jedna od najvećih skupina makroalgi je posebno zanimljiva obzirom da obiluje fenolnim spojevima florotaninima koji su karakteristični isključivo za smeđe alge, a kojima su dokazana brojna pozitivna biološka svojstva. Sadržaj sekundarnih metabolita u algama, a time i njihova biološka aktivnost, ovise o brojnim čimbenicima kao što su sama vrsta alge, sezona branja, starosti jedinki, lokacija uzorkovanja te ostalim brojnim utjecajima okoliša. Nadalje, veliki utjecaj na sastav i svojstva ekstrakata imaju i korišteni postupci ekstrakcije kod kojih su sve češće tradicionalne, konvencionalne metode ekstrakcije zamijenjene primjenom novih, brzih i ekološki prihvatljivih tehnika.

U ovom radu za istraživanje učinka primjene mikrovalne ekstrakcije u pripravi biološki aktivnih ekstrakata korištena je jadranska smeđa alga *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* (C. Agardh) Greville.

1. OPĆI DIO

1.1. ALGE

Alge se najčešće svrstavaju u carstvo biljaka jer imaju sposobnost procesom fotosinteze, uz sunčevu svjetlost i klorofil, pretvoriti ugljikov dioksid i vodu u organske tvari i kisik. Ovi organizmi predstavljaju široku skupinu uglavnom vodenih, autotrofnih organizama koji mogu biti jednostanični i višestanični. Primjena algi je u posljednje vrijeme vrlo atraktivna pa se osim u prehrambenoj industriji koriste u kozmetičkoj industriji i farmaciji, kao gnojivo te kao dodatak u hrani za životinje. (1)



Slika 1. Životinjski i biljni svijet Jadrana (2)

Alge se, nadalje mogu podijeliti na **mikroalge** i **makroalge**.

Mikroalge mogu biti jednostanični i višestanični organizmi, a često se nazivaju i spojem bakterija i biljaka. Smatra se da mikroalge postoje na Zemlji oko 3,5 milijardi godina. (7) Jedna od njihovih glavnih značajki je da mogu rasti u nepovoljnim uvjetima okoline za što je zaslužna njihova jednostavna stanična građa. Do sada klasificirane vrste mikroalgi uglavnom pripadaju porodici zelenih algi i cijanobakterija (3), a njihova raznovrsnost omogućuje klasificiranje u različite fitoplanktonske taksonomske skupine. (4) Pored taksonomske klasifikacije, organizmi fitoplanktona mogu se klasificirati prema njihovim veličinama: pikoplankton (0,2-2 μm), nanoplankton (2-20 μm) i mikroplankton (20-200 μm). (4)

Makroalge su brzorastuće morske i slatkovodne biljke koje za razliku od mikroalgi mogu doseći visinu i do 60 m. Za razliku od kopnenih biljaka, makroalge apsorbiraju

hranjive tvari kroz samu strukturu stanica jer nemaju korijenski sustav kao kopnene biljke. Sve makroalge su fotosintetske pa stoga ovise o sunčevoj energiji, a same predstavljaju temelj prehrambenog lanca za tisuće vodenih organizama kojima pružaju hranu, kisik i stanište. Temeljem prisutnosti pigmenata u njima alge se dijele na plave alge (*Cyanophyta*), zelene alge (*Chlorophyta*), smeđe alge (*Phaeophyta*) i crvene alge (*Rhodophyta*).⁽⁵⁾ Procjenjuje se da postoji više od 25 000 vrsta makroalgi (1), a njihova upotreba je raznolika; od hrane za ljude i životinje, u kozmetici, farmaceutskim pripravcima, proizvodnji gnojiva, proizvodnji kemikalija, itd. Značajna količina morskih makroalgi se koristi u ljudskoj prehrani, osobito u Azijskim zemljama gdje stoga i dominira njihov uzgoj. (6)

1.1.1 Smeđe alge

Smeđe alge (lat. *Phaeophyceae*; *Phaeophyta*) su organizmi koji žive u morima najčešće pričvršćene na kamenu podlogu ili druge organizme. Danas je u svijetu poznato oko 1 500 različitih vrsta smeđih algi koje uglavnom nastanjuju morske predjele ili dijelom umjereno hladne dijelove oceana. Karakteristična boja smeđih algi posljedica je dominantnog ksantofila odnosno fukoksantina, koji maskira druge prisutne pigmente, uključujući klorofil a i c te ostale karotenoide. S obzirom na veličinu i građu, vrste smeđih algi se međusobno značajno razlikuju. (8) Smeđe morske alge obično su velike, od morske trave koja može doseći visinu i do 45 m pa do manjih vrsta dugih 30 do 60 cm. (1)



Dictyota linearis



Dictyota dichotoma



Kelp



Padina pavonica



Scytosiphon lomentaria



Dictyopteris polypodioides



Fucus vesiculosus



Cladostephus spogionsus



Cystoseira crinita

Slika 2. Različite vrste smeđih algi (2,9)

1.1.2. *Dictyota dichotoma* var. *Intricate*

Dictyota dichotoma je vrsta smeđe alge, duljine obično od 10 do 15 cm, prozirno-smeđe boje te dugih plosnatih niti duljine od par centimetara. Oblik varijeteta alge *Dictyota dichotoma* koji se koristio u ovom radu je vrpčasto spljošten i dihotomski razgranat. (8)

Tablica 1. Klasifikacija smeđe alge *Dictyota dichotoma* var. *Intricate* (10)

Carstvo	<u>Eukaryota</u>
Kraljevstvo	<u>Chromista</u>
Red	<u>Ochrophyta</u>
Razred	<u>Phaeophyceae</u>
Podrazred	<u>Dictyotophycidae</u>
Poredak	<u>Dictyotales</u>
Obitelj	<u>Dictyotaceae</u>
Vrsta	<u>Dictyoteae</u>
Rod	<u>Dictyota</u>



Slika 3. Smeđa alga *Dictyota dichotoma* (11)

1.1.3. Bioaktivni sastojci smeđih algi

Smeđe alge, kao vodeni organizmi, su u svom staništu izložene utjecaju visokih koncentracija kisika, promjenama temperature, osmotskom stresu i reakcijama s drugim oksidirajućim agensima koji uz svjetlo dovode do stvaranja reaktivnih radikalnih vrsta. Obzirom na navedeno, makroalge očito imaju mogućnost generiranja sekundarnih metabolita koji posjeduju zaštitna svojstva koja im omogućuju zaštitu od vanjskih čimbenika i oksidacijskog stresa. Razlog navedenoj pretpostavci leži u činjenici da promatrani, *in vivo* fotodinamički štetni učinci, nastali zbog nespecifičnih oksidacijskih reakcija u makroalgama nisu vidljivi. (12-16) Od različitih skupina bioaktivnih fitokemikalija alge su dokazano bogat izvor biološki aktivnih enzima kao što su superoksid dismutaza, peroksidaza, glutation reduktaza i katalaza, ali također i pigmentata, polisaharida, askorbinske kiseline, fenolnih spojeva, florotanina, tokoferola, bromfenola, terpena, itd. (16-19)

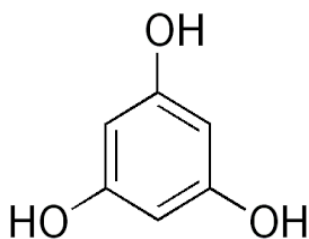
Budući da se posljednjih godina sve više razvija svijest o tome da je hrana izvor funkcionalnih sastojaka s pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje, vrlo je aktualna i problematika ekstrakcije takvih sastojaka iz različitih prirodnih izvora. Obzirom na prethodno naveden vrijedan biološki potencijal algi one bi mogle biti izvrsni kandidati kao izvori ovih spojeva. (20) Postupak ekstrakcije sam po sebi nije selektivan pa stoga ekstrakti najčešće predstavljaju kompleksne smjese različitih metabolita. Sadržaj ovih spojeva u algama ovisi o sezoni branja, starosti jedinki, samoj vrsti, geografskom položaju uzorkovanja te brojnim utjecajima okoliša, a navedeni čimbenici osim na sastav algi uvelike utječu i na njihova biološka svojstva. (21)

Polisaharidi čine sastavni dio stanične stijenke smeđih algi te im daju fleksibilnost i sprječavaju isušivanje algi. Smeđe alge mogu sintetizirati sulfatne polisaharide (fukoidan, alginat i laminarin). Navedeni polisaharidi imaju jako dobra svojstva želiranja, stabiliziranja, zgušnjavanja i viskozifikacije te se kao takvi koriste u proizvodnji papira i tekstila, ali i u kozmetičkoj, biomedicinskoj i farmaceutskoj industriji. (22)

Fenoli spojevi se strukturno sastoje od aromatskog prstena na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a kao strukturne komponente stanične stijenke algi imaju sekundarnu ulogu u obrani od mikroorganizama i nametnika te u signalizaciji. (22)

U algama prisutni fenoli mogu biti različiti, od onih jednostavnih kao što su fenolne kiseline do izrazito složenih spojeva kao što su florotanini koji nastaju

polimerizacijom jedinica floroglucinola. (23,24). U smeđim morskim algama florotanini su najčešći fenoli i najznačajniji sekundarni metaboliti čiji sadržaj može doseći i do 40%. (21,25,26)

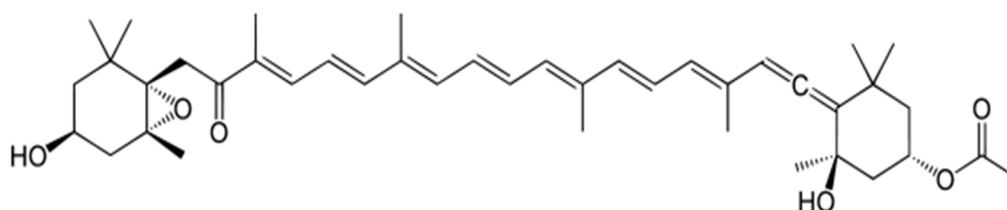


Slika 4. Struktura floroglucinola (27)

Sadržaj proteina u smeđim algama općenito je vrlo nizak (6-13 % suhe tvari) te ovisi o vrsti alge, godišnjem dobu i hranjivim tvarima. Većina proteina u algama ima visoku nutritivnu vrijednost, a bogat su izvor asparaginske i glutaminske kiseline te leucina.

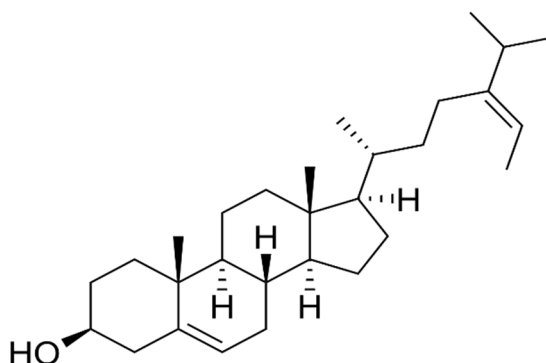
Lipidi se u smeđim algama nalaze također u vrlo niskoj koncentraciji (0,6-3,5% suhe tvari). Općenito, udio višestruko nezasićenih masnih kiselina je puno veći u algama nego li u kopnenim biljkama. (28) Esencijalne masne kiseline (ω -3 i ω -6), koje su izuzetno bitne za prehranu ljudi i životinja, sastavni su dio lipida koji čine strukturne membrane algi. Smeđe alge imaju uravnotežen odnos ovih masnih kiselina (0,6-5,1:1). (29). Pojedine masne kiseline koje su prisutne u algama imaju protuupalno djelovanje (20), djeluju protiv obraštaja a mogu čak spriječiti nepoželjno nakupljanje mikroorganizama i beskraljčnjaka na umjetnim površinama u morskoj vodi. Također, neke od ω -3 masnih kiselina su superoksidni čistači. (21)

Terpeni su lipofilni sekundarni metaboliti koji se sastoje od međusobno povezanih izoprenskih jedinica pri čemu mogu formirati različite grupacije (-mono, -di, -tri, -hemi, itd.) i tetraterpenoide (karotenoide). Karotenoidi imaju bitnu ulogu u procesu fotosinteze i fotozaštite. α - karoten i β - karoten, lutein, klorofil a i fukoksantin su identificirani u smeđim algama. (29-32). Za fukoksantin koji je specifični pigment smeđih algi je dokazano da štiti od UV-B zračenja (33), ponaša se kao angiostat (34), ima dokazano protuupalno djelovanje (35) i antidijabetički učinak. (36)



Slika 5. Struktura fukoksantina (37)

Dominantni sterol u smeđim algama je fukosterol koji ima dokazane blagotvorne učinke na apsorpciju kolesterola te su mu dokazana i brojna antiseptička, antibakterijska i protuupalna djelovanja. (21)



Slika 6. Struktura fukosterola (38)

Sadržaj vitamina u smeđim algama značajno varira te direktno ovisi o godišnjem dobu u kojem se alga prikuplja. Mineralni sastav algi je također promjenjiv te osim o sezoni branja, ovisi o ekološkim, zemljopisnim i fiziološkim čimbenicima. (39) Alge sadrže Se, Zn, Mn i Cu, koje su strukturne komponente nekih antioksidacijskih enzima i/ili mogu doprinijeti njihovoj aktivnosti. (40)

1.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odvajanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. (41)

Najčešće korištena vrsta ekstrakcije je ekstrakcija otapalom koja zahtijeva puno vremena i utrošak velikih količina otapala. Također konvencionalni postupci ekstrakcije

imaju brojne nedostatke obzirom da su vrlo skupi, dugotrajni i najčešće uzrokuju degradaciju proizvoda. Stoga se, zbog smanjenja štetnog utjecaja otapala na zdravlje i ekoloških čimbenika, sve češće razvija tzv. "zeleni" pristup procesu ekstrakcije kod kojeg se najčešće koriste nove tehnike izolacije. (20,42,43)

1.2.1. Klasične metode ekstrakcije

Ekstrakcija kapljevina-kapljevina je jedinična operacija u kojoj se dvije nemješive kapljevine dovode u kontakt, a otopljene komponente mješavine raspodijele se između dviju faza. (44)

Ekstrakcija čvrsto-tekuće je metoda koja se može raditi na više načina (miješanjem, ultrazvučna ekstrakcija, Soxhlet ekstrakcija, itd.). Od ovih vrsta ekstrakcije najčešće se koristi metoda miješanja kod koje se analit ekstrahira u tekućinu iz čvrste faze uz uvjet da je analit dobro usitnjen, dok se netopivi dio nakon samog postupka ukloni centrifugiranjem ili filtracijom.

Ultrazvučna ekstrakcija ili sonikacija koristi energiju ultrazvuka na način da se uzorak izlaže toj energiji čime se povećava tlak i temperatura čime dolazi do raspada analita u reakciji i popunjavanja šupljina.

Jedna od često korištenih metoda ekstrakcije je i Soxhletova metoda koja je relativno spora metoda, ali prednost joj je što koristi jako male količine otapala jer kod ove metode ekstrakcijsko otapalo cirkulira i konstantno se kondenzira pa se na taj način ispiru topljive komponente u više navrata istim otapalom. Proces ekstrakcije ovom metodom se provodi sve dok se ne postigne potpuna ekstrakcija (analit u potpunosti ukloni iz čvrstog uzorka).

1.2.2. Moderne metode ekstrakcije

Primjena modernih metoda ekstrakcije za svrhu imaju prvenstveno ubrzanje samog procesa ekstrakcije, ali zahtijevaju i znatno veća početna investicijska ulaganja. Razvijeni su i testirani pristupi kao što su ekstrakcija na čvrstoj fazi, ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija (MAE), ekstrakcija pod visokim pritiskom, ekstrakcija potpomognuta enzimima, itd. Svi ovi postupci već se

uspješno koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz različitih materijala. (20)

Metoda mikrovalne ekstrakcije, kao moderna metoda ekstrakcije, korištena je u ovom radu pa je u daljnjem tekstu detaljnije opisana.

1.2.2.1. Mikrovalna ekstrakcija (MAE)

Mikrovalna ekstrakcija, (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE) je tehnika koja koristi mikrovalnu energiju za zagrijavanje otapala iznad temperature vrelišta, čime se povećava učinkovitost ekstrakcije i skraćuje njeno vrijeme trajanja. (45)

MAE se koristi za analizu tragova organskih spojeva krutih uzoraka, ali i za ekstrakciju različitih prirodnih spojeva. Mikrovalnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom koja kombinira ultrazvuk i mikrovalove moguće je dobiti udjele ekstrahiranih tvari slične onima koji se dobiju standardnim postupcima. Ipak postoji bitna razlika, a to je znatno kraće vrijeme samog postupka što MAE tehnici daje na energetskom i ekonomskom značaju.(45) Kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalnu energiju u omjeru njihovih dielektričnih konstanti što znači ako je veća vrijednost dielektrične konstante, veća je i vrijednost apsorpcije mikrovalne energije te njene pretvorbe u toplinu. Bitno je naglasiti da mikrovalovi imaju ograničen energetski potencijal pa oni samo povećavaju temperaturu, ali ne oštećuju strukturu tvari. Izbor otapala je jako bitan za interakciju otapala i matriksa te direktno ovisi o topljivosti ekstrakta, a polarna otapala kao što su voda, etanol i metanol su pogodni za zagrijavanje djelovanjem mikrovalne energije. (46) Mikrovalovi zagrijavaju cijeli uzorak i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te tako vrši otapanje. (45)

U procesu MAE temperatura mora biti točno definirana kako se termo-osjetljivi spojevi ne bi razgradili. Povećanje temperature rezultira boljim učinkom ekstrakcije ukoliko se koristi optimalna temperatura uvjetovana dobro odabranom snagom mikrovalova. (46) Navedeni učinak povećanja temperature djelovanjem mikrovalova koristi se i u svakodnevnom životu kod uporabe mikrovalnih pećnica za pečenje i kuhanje.

Komercijalno su dostupne dvije vrste sustava za mikrovalnu ekstrakciju. To su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. (46)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. REAGENSI I UREĐAJI

Svi korišteni reagensi i otapala bili su potrebne analitičke čistoće, a proizvođači su Kemika (Zagreb, Hrvatska), Merck (Darmstadt, Njemačka), Alkaloid (Skopje, Makedonija) i Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka). Standardi galne kiseline, kvercetina i (+)-katehina korišteni za spektrofotometrijska mjerenja i izradu baždarnih pravaca su proizvedeni od Sigma-Aldrich GmbH.

Za pripremu ekstrakata korišten je uređaj za mikrovalnu ekstrakciju MA196-001 ETHOS X (Milestone Srl, Sorisole, Italy), dok su spektrofotometrijska mjerenja rađena na UV-Vis double beam spektrometru Specord 200 (Analytik Jena GmbH, Njemačka).

2.2. UZORKOVANJE I PREDOBRAĐA BILJNOG MATERIJALA

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištena je jadranska smeđa morska alga, vrsta *Dictyota dichthoma* var. *Intricate* (C. Agardh) Greville prikupljena u siječnju 2018. godine u jutarnjim satima na lokaciji Lučka kapetanija (Split). Biljni materijal je uzorkovan sa dubine od 1 metra pri temperaturi mora od 11°C. Sakupljeni materijal je prenesen do laboratorija u posudi s morskom vodom, nakon čega je podvrgnut postupku predobrade.



Slika 7. *Dictyota dichthoma* var. *Intricate* korištena u ovom istraživanju

2.3. POSTUPAK EKSTRAKCIJE

Prije postupka pripreve ekstrakata, urađena je predobrada algalnog materijala na način da su s površine algi uklonjeni epifiti te ostali organizmi i nečistoće ispiranjem alge vodovodnom vodom. Za svaki postupak ekstrakcije je potom odvagano po 300 g ocijeđenog biljnog materijala koji se stavio u staklenu posudu za mikrovalnu ekstrakciju. Posuda se postavila u mikrovalnu peć, a ispod nje se postavilo hladilo za ukapljivanje nehlapljivog ekstrakta koji se sakuplja u čaši ispod uređaja.



Slika 8. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju MA196-001 ETHOS X (51)



Slika 9. Postavljanje uzorka u mikrovalnu peć

Za pripravu ekstrakata primjenom mikrovalne ekstrakcije praćena su tri parametra; snaga mikrovalova, vrijeme odnosno trajanje ekstrakcije, te temperatura. Dok su dva parametra od navedenih bila konstantna kod svih korištenih postupaka (vrijeme i temperatura), mijenjala se samo snaga mikrovalova te se pratio njen utjecaj na izolaciju (ekstrakciju) biološki aktivnih komponenti iz algalnog materijala. Korišteni procesni parametri u procesima mikrovalne ekstrakcije prikazani su u *Tablici 2*.

Tablica 2. Procesni parametri korišteni kod mikrovalne ekstrakcije

Oznaka ekstrakta	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (minuta)	Temperatura (°C)
A	150	30	60
B	250	30	60
C	500	30	60
D	1000	30	60

Pripravljene ekstrakte algi su liofilizirani, a potom otopljeni u 50%-tnom etanolu u koncentraciji 10 mg/mL te kao takvi korišteni u daljnjem istraživanju.

2.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin-Ciocalteu metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, pri čemu nastaju plavo obojeni produkti. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se određivanjem absorbancije pri 765 nm i direktno je proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. (48)

Reagensi:

- Folin Ciocalteu reagens
- Otopina natrijeva karbonata, w (Na₂CO₃) = 20%
- Matična otopina galne kiseline, c = 5000 mg/L

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca prema opisanom postupku se testiraju otopine galne kiseline različitih koncentracija (0-500 mg/L) (*Tablica 3., Slika 10.*).

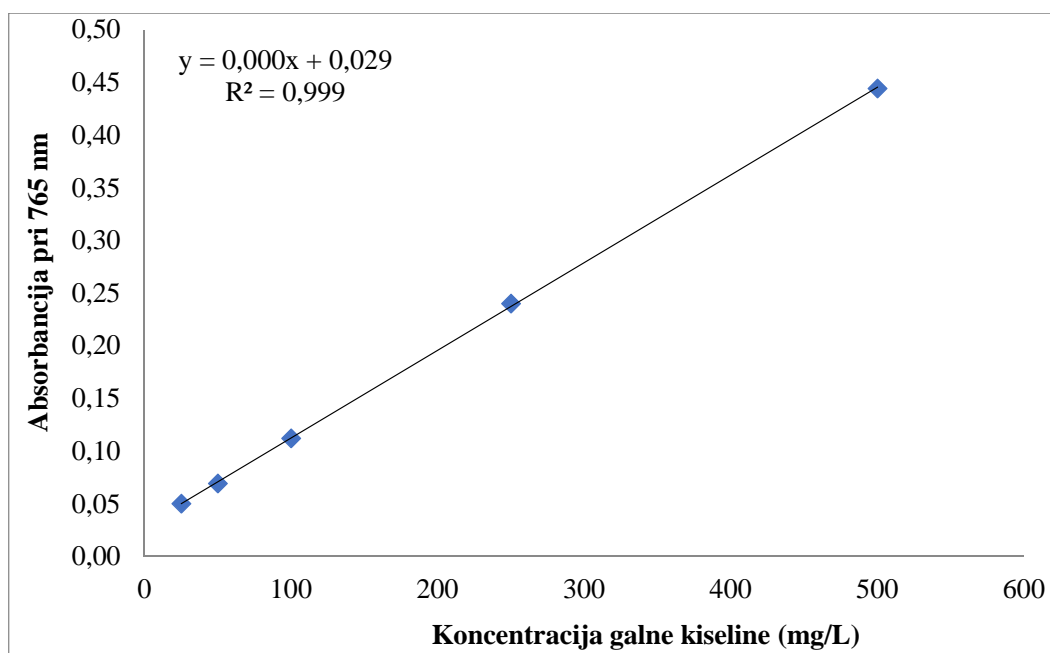
Postupak:

U kivetu se otpipetira se 25 µL uzorka, doda 1,975 mL destilirane vode i 125 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se dobro promiješa i nakon 1 minute se doda još 375 µL otopine karbonata. Otopini se nakon 2 sata stajanja u mraku očita absorbancija pri 765 nm.

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima se izračuna preko jednadžbe baždarnog pravca dobivene za otopine galne kiseline, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenata galne kiseline po 1 L ekstrakta (mg GAE/L).

Tablica 3. Odnos koncentracije galne kiseline i absorbancije reakcijske smjese pri 765 nm korišten za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih fenola

Koncentracija (mg/L)	Absorbancija (765 nm)
500	0,444 ± 0,002
250	0,240 ± 0,000
100	0,112 ± 0,006
50	0,069 ± 0,001
25	0,050 ± 0,003



Slika 10. Baždarni pravac galne kiseline za određivanje ukupnih fenola

2.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Udio ukupnih flavonoida u ekstraktima određen je korištenjem kolorimetrijske metode kod koje su korišteni reagensi aluminijev klorid i natrijev nitrit, a intenzitet nastalog žutog obojenja mjeri pri 510 nm. (49)

Reagensi:

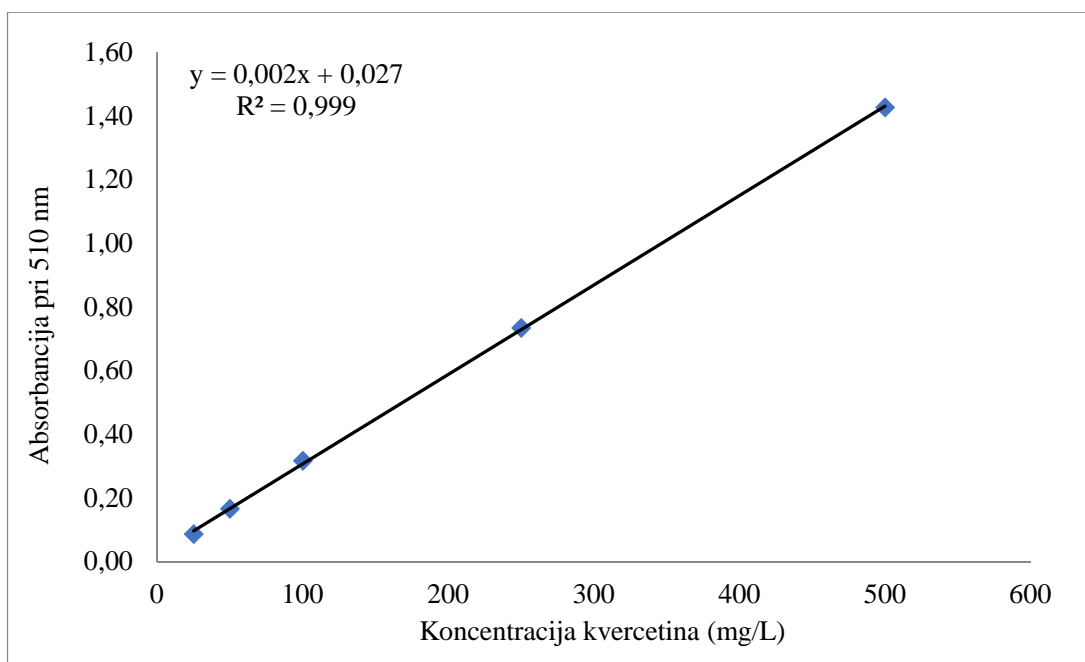
- otopina natrijeva nitrita, w (NaNO₂) = 5%
- otopina aluminijeva klorida, w (AlCl₃) = 10%
- otopina natrijevog hidroksida, c (NaOH) = 1 mol/L

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca testiraju se otopine kvercetina različitih koncentracija (od 25 do 500 mg/L) prema opisanom postupku (*Tablica 4., Slika 9.*).

Tablica 4. Odnos koncentracije kvercetina i absorbancije reakcijske smjese pri 510 nm korišten za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih flavonoida

Koncentracija (mg/L)	Absorbancija (500 nm)
500	1,427 ± 0,059
250	0,735 ± 0,118
100	0,318 ± 0,008
50	0,166 ± 0,002
25	0,088 ± 0,002



Slika 11. Baždarni pravac kvercetina za određivanje ukupnih flavonoida

Postupak:

U kivetu se otpipetira 250 μL uzorka, 1,525 mL vode i 75 μL otopine NaNO_2 . Navedena otopina se ostavi 6 minuta, a potom joj se doda 150 μL AlCl_3 i ponovno ostavi 5 minuta. Nakon toga, doda se 500 μL otopine NaOH te odmah mjeri absorbancija pri 510 nm. Udio flavonoida u ekstraktima se izračuna preko jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin, a rezultati se izražavaju u mg kvercetina po 1 L ekstrakta (mg QE/L).

2.6. ODREĐIVANJE UKUPNIH TANINA

Sadržaj ukupnih tanina određen je metodom koju je opisao Julkunen-Titto (1985). (50)

Reagensi:

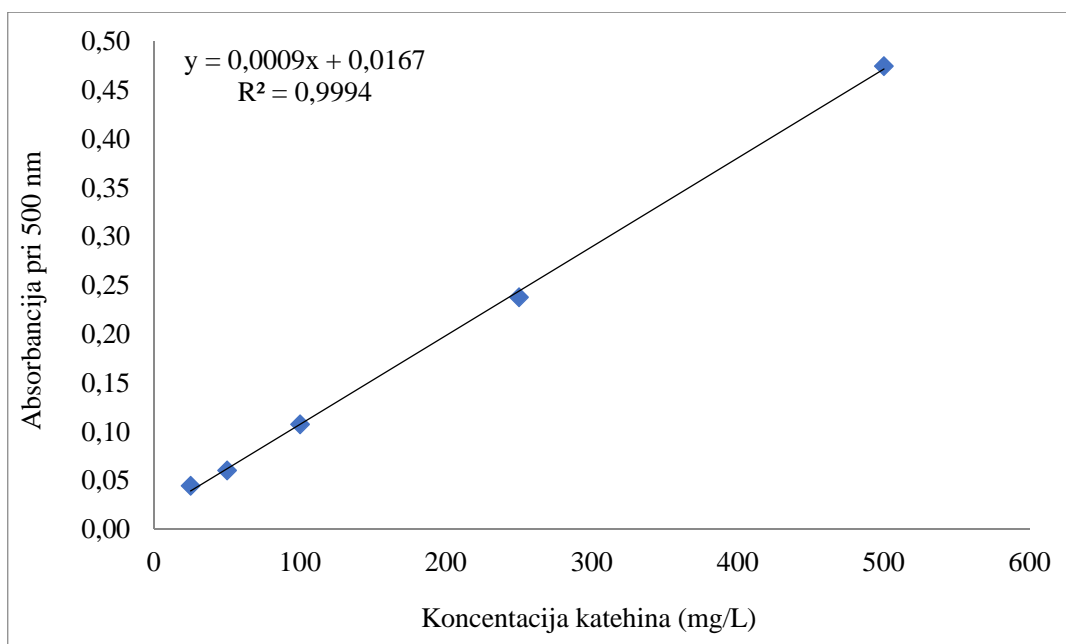
- otopina vanilina, w (vanilina) = 4%
-

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca testiraju se otopine katehina različitih koncentracija (od 25 do 500 mg/L) prema opisanom postupku (*Tablica 5., Slika 10.*).

Tablica 5. Odnos koncentracije katehina i absorbancije reakcijske smjese pri 500 nm korišten za izradu baždarnog pravca za određivanje ukupnih tanina

Koncentracija (mg/L)	Absorbancija (500 nm)
500	0,045 ± 0,003
250	0,238 ± 0,019
100	0,108 ± 0,017
50	0,061 ± 0,008
25	0,045 ± 0,002



Slika 12. Baždarni pravac katehina za određivanje ukupnih tanina

Postupak:

U kivetu se doda 50 μ L uzorka, 1,5 mL otopine vanilina i 750 μ L koncentrirane klorovodične kiseline. Sve zajedno se dobro izmiješa i ostavi 20 minuta u tami, nakon čega se otopini očita absorbancija pri 500 nm. Otopine katehina se koriste za izradu baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u miligramima ekvivalenta katehina po litri ekstrakta (mg KE/L).

2.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

2.7.1. Oscilacijska Briggs-Rauscher metoda

Ovom se oscilacijskom metodom mjeri antioksidacijska aktivnost uzorka praćenjem vremena njegove inhibicije oscilacija u BR sustavu djelovanjem reakcije antioksidansa s hidroperoksil radikalom. (51)

Reagensi:

- Otopina A (kalijev jodat, sumporna kiselina)
- Otopina C (malonska kiselina, manganov sulfat, škrob)
- Otopina vodikova peroksida, w (H₂O₂): 30 %

Postupak:

U epruvetu se otpipetira po 1 mL otopina A i C, a oscilacijska reakcija se pokrene dodatkom 1 mL otopine vodikova peroksida što je vidljivo promjenom boje otopine iz bezbojne preko žute u modru. Po pojavi trećeg plavog obojenja doda se 100 µL otopine uzorka te se mjeri vrijeme do ponovne pojave oscilacija (vrijeme inhibicije) koje je zapravo mjera antioksidacijske aktivnosti uzorka.

2.7.2. DPPH metoda

DPPH metoda temelji se na redukciji radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil koji u prisutnosti elektron donora, tj. antioksidansa, mijenja boju iz ljubičaste u žutu, što se prati pri 517 nm. (52)

Reagensi:

- Etanolna otopina DPPH radikala, absorbancija 0,6 (\pm 0,02).

Postupak:

U kivetu se otpipetira 100 μ L uzorka i 2,9 mL otopine DPPH. Nakon jednog sata otopini se mjeri absorbancija pri 517 nm. Postotak inhibicije DPPH radikala (% inhibicije DPPH) računa se prema izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] \times 100$$

gdje je:

$A_{C(0)}$ – absorbancija kontrole (otopina DPPH) kod $t = 0$ minuta,

$A_{A(t)}$ – absorbancija reakcijske smjese nakon nekog vremena t .

2.7.3. FRAP metoda

FRAP metodom se određuje redukcijska sposobnost uzorka tj. sposobnost antioksidansa da reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} . Nastali ioni reagiraju s TPTZ reagensom (2,4,6-tripiridil-s-triazin) dajući plavo obojeni kompleks koji ima apsorpcijski maksimum kod 593 nm. (52)

Reagensi:

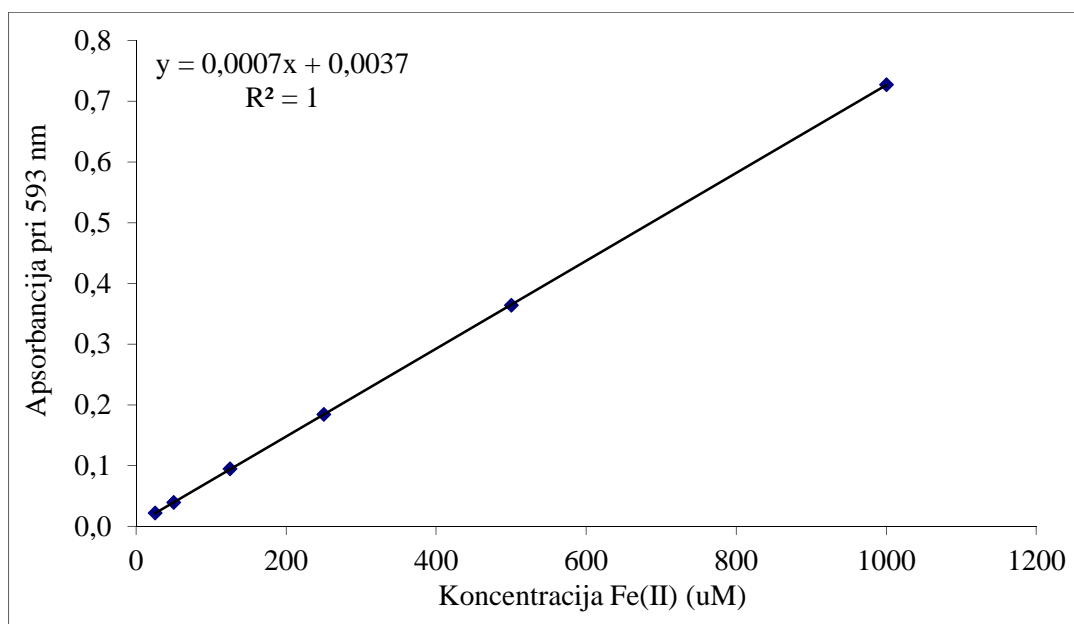
- Acetatni pufer, c ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$)=300 mmol/L, pH= 3,6.
- Otopina klorovodične kiseline, c (HCl)=40 mmol/L.
- Otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), c ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$)=10 mmol/L: 159,4 mg TPTZ-a otopi se u 50 mL 40 mmol/L otopine HCl-a.
- Otopina željezovog (III) klorida, c (FeCl_3)=20 mol/L.
- FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera i po 2,5 mL otopine TPTZ-a i FeCl_3 .

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca testiraju se otopine FeSO_4 različitih koncentracija (od 25 do 1000 μM) prema opisanom postupku (Tablica 6., Slika 11.).

Tablica 6. Odnos koncentracije Fe(II) iona i absorbancije reakcijske smjese pri 593 nm korišten za izradu baždarnog pravca za određivanje FRAP vrijednosti

Koncentracija (μM)	Absorbancija (593 nm)
1000	$0,728 \pm 0,003$
500	$0,364 \pm 0,001$
250	$0,184 \pm 0,001$
125	$0,095 \pm 0,000$
50	$0,040 \pm 0,002$
25	$0,022 \pm 0,001$



Slika 13. Baždarni pravac otopina Fe(II) za određivanje FRAP vrijednosti

Postupak:

U kivetu se otpipetira 2,9 mL FRAP reagensa i očita mu se apsorbancija pri 593 nm. U reagens se doda 100 μ L uzorka i pratili promjena apsorbancije otopine u 4. minuti. Rezultati FRAP vrijednosti se računaju preko jednadžbe baždarnog pravca dobivene za otopinu Fe (II) iona i izraženi su kao μ M ekvivalenta Fe (II).

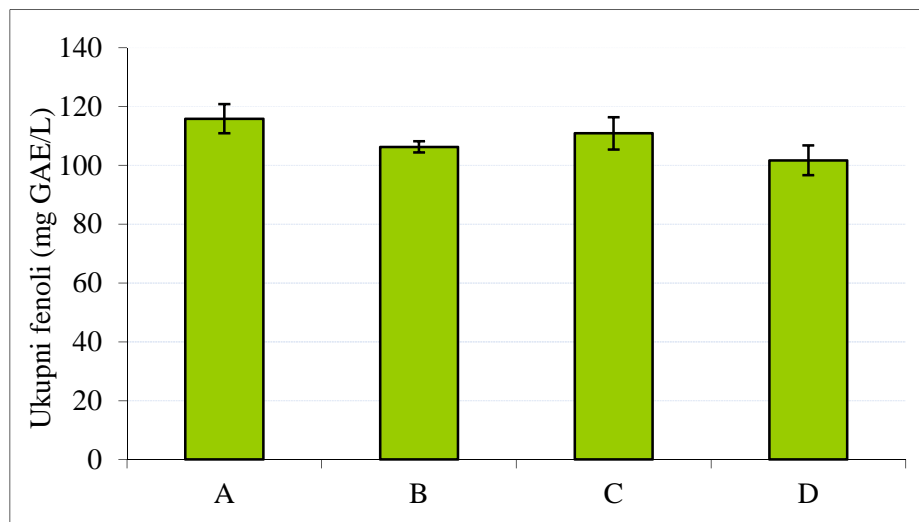
3. REZULTATI

3.1 REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH FENOLA

Tablica 7. Rezultati određivanja ukupnih fenola u ekstraktima smeđe alge *Dictyota dichthioma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova

Oznaka uzorka	Koncentracija fenola (mg GAE/L)
A	115 ± 5
B	106 ± 2
C	111 ± 5
D	102 ± 5

*mg GAE/L – miligrami ekvivalenata galne kiseline po 1 L ekstrakta



*mg GAE/L – miligrami ekvivalenata galne kiseline po 1 L ekstrakta

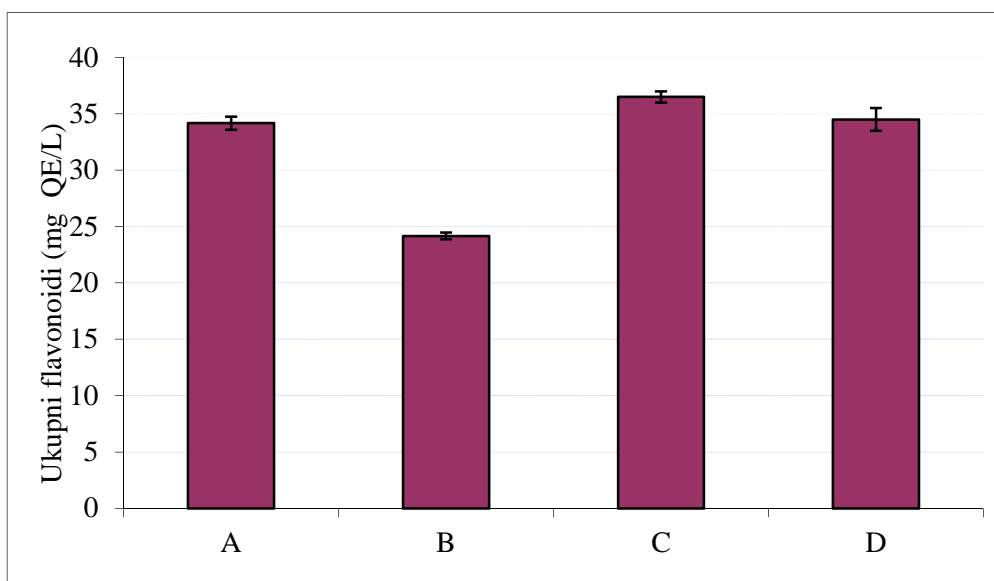
Slika 14. Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola u ekstraktima smeđe alge *Dictyota dichthioma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova

3.2. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH FLAVONOIDA

Tablica 8. Rezultati određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima smeđe alge *Dictyota dichtioma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova

Oznaka uzorka	Koncentracija flavonoida (mg QE/L)
A	34 ± 1
B	24 ± 0
C	36 ± 1
D	34 ± 1

*mg QE/L – miligrami ekvivalenta kvercetina po 1 L ekstrakta



*mg QE/L – miligrami ekvivalenta kvercetina po 1 L ekstrakta

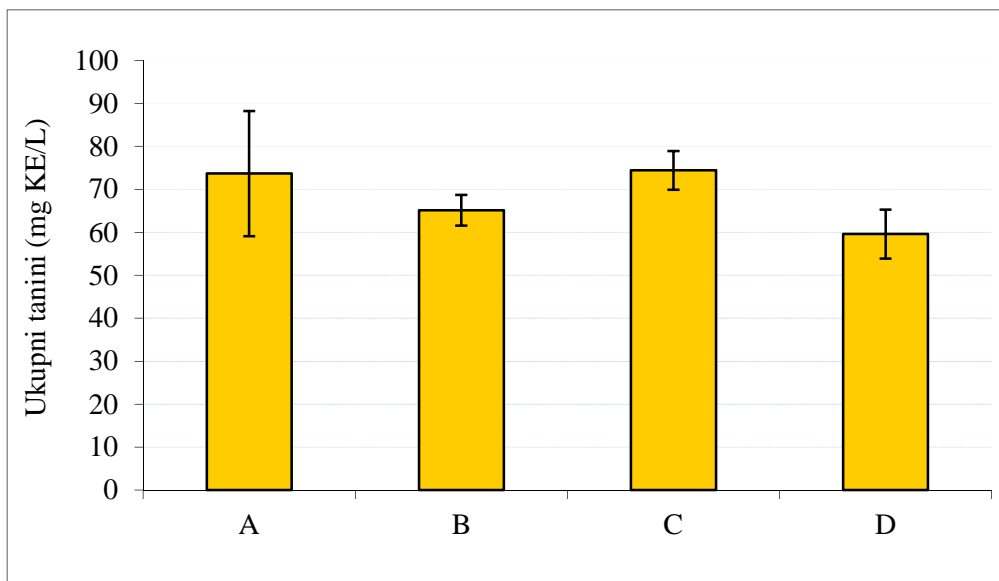
Slika 15. Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih flavonoida u ekstraktima smeđe alge *Dictyota dichtioma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova

3.3. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNIH TANINA

Tablica 9. Prikaz rezultata određivanja ukupnih tanina u ekstraktima smeđe alge *Dictyota dichtioma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova

Oznaka uzorka	Koncentracija tanina (mg KE/L)
A	74 ± 15
B	65 ± 4
C	74 ± 4
D	59 ± 6

*mg KE/L – miligrami ekvivalenata katehina po 1 L ekstrakta



*mg KE/L – miligrami ekvivalenata katehina po 1 L ekstrakta

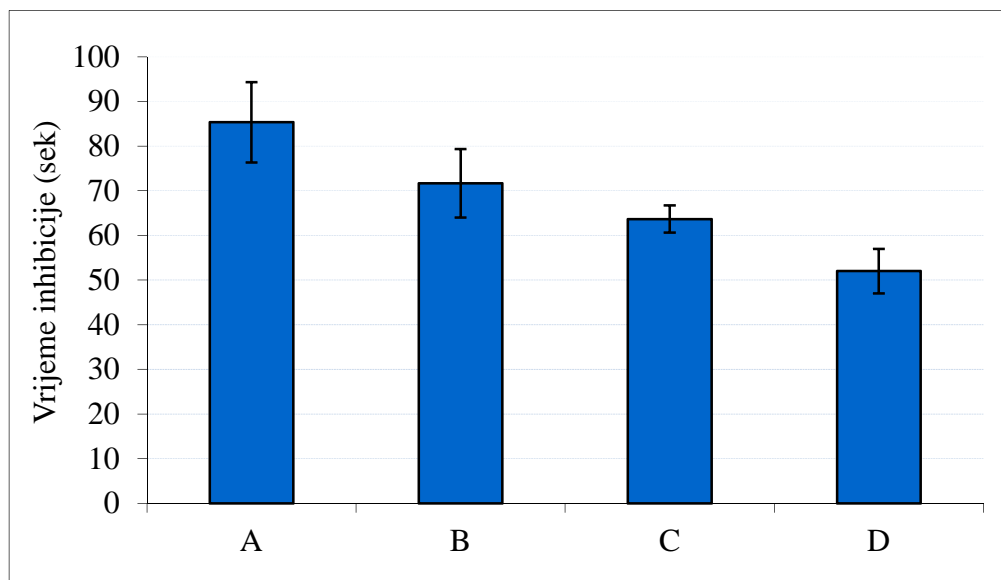
Slika 16. Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih tanina u ekstraktima smeđe alge *Dictyota dichtioma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova

3.4. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

3.4.1. Briggs-Rauscher metoda

Tablica 10. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata smeđe alge *Dictyota dichroma* var. *Intricata* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova Briggs-Rauscher metodom

Oznaka uzorka	Vrijeme inhibicije (sek)
A	85 ± 9
B	71 ± 8
C	64 ± 3
D	52 ± 5

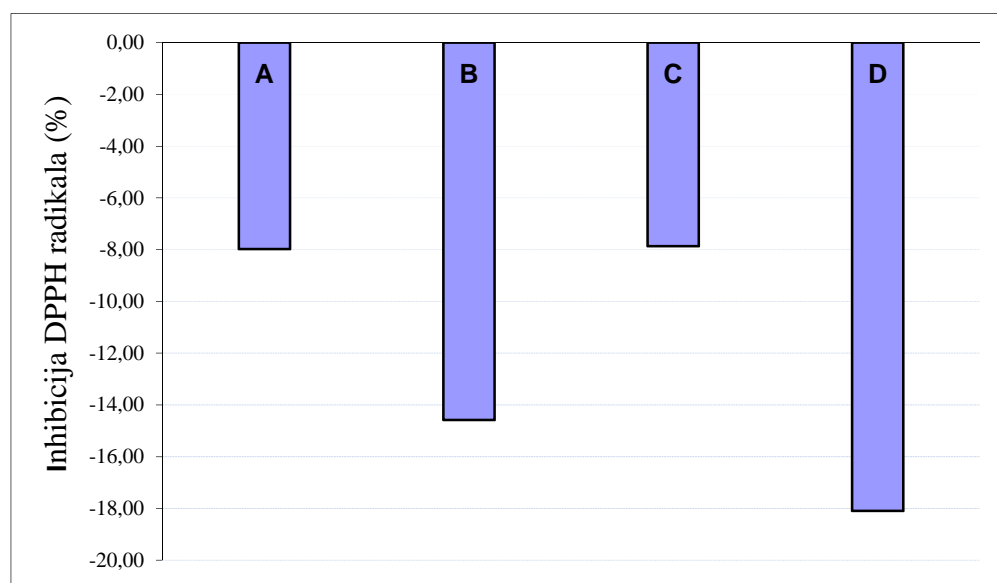


Slika 17. Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta smeđe alge *Dictyota dichroma* var. *Intricata* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova Briggs-Rauscher metodom

3.4.2. DPPH metoda

Tablica 11. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata smeđe alge *Dictyota dichthoma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova DPPH metodom

Oznaka alge	DPPH (% inhibicije)
A	-8 ± 0
B	-15 ± 1
C	-8 ± 0
D	-18 ± 2



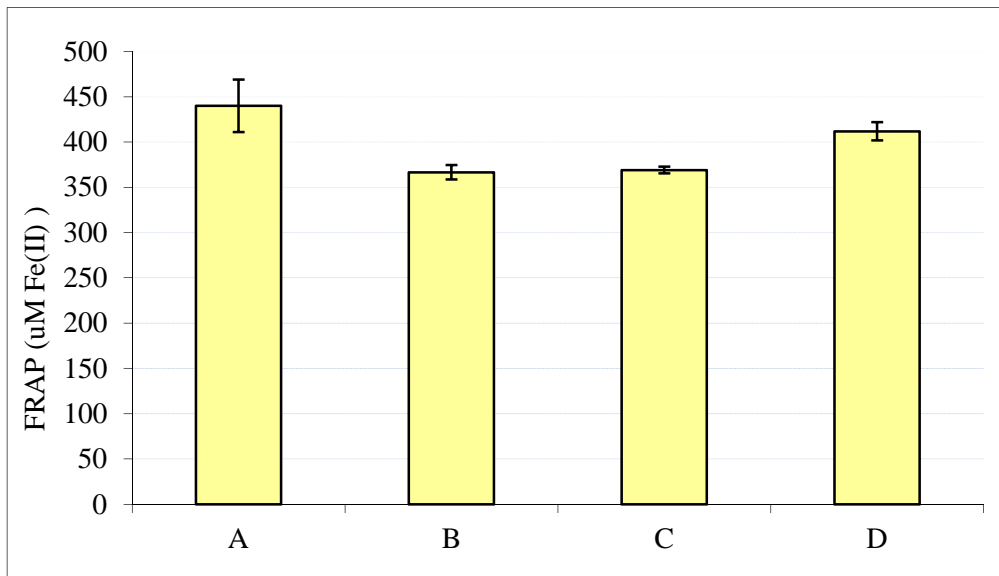
Slika 18. Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta smeđe alge *Dictyota dichthoma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova DPPH metodom

3.4.3. FRAP metoda

Tablica 12. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata smeđe alge *Dictyota dichthoma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova FRAP metodom

Oznaka alge	FRAP $\mu\text{M Fe(II)}$
A	440 ± 29
B	367 ± 8
C	369 ± 4
D	412 ± 10

* $\mu\text{M Fe(II)}$ – mikromoli ekvivalenta Fe(II) iona po 1 L ekstrakta



Slika 19. Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta smeđe alge *Dictyota dichthoma* var. *Intricate* dobivenih primjenom različite snage mikrovalova FRAP metodom

4. RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je pratiti utjecaj parametara ekstrakcije, odnosno u ovom slučaju snage mikrovalova kod mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz jadranske smeđe alge *Dictyota dichthoma* var. *Intricate*. Snage mikrovalova korištene u postupcima ekstrakcije prikazane su u *Tablici 2.* dok su vrijeme ekstrakcije (30 minuta) kao i temperatura ekstrakcije (60°C) bili jednaki u svim postupcima pripreve ekstrakata.

U ekstraktima alge pripremljenim različitim postupcima određena je koncentracija ukupnih fenola, flavonoida, tanina te su im određena antioksidacijska svojstva metodama FRAP, Briggs-Raucher i DPPH.

U *Tablici 7.* te na *Slici 14.* prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola izraženi po mg GAE/L iz kojih se može primijetiti da se koncentracija ukupnih fenola ne razlikuje značajno među uzorcima. Kod postupka ekstrakcije kod kojeg je korištena najniža snaga mikrovalova (150 W) koncentracija fenola je bila najveća te iznosi 115 mg GAE/L, dok je kod postupka kod kojeg je korištena najveća snaga mikrovalova (1000 W) udio fenola bio najniži (102 GAE/L).

U ekstraktima je također određena i koncentracija ukupnih flavonoida koja se izrazila u mg QE/L i kretala se od 24 do 36 mg QE/L. Iz dobivenih rezultata prikazanih u *Tablici 8.* i na *Slici 15.* uočava se da je najviše flavonoida ekstrahirano postupkom kod kojeg je primijenjena snaga mikrovalova 500 W (37 mg QE/L), a najmanje kod primjene snage mikrovalova 250 W. Rezultati određivanja ukupnih tanina pokazali su raspon rezultata od 59 do 74 mg KE/L (prikazani u *Tablici 9.* i *Slici 16.*). Ekstrakti A i C su imali približno jednake vrijednosti koncentracije tanina (74 mg KE/L), dok je ekstrakt D pokazao najnižu vrijednost (59 mg KE/L).

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata Briggs-Rauscher metodom izraženi su u vidu vremena inhibicije reakcije oscilacije u Briggs-Rauscher sustavu (u sekundama). Dobiveni rezultati ukazuju na to da je najniže vrijeme inhibicije pokazao ekstrakt D (52 sekunde) dok je najvišu vrijednost pokazao ekstrakt A (85 sekundi) (*Tablica 10., Slika 17.*). Ono što se može primijetiti iz prikazanih rezultata je da se povećanjem primijenjene snage mikrovalova kod postupka ekstrakcije smanjuje antioksidacijska aktivnost ekstrakata.

Rezultati dobiveni DPPH metodom pokazali su negativne vrijednosti (*Tablica 11., Slika 18.*) što je zapravo pokazatelj prooksidativne aktivnosti testiranih ekstrakata pri čemu najizraženiji negativni utjecaj imao ekstrakt D. Ovi rezultati upućuju na slabu aktivnost spojeva iz ekstrakata u *hvatanju* molekula slobodnih radikala.

Rezultati određivanja antioksidacijske sposobnosti FRAP metodom, izraženi u $\mu\text{M Fe (II)}$ pokazali su najviše vrijednosti za ekstrakt A ($440\mu\text{M Fe (II)}$) a najnižu vrijednost od $367\mu\text{M Fe (II)}$ za ekstrakt B (*Tablica 12., Slika 19.*).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da primjena različite snage mikrovalova kod mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih fenolnih spojeva iz jadranske smeđe alge *Dictyota dichroma* var. *Intricate* nema značajan utjecaj na fenolni profil i antioksidacijska svojstva ekstrakata.

6. LITERATURA

1. McHugh DJ; A guide to seaweed industry. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 2003, ISSN 0429-9345.
2. Priroda hrvatske, <http://prirodahrivatske.com/kameno-dno/>. (PRISTUPLJENO 23.06.2018.)
3. Rezić T, Filipović J, Šantek, B. Microalgae - a potential source of lipids for biodiesel production, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam. 2014;9(1-2):26-36.
4. Cullen JJ, Franks PJS, Karl DM, Longhurst A. Physical influences on marine ecosystem dynamics. In: The sea, 2002; vol 12, chap 8, pp. 297-333.
5. Ross AB, Jones JM, Kubacki ML, Bridgeman T. Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour, Bioresource Technol. 2008;99:6494-6504. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.036>
6. Abbott IA. Seaweeds and their uses. Aquat Bot. 1982;12:389-390.
7. Alternativa za vas, <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/alge> (PRISTUPLJENO 25.06.2018.)
8. Predavanja, Botanika <http://hirc.botanic.hr/botanika/Predavanja/BOTANIKA-MB-06-%20Phaeophyta.pdf> (PRISTUPLJENO 15.06.2018.)
9. MNE-MPA, <http://mne-mpa.org/smede-alge-platamuni/>. (PRISTUPLJENO 01.07.2018.)
10. M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. (PRISTUPLJENO 29.06.2018.)
11. Wild Singapore, <http://www.wildsingapore.com/> (PRISTUPLJENO 02.07.2018.)
12. Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. J Agric Food Chem. 2002;13;50(4):840-5. <https://doi.org/10.1021/jf010908o>
13. Yuan YV, Bone DE, Carrington MF. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. Food Chem. (2005);91:485-494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.039>
14. Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S. Effect of processing conditions on phytochemical constituents of edible Irish seaweed *Himanthalia elongata*. J Food

- Process Pres. 2011;36(4):348-363. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00563.x>
15. 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):1924-35. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1189-2>
 16. Dhara CD, Reddy CRK, Balar N, Suthar P, Gajaria T, Gadhavi DK. Assessment of the nutritive, biochemical, antioxidant and antibacterial potential of eight tropical macro algae along Kachchh coast, India as human food supplements. *J Aquat Food Prod T.* 2017;61-79. <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1396274>
 17. Liu L, Heinrich M, Myers S, Dworjany S.A. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(3):591-619. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.046>
 18. Herrero M, Mendiola JA, Plaza M, Ibañez E. Screening for bioactive compounds from algae. In: Lee JW, Ed. *Advanced biofuels and bioproducts*. New York: Springer Science + Business Media; 2013.
 19. Farasat M, Khavari-Nejad RA, Nabavi SM, Namjooyan F. Antioxidant Activity, Total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian gulf. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(1):163-70.
 20. Kadam SU, Brijesh K, O'Donnell PC. Application of novel extraction technologies for extraction of bioactives from marine algae. *J Agric Food Chem.* 2013;61(20):4667-4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>.
 21. Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* 2013;138:1764-1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
 22. Holdt SL, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol.* 2011;23:543-597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
 23. Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci Tech.* 2011;22:315-326. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
 24. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/phlorotannin> (PRISTUPLJENO 04.07.2018.)

25. Koivikko R. Brown algal phlorotannins: improving and applying chemical methods. Dissertation, University of Turku. 2008.
26. Arnold TM, Targett NM. To grow and defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannins. *Oikos* 2003; 100:406-408. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.11680.x>
27. Struktura floroglucinola <https://cs.wikipedia.org/wiki/Floroglucinol> (PRISTUPLJENO 29.06.2018.)
28. Narayan B, Myashita K, Hosokawa M. Comparative evaluation of fatty acid composition of different Sargassum (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. *J Aqua Food Product Tech.* 2004;13:53-70. https://doi.org/10.1300/J030v13n04_05
29. de Quiros, ARB, Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Perez,A.M., Lopez-Hernandez,J. Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *Eur Food Res Technol.* 2010;231;3:495-498. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1295-6>
30. LeLann K, Connan S, Stiger-Pouvreau V. Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. *Mar Environ Res.* 2012;80,1-11. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.05.011>
31. Terasaki M, Hirose A, Naravan B, Baba Y, Kawagoe C ,Yasui, et al. Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. *J Phycol.* 2009;45,4. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00706.x>
32. Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63(3):605-607. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.605>
33. Shimoda H, Tanaka J, Shan SJ, Maoka T. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(9):1137-45. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01139.x>
34. Hosokawa M, Okada T, Mikami N, Miyashita K. Bio-functions of marine carotenoids. *Food Sci Biotechnolog.* 2009;18(1):1-11. <https://doi.org/10.3390/md903031>

35. Heo JM, Livnat-Levanon N, Taylor EB, Jones KT, Dephoure N, Ring, J, Xie J, et al. Stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol Cell*. 2010;12;40(3):465-80. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.021>
36. Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K, Miyashita K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol Med Rep*. 2009;2:897-902. <https://doi.org/10.3892/mmr00000189>
37. Struktura fukoksantina
<https://sh.wikipedia.org/wiki/Fukoksantin#/media/File:Fucoxanthin.svg>
(PRISTUPLJENO 02.07.2018.).
38. Struktura fukosterola, <https://sh.wikipedia.org/wiki/Fukosterol> (PRISTUPLJENO 02.07.2018).
39. Funaki M, Nishizawa M, Sawaya T, Inoue S, Yamagishi T. Mineral composition in the holdfast of three algae of the genus *Laminaria*. *Fish Sci*. 2001;67:295-300. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00236.x>
40. Batista González AE, Silva, AMO, Vidal-Novoa A Pinto, JR, Manchini DAP, Manchini-Filho J. Analysis of in vitro and in vivo antioxidant properties of hydrophilic fractions from the seaweed *Halimeda monile*. L. *J Food Biochem*. 2012;36:89-197. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00525.x>
41. Ekstrakcija, file:///C:/Users/Asus/Downloads/EKSTRAKCIJA.pdf
(PRISTUPLJENO 25.6.2018.)
42. Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann KL, Pouvreau VS, Fauchon M, Deslandes E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem*. 2009;116:693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>
43. Tierney MS, Smyth TJ, Hayes M, Soler-Vila A, Croft AK, Brunton N. Influence of pressurised liquid extraction and solid–liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *Int J Food Sci Tech*. 2013;48:860-869. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12038>
44. Pregled tehničke literature i dokumentacije, *Kem. Ind*. 2017; 66(1-2):109–112. <https://hrcak.srce.hr/file/201010>
45. Ballard TS, Parameswarakumar M, Kequan Z, O’Keefe S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem*. 2010; 120(4):1185-1192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>

46. Blekić M, Režek-Jambrak A, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol.* 2011;3(1):32-47.
<https://hrcak.srce.hr/file/105563>
47. Ethos X, Microwave Green Extraction of Natural Products, Operater Manual, Milestone, Helping Chemist.
48. Mihajlovski M. Fenolni profil petrovca (*Crithmum maritimum* L.) kroz različite periode vegetacije [završni rad], Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2015 (na hrvatskom jeziku).
49. Bralić D. Lišće citrusa kao izvor biološki aktivnih spojeva [završni rad-diplomski/integralni studij], Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2012 (na hrvatskom jeziku).
50. Julkunen-Titto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willow: Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem.* 1985;33:213-217.
<https://doi.org/10.1021/jf00062a013>
51. Mihajlovski M. Utjecaj perioda branja na fenolni profil i antioksidacijska svojstva petrovca [završni rad], Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2016 (na hrvatskom jeziku).
52. Lončar R. Biološka aktivnost ekstrakta petrovca (*Crithmum maritimum* L.) u različitim periodima vegetacije [završni rad], Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2016 (na hrvatskom jeziku).