

# Karakterizacija odabranih makroalgi Jadranskog mora: isparljivi spojevi, masne kiseline i pigmenti

---

Cikoš, Ana-Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:500681>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ana-Marija Cikoš, mag. ing. techn. aliment.**

**KARAKTERIZACIJA ODABRANIH MAKROALGI  
JADRANSKOG MORA: ISPARLJIVI SPOJEVI, MASNE  
KISELINE I PIGMENTI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Osijek, prosinac, 2021.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam  
Smjer: Prehrambena tehnologija

### Zavod za procesno inženjerstvo

### Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 66.061 : 582.261/.279(262.3)

543.544 : 582.261/.279(262.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Znanstvena grana:** Inženjerstvo

**Tema rada** je prihvaćena na X. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 21. srpnja 2021.

**Voditelj:** *prof. dr. sc. Stela Jokić*

**Suvoditelj:** *prof. dr. sc. Igor Jerković*

### KARAKTERIZACIJA ODABRANIH MAKROALGI JADRANSKOG MORA: ISPARLJIVI SPOJEVI, MASNE KISELINE I PIGMENTI

*Ana-Marija Cikoš, 0113135997*

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je kemijski karakterizirati do sada neistražene makroalge iz Jadranskog mora (smeđa alga *Fucus virsoides*, crvena alga *Amphiroa rigida* i zelena alga *Codium bursa*). Za određivanje profila isparljivih spojeva korištene su različite metode (mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), hidrodestilacija (HD) i ekstrakcija s CO<sub>2</sub> u superkritičnom stanju (ESCO<sub>2</sub>)) koje su provedene na svježim, osušenim na zraku i liofiliziranim uzorcima makroalgi. Dobiveni izolati analizirani su pomoću vezanog sustava plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS). Nadalje, sastav masnih kiselina analiziran je pomoću plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). Iz liofiliziranih uzoraka makroalgi ekstrahirani su i pročišćeni pigmenti primjenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) te ESCO<sub>2</sub> koji su potom identificirani i kvantificirani pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Dodatno, spektrofotometrijskom metodom određene su koncentracije ukupnih klorofila *a* i *b* te karotenoida u frakcijama dobivenim primjenom SPE i u CO<sub>2</sub> ekstraktima. Na temelju dobivenih rezultata uočene su značajne razlike u kemijskom sastavu između različitih vrsta makroalgi. Tijekom određivanja profila isparljivih spojeva utvrđeno je da utjecaj sušenja ima značajnu ulogu na sastav prisutnih spojeva. Također, uočeni su produkti degradacije masnih kiselina i pigmenata koji upućuju na oksidacijske procese tijekom sušenja. Makroalge korištene u ovom istraživanju mogu se smatrati izvorima visokovrijednih ω-3 i ω-6 masnih kiselina koje su bile prisutne u sve tri analizirane makroalge. Rezultati su pokazali da su prisutni karakteristični pigmenti za pojedinu skupinu makroalgi. Za smeđu makroalgu *F. virsoides* fukoksantin je detektiran kao dominantan pigment, u crvenoj algi *A. rigida* klorofil *a* i β-karoten bili su najzastupljeniji, dok je za zelenu algu *C. bursa* utvrđena dominantnost klorofila *b* i astaksantina. Ovo istraživanje značajno doprinosi boljem shvaćanju kemijske bioraznolikosti makroalgi iz Jadranskog mora te njihovom potencijalu za primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i/ili farmaceutskoj industriji.

**Ključne riječi:** *makroalge, Jadransko more, isparljivi spojevi, masne kiseline, pigmenti*

**Rad sadrži:** 119 stranica  
16 slika  
37 tablica  
1 prilog  
299 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i>      | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Marin Roje</i>    | član          |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | član          |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Maja Molnar</i>   | zamjena člana |

**Datum obrane:** 3. prosinca 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Postgraduate University Study-Food Technology and Nutrition

Department of Process Engineering  
Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

UDC: 66.061 : 582.261/.279(262.3)

543.544 : 582.261/.279(262.3)

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Scientific branch:** Engineering

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X. held on July 21, 2021.

**Mentor:** *Stela Jokić, PhD, full prof.*

**Co-mentor:** *Igor Jerković, PhD, full prof.*

### CHARACTERIZATION OF TARGETED MACROALGAE FROM THE ADRIATIC SEA: VOLATILE COMPOUNDS, FATTY ACIDS AND PIGMENTS

*Ana-Marija Cikoš, 0113135997*

**Summary:** The aim of this study was to provide chemical characterization of unexplored macroalgae from the Adriatic Sea; brown alga *Fucus virsoides*, red alga *Amphiroa rigida* and green alga *Codium bursa*. Various methods were used to determine the volatilome profiles of fresh, air-dried and freeze-dried samples, including headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), hydrodistillation (HD) and supercritical CO<sub>2</sub> extraction (ESCO<sub>2</sub>). The obtained isolates were analyzed by coupled gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). Furthermore, the fatty acid content was analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). The pigments were extracted and purified using solid phase extraction (SPE) and ESCO<sub>2</sub> from freeze-dried macroalgal samples. In the obtained purified fractions and CO<sub>2</sub> extracts, the pigments were identified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, the concentrations of total chlorophylls and carotenoids in the obtained SPE fractions and CO<sub>2</sub> extracts were determined by spectrophotometric method. Based on the obtained results, significant differences were observed between different types of macroalgae. During the determination of the profile of volatile compounds, it was found that the influence of air drying plays a significant role on the composition of the present compounds. Also, degradation products of fatty acids and pigments were observed, which indicate oxidation processes during drying. The macroalgae used in this study can be considered as sources of high-value  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids that were present in all three macroalgae. The results showed that characteristic pigments for a particular group of macroalgae were present. Fucoxanthin was detected as the dominant pigment in brown alga *F. virsoides*, chlorophyll *a* and  $\beta$ -carotene were dominant in red alga *A. rigida*, while in green alga *C. bursa* chlorophyll *b* and astaxanthin were present. This research significantly contributes to a better understanding of the chemical biodiversity of macroalgae from the Adriatic Sea and their potential for application in the food, cosmetic and/or pharmaceutical industries.

**Key words:** *macroalgae, Adriatic sea, volatile compounds, fatty acids, pigments*

**Thesis contains:** 119 pages  
16 figures  
37 tables  
1 supplement  
299 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Drago Šubarić</i> , PhD, full prof.      | chair person |
| 2. <i>Marin Roje</i> , PhD, associate prof.    | member       |
| 3. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | member       |
| 4. <i>Maja Molnar</i> , PhD, associate prof.   | stand-in     |

**Defense date:** December 3, 2021

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek.

*Neizmjerne sam zahvalna svojoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić i komentoru prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću na vodstvu, iskrenoj podršci i pomoći te znanju koje su na temelju svog iskustva prenijeli na mene i na taj način mi usadili želju za daljnjim učenjem i usavršavanjem.*

*Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Ivani Flanjak na nesebičnoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada te na svakom dobronamjernom savjetu i podršci.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojem BioLab timu, a najviše svojim kolegicama Mariji Banožić, mag. ing. preh., i Silviji Šafranko, mag. chem., bez čije podrške i iskrenog prijateljstva ovaj put kroz doktorski studij ne bi bio isti.*

*Hvala i svim mojim dragim prijateljima koji su vjerovali i bili uz mene u svim lijepim i onim malo manje lijepim trenucima.*

*Ipak, najveće hvala zaslužuje moja obitelj koja je od samog početka mog školovanja bila najveći oslonac te svojom ljubavlju učinila dane dokorskog studija lakšim i ljepšim. Posebno se zahvaljujem i svojem dečku na razumijevanju, strpljenju i iskrenoj podršci.*



**BIOPROSPECTING  
JADRANSKOG MORA**

Projekt sufinancira Europska unija iz  
Europskog fonda za regionalni razvoj



Republika Hrvatska  
Ministarstvo znanosti i  
obrazovanja



Europska unija  
Zajedno do boljih EU



Republika Hrvatska  
Ministarstvo regionalnoga razvoja  
i fondova Europske unije



**EUROPSKI STRUKTURNI  
I INVESTICIJSKI FONDOVI**



Operativni program  
**KONKURENTNOST  
I KOHEZIJA**

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



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
2.1. MAKROALGE .....	5
2.1.1. Primjena makroalgi u prehrambenoj industriji .....	5
2.1.2. Primjena makroalgi u kozmetičkoj industriji .....	7
2.1.3. Primjena makroalgi u farmaceutskoj industriji .....	8
2.2. ROD <i>Fucus</i> .....	10
2.2.1. Morfološke i fiziološke karakteristike roda <i>Fucus</i> .....	10
2.2.2. Kemijski profili različitih vrsta roda <i>Fucus</i> .....	11
2.3. ROD <i>Amphiroa</i> .....	15
2.3.1. Morfološke i fiziološke karakteristike roda <i>Amphiroa</i> .....	15
2.3.2. Kemijski profili različitih vrsta roda <i>Amphiroa</i> .....	17
2.4. ROD <i>Codium</i> .....	20
2.4.1. Morfološke i fiziološke karakteristike roda <i>Codium</i> .....	20
2.4.2. Kemijski profili različitih vrsta roda <i>Codium</i> .....	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>26</b>
3.1. ZADATAK .....	27
3.2. MATERIJALI .....	28
3.2.1. <i>Fucus virsoides</i> .....	28
3.2.2. <i>Amphiroa rigida</i> .....	28
3.2.3. <i>Codium bursa</i> .....	29
3.2.4. Kemikalije i standardi .....	29
3.3. METODE .....	30
3.3.1. Priprema uzoraka makroalgi .....	30
3.3.2. Izolacija isparljivih spojeva iz odabranih vrsta makroalgi .....	31
3.3.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) .....	31
3.3.2.2. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u (HD) .....	32
3.3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida metodom po Folch-u .....	33
3.3.4. Ekstrakcija pigmenata iz odabranih vrsta makroalgi pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) .....	33
3.3.5. Ekstrakcija isparljivih spojeva i pigmenata iz makroalgi pomoću CO <sub>2</sub> u superkritičnom stanju (ESCO <sub>2</sub> ) .....	34
3.3.6. Identifikacija isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS) .....	35

3.3.7. Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID).....	36
3.3.8. Određivanje pigmenata u ekstraktima makroalgi.....	37
3.3.8.1. Identifikacija i kvantifikacija pigmenata primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....	37
3.3.8.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupne koncentracije klorofila <i>a</i> , klorofila <i>b</i> i karotenoida .....	39
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
4.1. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA SMEDOJ ALGI <i>Fucus virsoides</i> .....	41
4.1.1. GC-MS analiza isparljivih spojeva vršnih para izoliranih koristeći HS-SPME.....	41
4.1.2. GC-MS analiza isparljivih spojeva izoliranih koristeći HD .....	42
4.1.3. GC-MS analiza isparljivih spojeva ekstrahiranih pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	44
4.1.4. GC-FID analiza sastava masnih kiselina .....	45
4.1.5. HPLC analiza pigmenata .....	46
4.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata.....	46
4.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA CRVENOJ ALGI <i>Amphiroa rigida</i> ..	47
4.2.1. GC-MS analiza isparljivih spojeva vršnih para izoliranih koristeći HS-SPME.....	47
4.2.2. GC-MS analiza isparljivih spojeva izoliranih koristeći HD .....	48
4.2.3. GC-MS analiza isparljivih spojeva ekstrahiranih pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	51
4.2.4. GC-FID analiza sastava masnih kiselina .....	52
4.2.5. HPLC analiza pigmenata .....	52
4.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata.....	53
4.3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA ZELENOJ ALGI <i>Codium bursa</i> .....	54
4.3.1. GC-MS analiza isparljivih spojeva vršnih para izoliranih koristeći HS-SPME.....	54
4.3.2. GC-MS analiza isparljivih spojeva izoliranih koristeći HD .....	56
4.3.3. GC-MS analiza isparljivih spojeva ekstrahiranih pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	57
4.3.4. GC-FID analiza sastava masnih kiselina .....	57
4.3.5. HPLC analiza pigmenata .....	58
4.3.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata.....	58
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>59</b>
5.1. KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA SMEDE ALGE <i>Fucus virsoides</i> .....	60
5.1.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani koristeći HS-SPME .....	60
5.1.2. Isparljivi spojevi izolirani koristeći HD .....	61
5.1.3. Isparljivi spojevi ekstrahirani pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	62
5.1.4. Sastav masnih kiselina.....	63
5.1.5. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SPE .....	64
5.1.6. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	65
5.2. KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA CRVENE ALGE <i>Amphiroa rigida</i> .....	66
5.2.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani koristeći HS-SPME .....	66

5.2.2. Ispaljivi spojevi izolirani koristeći HD.....	69
5.2.3. Ispaljivi spojevi ekstrahirani pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	70
5.2.4. Sastav masnih kiselina.....	71
5.2.5. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SPE .....	72
5.2.6. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	74
<b>5.3 KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ZELENE ALGE <i>Codium bursa</i> .....</b>	<b>75</b>
5.3.1. Ispaljivi spojevi vršnih para izolirani koristeći HS-SPME .....	75
5.3.2. Ispaljivi spojevi izolirani koristeći HD .....	76
5.3.3. Ispaljivi spojevi ekstrahirani pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	77
5.3.4. Sastav masnih kiselina.....	77
5.3.5. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SPE .....	78
5.3.6. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SC-CO <sub>2</sub> .....	79
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>81</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>84</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>112</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

A.	<i>Amphiroa</i>	
C.	<i>Codium</i>	
CO <sub>2</sub>	ugljikov dioksid (engl. <i>carbon dioxide</i> )	
C4:0	maslačna kiselina (engl. <i>butyric acid</i> )	
C6:0	kapronska kiselina (engl. <i>caproic acid</i> )	
C10:0	kaprinska kiselina (engl. <i>capric acid</i> )	
C12:0	laurinska kiselina (engl. <i>lauric acid</i> )	
C14:0	miristinska kiselina (engl. <i>myristic acid</i> )	
C15:0	pentadekanska kiselina (engl. <i>pentadecanoic acid</i> )	
C16:0	palmitinska kiselina (engl. <i>palmitic acid</i> )	
C17:0	heptadekanska kiselina (engl. <i>heptadecanoic acid</i> )	
C18:0	stearinska kiselina (engl. <i>stearic acid</i> )	
C20:0	arahidska kiselina (engl. <i>arachidic acid</i> )	
C22:0	behenska kiselina (engl. <i>behenic acid</i> )	
C24:0	lignocerinska kiselina (engl. <i>lignoceric acid</i> )	
C14:1	miristoleinska kiselina (engl. <i>myristoleic acid</i> )	
C15:1	<i>cis</i> -10-pentadekanska kiselina (engl. <i>cis-10-pentadecenoic acid</i> )	
C16:1	palmitoleinska kiselina (engl. <i>palmitoleic acid</i> )	
C17:1	<i>cis</i> -10-heptadekanska kiselina (engl. <i>cis-10-heptadecenoic acid</i> )	
C18:1n9c	oleinska kiselina (engl. <i>oleic acid</i> )	
C18:1n9t	elaidična kiselina (engl. <i>elaidic acid</i> )	
C20:1n9	<i>cis</i> -11-eikosenska kiselina (engl. <i>cis-11-eicosenoic acid</i> )	
C22:1n9	eručna kiselina (engl. <i>erucic acid</i> )	
C16:2	heksadekadienska kiselina (engl. <i>hexadecadienoic acid</i> )	
C18:2n6c	<i>cis</i> -linolna kiselina (engl. <i>cis-linoleic acid</i> )	
C18:2n6t	<i>trans</i> -linolna kiselina (engl. <i>trans-linoleic acid</i> )	
C20:2n6	eikosadienska kiselina (engl. <i>eicosadienoic acid</i> )	
C22:2	dokosadienska kiselina (engl. <i>docosadienoic acid</i> )	
C16:3	heksadekatrienska kiselina (engl. <i>hexadecatrienoic acid</i> )	
C18:3n6	γ-linolenska kiselina (engl. <i>γ-linolenic acid</i> )	
C18:3n3	α-linolenska kiselina (engl. <i>α-linolenic acid</i> )	
C20:3n6	eikosatrienska kiselina (engl. <i>eicosatrienoic acid</i> )	
C16:4	heksadekatetraenska kiselina (engl. <i>hexadecatetraenoic acid</i> )	
C18:4n3	stearidonska kiselina (engl. <i>stearidonic acid</i> )	
C20:4n6	arahidonska kiselina (engl. <i>arachidonic acid</i> )	
C22:4	dokosatetraenska kiselina (engl. <i>docosatetraenoic acid</i> )	
C20:5n3	eikosapentaenska kiselina (engl. <i>eicosapentaenoic acid</i> )	
C22:5	dokosapentaenska kiselina (engl. <i>docosapentaenoic acid</i> )	
C22:6n3	dokosaheksaenska kiselina (engl. <i>docosahexaenoic acid</i> )	
DMS	dimetil-sulfid (engl. <i>dimethyl sulfide</i> )	
DMSP	dimetilsulfoniopropionat (engl. <i>dimethylsulfoniopropionate</i> )	
DVB/CAR/PDMS	divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan <i>divinylbenzene/carboxene/polydimethylsiloxane</i>	(engl.)
ESCO <sub>2</sub>	ekstrakcija s CO <sub>2</sub> u superkričnom stanju (engl. <i>supercritical CO<sub>2</sub> Extraction</i> )	
ESI-MS	elektrosprej ionizacijska masena spektrometrija (engl. <i>electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> )	
F.	<i>Fucus</i>	
FAME	metilni esteri masnih kiselina (engl. <i>fatty acid methyl esters</i> )	
GC	plinska kromatografija (engl. <i>gas chromatography</i> )	
GC-FID	plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. <i>gas chromatography with flame ionization detector</i> )	

GC-MS	plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> )
HD	hidrodestilacija (engl. <i>hydrodistillation</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HS-SPME	mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. <i>headspace solid-phase microextraction</i> )
LC-MS	tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> )
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PDMS/DVB	polidimetilsiloksan/divinilbenzen (engl. <i>polydimethylsiloxane/divinylbenzene</i> )
PTFE	politetrafluoroetilen (engl. <i>polytetrafluoroethylene</i> )
PUFAs	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
RI	indeksi zadržavanja (engl. <i>retention index</i> )
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SC-CO <sub>2</sub>	superkritični CO <sub>2</sub> (engl. <i>supercritical CO<sub>2</sub></i> )
SD	standardna devijacija (engl. <i>standard deviation</i> )
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid-phase extraction</i> )
SPME	mikroekstrakcija na krutoj fazi (engl. <i>solid-phase microextraction</i> )
SV	srednja vrijednost (engl. <i>average</i> )
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i> )
UHPLC-DAD-ESI-MS	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda i elektrosprej ionizacijskom masenom spektrometrijom (engl. <i>ultrahigh performance liquid chromatography-diode array detector with electrospray ionization mass spectrometry</i> )
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i> )
UV / VIS	ultraljubičasto/vidljivo (engl. <i>ultraviolet-visible</i> )
v/v	volumni udio (engl. <i>volume per volume</i> )

## **1. UVOD**

Makroalge su od davnina poznate po pozitivnom učinku na ljudsko zdravlje, a u zadnje vrijeme privlače sve veću pozornost znanstvenika zbog svoje jedinstvene biološke i kemijske raznolikosti (Michalak i Chojnacka, 2018). Dijele se na tri skupine s obzirom na boju talusa; zelene (Chlorophyta), crvene (Rhodophyta) i smeđe (Ochrophyta) makroalge (Haryatfrehni i sur., 2015). Tijekom rasta i prilagodbe na ekstremne uvjete okoliša (temperaturne oscilacije, salinitet, ultraljubičasto (UV) zračenje, polutanti), makroalge imaju sposobnost biosinteze različitih prirodnih organskih spojeva, među kojima su isparljivi organski spojevi, pigmenti (klorofili, karotenoidi), polinezasićene masne kiseline (PUFAs) te drugi spojevi poput polifenola, vitamina, minerala i polisaharida (Mahadevan, 2015). Ovisno o prisutnim spojevima makroalge posjeduju različita biološka svojstva, poput antioksidacijskih (Ceron i sur., 2007; Sachindra i sur., 2007), antitumorskih (Kavalappa i sur., 2019) i antibakterijskih (Karpinski i Adamczak, 2019). Iz navedenih razloga, makroalge imaju potencijal primjene u različitim sektorima prehrambene, kozmetičke i/ili farmaceutske industrije (Mahadevan, 2015; Bueno i sur., 2017; Ganesan i sur., 2019)

Isparljivi spojevi služe za kemijsku komunikaciju i djeluju kao inhibitori bakterija i gljivica (Santos Leite Neta i Narain, 2018). Njihova koncentracija i sastav ovise o vrsti makroalge, geografskoj lokaciji, klimi, godišnjem dobu i stadiju razvoja makroalge (Niemczyk i sur., 2018). Pojedini isparljivi spojevi nastaju iz masnih kiselina pomoću enzimskih reakcija (Le Pape i sur., 2004), a mogu nastati i enzimskom ili neenzimskom razgradnjom karotenoida i klorofila (Ishida i Bartley, 2005). Nezasaćene masne kiseline su ishodni spojevi za nastanak aldehida (Boonprab i sur., 2006; Akakabe i sur., 2003), alifatskih alkohola (Tanchotikul i Hsieh, 1989) te ugljikovodika s različitim brojem ugljikovih atoma (Hombeck i Boland, 1998). Razgradnjom karotenoida nastaju kratkolančani oksidirani spojevi (Silva Ferreira i sur., 2008), dok razgradni produkti klorofila nastaju najčešće fotooksidacijom od kojih je najpoznatiji fitol (Rontani i sur., 2003).

Makroalge sadrže visoke udjele nezasićenih masnih kiselina što ih čini važnima za ljudsko zdravlje budući da PUFAs imaju značajnu ulogu u očuvanju kardiovaskularnog sustava te protuupalno djelovanje (Galloway i sur., 2012). Najzastupljenije PUFAs u crvenim i smeđim makroalgama su eikosapentaenska kiselina ( $\omega$ -3) te arahidonska kiselina ( $\omega$ -6), dok zelene makroalge većinom sadrže linolnu ( $\omega$ -6) kiselinu i  $\alpha$ -linolensku ( $\omega$ -3) kiselinu (Pereira i sur., 2012a). Nadalje, karotenoidi prisutni u makroalgama imaju različite primjene od kojih se izdvaja primjena u prehrambenoj industriji te se koriste kao antioksidansi, posebice  $\beta$ -karoten i fukoksantin (Foo i sur., 2017; Sangeetha i sur., 2009). Karotenoidi su pomoćni pigmenti jer služe za prenošenje energije sunčeva zračenja do klorofila te štite stanice od fotooksidacijskog oštećenja, a dijele se na dvije skupine; karoteni i ksantofili (Zhang i sur., 2020). Pomoćni pigmenti su i klorofili *b*, *c* i *d*, dok je klorofil *a* odgovoran za fotosintezu. Budući da su klorofili

izuzetno osjetljivi na svjetlost, moguć je nastanak njihovih derivata i tijekom ekstrakcije. Feofitin *a* je jedan od najzastupljenijih derivata klorofila *a* koji je pronađen u makroalgama, a poznato je da je odgovoran za antioksidacijska svojstva makroalgi (Kuczynska i sur., 2015).

Kao rezultat velike razlike u kemijskim strukturama spojeva prisutnih u makroalgama, važno je pronaći najučinkovitiju metodu ekstrakcije isparljivih spojeva, ali i njihovih ishodnih spojeva, masnih kiselina i pigmenata. Kombinacijom različitih metoda moguće je utvrditi relevantne kemijske profile, ali isto tako i specifične ili nespecifične kemijske markere biološkog podrijetla. Korištenjem kombinacije mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), hidrodestilacije (HD) i ekstrakcije s CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju (ESCO<sub>2</sub>) moguće je dobiti kemijski profil najisparljivih spojeva, srednje isparljivih spojeva te onih najteže isparljivih. Nadalje, za ekstrakciju ukupnih lipida iz makroalgi većinom se koriste poznate konvencionalne tehnike ekstrakcije, poput metode po Folch-u te Soxhlet-u. Kako bi se povećalo iskorištenje ciljanih spojeva u ekstraktima, razvijena je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi kojoj je primarna uloga pročišćavanje i koncentriranje ciljanih spojeva iz uzoraka pri čemu se povećava selektivnost ekstrakcije. Svaka od navedenih metoda ekstrakcije ima svoje prednosti i nedostatke, stoga je važno ispitati različite metode, ali i procesne parametre pojedinog postupka ekstrakcije kako bi se dobio uvid o njihovom utjecaju na iskorištenje ciljanih spojeva u dobivenim ekstraktima.

Iako su bogatstvo i raznolikost morskih sustava dobro poznati, njihova dostupnost i iskorištavanje u Hrvatskoj do sada je bilo vrlo ograničeno. S obzirom na biološku i kemijsku raznolikost makroalgi prisutnih u Jadranskom moru, iznimno je važno utvrditi njihov potencijal za primjenu u različitim područjima. Tijekom doktorske disertacije istražile su se do sada neistražene vrste makroalgi Jadranskog mora što pridonosi boljem shvaćanju njihove kemijske bioraznolikosti i moguće daljnje primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj i/ili farmaceutskoj industriji. Dobiveni su novi kemijski profili, uključujući isparljive spojeve, masne kiseline i pigmenti iz tri različite makroalge; smeđe alge *Fucus virsoides*, crvene alge *Amphiroa rigida* i zelene alge *Codium bursa*.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. MAKROALGE

Makroalge se ističu kao izvor prirodnih spojeva s vrijednim nutritivnim, kozmetičkim i farmaceutskim potencijalom, no i dalje se smatraju nedovoljno iskorištenim izvorom (Wijesekara i sur., 2012). Konstatno su izložene različitim ekstremnim uvjetima koji utječu na njihov kemijski sastav i dovode do stvaranja različitih organskih spojeva koji imaju zaštitno djelovanje (Stengel i Connan, 2015). Na prisutnost sekundarnih metabolita također utječe i sama vrsta makroalge, sezonske varijacije, područje uzgoja i zemljopisno podrijetlo (Niemczyk i sur., 2018). Prema svojoj kemijskoj strukturi i sastavu pigmentata, makroalge se dijele u tri skupine; smeđe (Ochrophyta), crvene (Rhodophyta) i zelene makroalge (Chlorophyta) (Guiry i Guiry, 2021). Smeđe makroalge najvažnije su za primjenu u industriji zbog svog ekološkog i ekonomskog potencijala. Prema dostupnim podacima poznato je da smeđe makroalge s 59 % zauzimaju najveći udio u proizvodnji od ukupne proizvodnje makroalgi, nakon toga slijede crvene alge s 40 % te zelene s manje od 1 % (Wang i sur., 2015).

Dostupno je nekoliko preglednih radova o primjeni makroalgi u prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima. Najzastupljeniji su radovi koji ističu primjenu makroalgi u prehrambenim proizvodima i njihovom utjecaju na fizikalno-kemijska svojstva prehrambenih proizvoda (Holdt i Kraan, 2011; Bocanegra i sur., 2009; Roohinejad i sur., 2016). U posljednje se vrijeme javila veća zainteresiranost za primjenu makroalgi u kozmetičkoj industriji jer je dokazano da komponente izolirane iz makroalgi posjeduju antioksidacijsko, antimikrobno i protuupalno djelovanje te djeluju protiv starenja i hiperpigmentacije, a u usporedbi sa sintetičkim komponentama one nemaju nepoželjna djelovanja na koži (Thiyagarasaiyar i sur., 2020). Međutim, mehanizmi bioaktivnog djelovanja komponenti iz makroalgi još uvijek nisu u potpunosti poznati tako da su potrebna daljnja istraživanja.

### 2.1.1. Primjena makroalgi u prehrambenoj industriji

Makroalge se još od početka 19. stoljeća koriste u svakodnevnoj prehrani i tradicionalnoj medicini u azijskim zemljama. Za svakodnevnu konzumaciju koriste se kao začini ili povrće u juhama te s rižom i reznacima (Zeneveld, 1995; Samaraweera i sur., 2012).

Iako konzumacija makroalgi u Europi nije toliko česta kao u Aziji, ipak su privukle pozornost zbog biološki aktivnih spojeva te ih se smatra superhranom (Cofrades i sur., 2016). Istraživanja su pokazala da makroalge sadrže veći udio vlakana od nekih kopnenih biljaka, a poznato je da konzumacija prehrambenih vlakana potiče rast korisnih crijevnih bakterija, smanjuje rizik od dijabetesa, pretilosti i povišenog kolesterola (Holdt i Kraan, 2011; Bocanegra i sur., 2009). Nadalje, makroalge sadrže visoke koncentracije proteina, poput graška i graha, što znači da se mogu koristiti kao alternativa trenutnim biljnim izvorima bjelancevina (Rodrigues i sur.,

2015). Iako je u makroalgama prisutna mala količina ukupnih lipida, njihov kvalitativni profil posebno je zanimljiv s nutricionističkog gledišta upravo zbog prisustva  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina, pri čemu se izdvajaju eikosapentaenska i dokosaheksaenska kiselina (Dawczynski i sur., 2007; Rodrigues i sur., 2015). Karakteristično za zelene alge je bogatstvo C18 masnih kiselina među kojima su najzastupljenije oleinska, linolna i  $\alpha$ -linolenska kiselina, dok su crvene alge poznate po visokim udjelima C20 masnih kiselina poput arahidonske i eikosapentaenske kiseline, a smeđe alge posjeduju podjednake udjele C18 i C20 masnih kiselina (Kumari i sur., 2013). Uvrštavanjem makroalgi u svakodnevnu prehranu moguće je ostvariti blagotvorne učinke na zdravlje upravo zbog bioloških svojstava koje posjeduju (Khan i sur., 2007; Plaza i sur., 2008)

Polisaharidi izolirani iz makroalgi najčešće se primjenjuju u prehrambenim proizvodima zbog sposobnosti vezanja vode, geliranja te stvaranja emulzija i pjena. Upravo takva svojstva čine makroalge vrijednim aditivima u ulozi stabilizatora i sredstava za zgušnjavanje. Najčešći polisaharidi koji se primjenjuju u prehrambenim proizvodima su alginat, karagenan i agar (Menon, 2012). Alginat je polisaharid koji se najviše koristi, a izolira se iz staničnih stjenki smeđih makroalgi. Primjenjuje se zbog različitih svojstava, a ponajviše zbog mogućnosti stvaranja gume, povećava viskoznost proizvoda te djeluje kao emulgator. Do sada je primjenu našao u proizvodnji sladoleda kao stabilizator, u pivu i bezalkoholnim pićima za proizvodnju pjene (Sartal i sur., 2012) te u pojedinim mesnim proizvodima (Cofrades i sur., 2012). Šifra aditiva za hranu ovisi o soli alginske kiseline: natrijev alginat E-401, kalijev alginat E-402, amonijev alginat E-403, kalcijev alginat E-404 i propilen glikol alginat E-405 (Sartal i sur., 2012). Karagenan se izolira iz crvenih makroalgi te ima različita svojstva u prehrambenim proizvodima s obzirom na kopolimer koji se primjenjuje. Najčešće se koristi kao sredstvo za želiranje, stabiliziranje i zgušnjavanje u mliječnim proizvodima poput sladoleda, jogurta, sira i mlijeka. U mesnim prerađevinama koristi se za proizvodnju proizvoda smanjenog postotka masti. Šifra aditiva za hranu je E-407 (Sartal i sur., 2012). Agar se, isto kao karagenan, izolira iz crvenih makroalgi, a prednost njegove primjene je u visokom talištu zbog čega su takvi proizvodi prikladni za skladištenje na sobnim temperaturama. Djeluje kao zgušnjivač u punjenju pita i sladoleda te kao stabilizator u mliječnim proizvodima. Primjenjuje se i za bistrenje vina i za pripremu proizvoda s niskim udjelom masti. Ima sposobnost sprječavanja kristalizacije što je razlog njegove primjene za pripremu glazura i u pekarstvu. Šifra aditiva za hranu je E-406 (Sartal i sur., 2012).

Osim polisaharida, utvrđeno je da se  $\omega$ -3 masne kiseline iz makroalgi mogu koristiti kao funkcionalni sastojak u različitim proizvodima poput hrane za dojenčad (Jensen i sur., 2005), zdravijih varijanti grickalica (Arterburn i sur., 2007) te u sladoledima (Chee i sur., 2007). Nadalje, nađena je primjena makroalgi u mliječnim proizvodima (Lalić i sur., 2005) i u mesnim

prerađevinama gdje služe kao zamjena za sol i mast (Cofrades i sur., 2012). Najznačajnije primjene makroalgi u prehrambenim proizvodima prikazane su u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Primjena makroalgi u prehrambenim proizvodima

Prehrambeni proizvod	Izolirani spoj/ekstrakt iz makroalgi	Literaturna referenca
sladoled	alginat	Turquoise i Gloria, 2000
	$\omega$ -3 masne kiseline	Chee i sur., 2007
kruh	karagenan, alginat	Guarda i sur., 2004
mesni proizvodi	prah različitih vrsta makroalgi	Cofrades i sur., 2016
zrnati sir	prah smeđe makroalge	Lalić i Berković, 2005
hrana za dojenčad	dokosaheksaenska kiselina	Jensen i sur., 2005
tjestenina	prah smeđe makroalge	Prabhasankar i sur., 2009a, 2009b
grickalice	dokosaheksaenska kiselina	Arterburn i sur., 2007

### 2.1.2. Primjena makroalgi u kozmetičkoj industriji

Tijekom zadnjih nekoliko godina teži se za kozmetičkim proizvodima koji sadrže biološki aktivne spojeve izolirane iz prirodnih izvora, među kojima se nalaze i makroalge. Temeljem toga, nekoliko znanstvenika naglasilo je važnost njihove primjene u kozmeceuticima koji predstavljaju proizvode s terapijskim učinkom na zdravlje kože, a prema svom djelovanju se nalaze u prijelaznoj kategoriji između lijekova i kozmetike (Dureja i sur., 2005). Poznati kozmeceutici sadrže spojeve koji štite kožu od štetnih učinaka UV zračenja i oksidacijskog stresa. Zbog svog kemijskog sastava, ekstrakti algi često se koriste kao stabilizatori i emulgatori ili kao sastojci s terapijskim učinkom (Agatonović-Kustrin i Morton, 2013). Primjena makroalgi koje posjeduju različita biološka djelovanja značajna za kozmetičku industriju ukratko je prikazana u **Tablici 2**.

Makroalge sintetiziraju spojeve za zaštitu od reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i slobodnih radikala, uključujući polifenole i karotenoide koji mogu upijati UV zračenje te time suzbijati starenje kože (Bedoux i sur., 2014). Heo i Jeon (2009) istražili su i potvrdili zaštitni učinak fukoksantina izoliranog iz smeđe makroalge *Sargassum siliquastrum* na oštećenje stanica izazvano UV-B zračenjem u ljudskom fibroblastu.

Proizvodi protiv starenja (*anti-age*) koriste se za poboljšanje kože izložene vanjskim čimbenicima kao što su uvjeti okoliša, izloženost UV zračenju i pušenju (Ariede i sur., 2017). Slobodni radikali uzrokuju razgradnju kolagena i drugih vitalnih funkcija kože što uzrokuje bore. Budući da su makroalge važan izvor aminokiselina, njihovih derivata i proteina, one imaju

sposobnost poticanja proizvodnje kolagena u koži (Bedoux i sur., 2014). Specifična skupina polifenola koja se nalazi samo u smeđim makroalgama, florotanini, pokazuje antioksidacijsko djelovanje što ih čini pogodnima za primjenu u anti-age proizvodima (Ariede i sur., 2017). Fujimura i sur. (2001) istraživali su učinak primjene gela koji sadrži 1 % ekstrakta smeđe makroalge *F. vesiculosus*. Rezultati su pokazali značajno poboljšanje elastičnosti kože što ukazuje na to da navedena alga posjeduje anti-age svojstva.

**Tablica 2** Primjena makroalgi u kozmetičkim proizvodima

Kozmetički proizvod	Vrsta makroalge	Literaturna referenca
proizvodi za zaštitu od sunčevog zračenja	<i>Porphyra</i> sp.	Conde i sur., 2000; Figueroa i sur., 2003
	<i>Sargassum siliquastrum</i>	Heo i Jeon, 2009
proizvodi protiv starenja	<i>F. vesiculosus</i>	Fujimura i sur., 2001; Sun i Chavan, 2017
proizvodi za sprječavanje celulita	<i>Ecklonia cava</i>	Ko i sur., 2013
	<i>Furcellaria lumbricalis</i> , <i>F. vesiculosus</i>	Al-Bader i sur., 2012
proizvodi za hidrataciju	<i>Saccharina japonica</i>	Wang i sur., 2013
proizvodi za sprječavanje hiperpigmentacije	<i>Ecklonia cava</i>	Heo i sur., 2009
	<i>Sargassum polycystum</i>	Chan i sur., 2011

Makroalge se koriste i u proizvodima za smanjenje celulita, a posebno se izdvaja florotanin diekol izoliran iz smeđe makroalge *Ecklonia cava* koji je pokazao najveći potencijal za inhibiciju adipogeneze koja je usko povezana s pretilosti (Ko i sur., 2013). Al-Bader i sur. (2012) koristili su smjesu smeđih makroalgi, *Furcellaria lumbricalis* i *F. vesiculosus*, te su primijetili sinergijski učinak aktivnih sastojaka na poboljšanje mehanizama lipolize i stimulaciju proizvodnje prokolagena I. Osim u anti-celulitnim proizvodima, diekol iz *Ecklonia cava* se može primijeniti i u proizvodima za sprječavanje hiperpigmentacije jer utječe na inhibiciju tirozinaze koja je uključena u sintezu melanina (Heo i sur., 2009).

Zbog prisutnosti polisaharida u makroalgama, one se mogu primijeniti u proizvodima za hidrataciju upravo zbog kapaciteta polisaharida za čuvanje vode čime bi se poboljšala barijerna funkcija kože i spriječio nastanak suhoće (Bedoux i sur., 2014). Wang i sur. (2013) pokazali su da niskomolekularni polisaharidi ekstrahirani iz smeđih makroalgi pokazuju veću sposobnost apsorpcije i zadržavanja vlage u usporedbi s hijaluronskom kiselinom.

### 2.1.3. Primjena makroalgi u farmaceutskoj industriji

Različita istraživanja pokazala su izuzetan potencijal polisaharida i florotanina izoliranih iz makroalgi za primjenu u farmaceutskoj industriji upravo zbog različitih bioaktivnih djelovanja. Najznačajnija djelovanja polisaharida i florotanina navedena su u **Tablici 3**.

**Tablica 3** Potencijalna primjena makroalgi u farmaceutskoj industriji na temelju bioaktivnosti

Bioaktivnost	Spoj/evi	Vrsta makroalge	Literaturna referenca
antioksidacijska aktivnost	florotanini	<i>Ecklonia cava</i>	Ahn i sur., 2007
	florotanini	<i>Cystoseira nodicaulis</i> , <i>Cystoseira usneoides</i> , <i>Cystoseira tamariscifolia</i> , <i>F. spiralis</i>	Ferreres i sur., 2012
antikancerogena aktivnost	polisaharidi	<i>Sargassum swartzii</i> , <i>Sargassum polycystum</i> , <i>Sargassum oligocystum</i> , <i>Sargassum mcclurei</i>	Ly i sur., 2005
	florotanini	<i>Ecklonia cava</i>	Kong i sur., 2009
antivirusna aktivnost	polisaharidi	<i>Himanthalia elongata</i>	Santoyo i sur., 2011
antimikrobna aktivnost	polifenoli	<i>Cystoseira abies-marina</i> , <i>Porphyra</i> spp., <i>Sargassum vulgare</i> , <i>Sargassum muticum</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> , <i>Halopitys incurvus</i>	Plaza i sur., 2010
	fukoksantin	<i>Saccharina japonica</i> , <i>Sargassum horneri</i>	Sivagnanam i sur., 2015
neuroprotektivno djelovanje	florotanini	<i>Ecklonia cava</i>	Cho i sur., 2012
antialergijsko djelovanje	florotanini	<i>F. guiryi</i> , <i>F. serratus</i> , <i>F. spiralis</i> , <i>F. vesiculosus</i>	Barbosa i sur., 2018
	florotanini	<i>Ecklonia cava</i>	Li i sur., 2008
hipoglikemijsko djelovanje	polisaharidi	<i>F. vesiculosus</i>	Shan i sur., 2016
		<i>Sargassum thunbergii</i>	Ren i sur., 2017
	florotanini	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Iwai, 2008
hepatoprotektivno djelovanje	florotanini	<i>Ecklonia stolonifera</i> , <i>Sargassum</i> sp.	Kim i sur., 2005

Najviše se ističu smeđe makroalge kao najbogatiji izvor florotanina koji posjeduju različita biološka djelovanja poput antioksidacijskih, protuupalnih, antikancerogenih i mnogih drugih svojstava (Thomas i Kim, 2011). Istraživanja su pokazala da struktura florotanina utječe na njihovo biološko djelovanje. Florotanini veće molekulske mase pokazali su jače baktericidno djelovanje, dok je veća antioksidacijska aktivnost uočena kod florotanina niže molekulske mase (Nagayama i sur., 2002). Nadalje, Barbosa i sur. (2018) utvrdili su da florotanini imaju višestruku ulogu kod prevencije alergijskih reakcija zbog svoje sposobnosti smanjenja stupnja degranulacije imunoloških stanica i suzbijanja enzimskih reakcija povezanih s alergijama.

Učinkovitost polisaharida na inhibiciju rasta stanica raka ovisi o njihovom stupnju sulfatacije i molekulskoj masi. Fukoidan s višom supstitucijom sulfata i nižom molekulskom masom pokazao je veće antikancerogeno djelovanje (Cho et al., 2011). Polisaharidi su pokazali učinkovitost kao antivirusna sredstva čiji se mehanizmi temelje na njihovoj sposobnosti

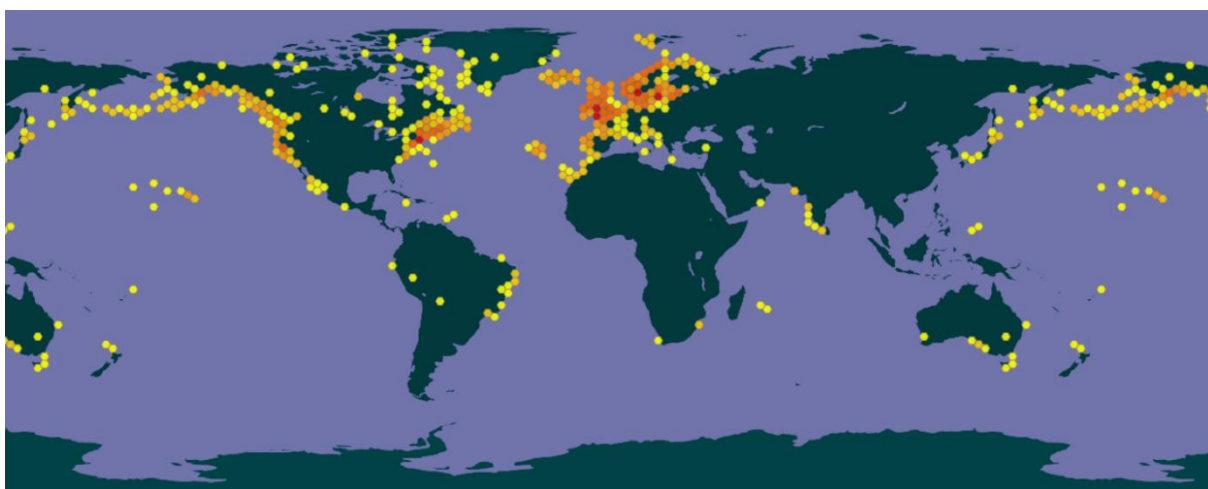
spriječavanja početnog vezanja virusa, a isto tako i inhibiciji unutarstanične replikacije (Santoyo i sur., 2011).

Osim što se koriste za razvoj novih lijekova, makroalge se koriste i u tradicionalnoj medicini za olakšanje boli. Osušeni prah makroalgi može se pomiješati s vazelinom ili uljem i ta se smjesa može primijeniti za liječenje natečenih zglobova, dok se algin koristi za lokalnu primjenu na koži za zacjeljivanje rana (Parapurath i sur., 2012). Cjelokupno znanje o makroalgama i njihovim bioaktivnim spojevima doprinosi izgradnji zdravog ljudskog organizma, s naglaskom na jačanje imunološkog sustava.

## 2.2. ROD *Fucus*

### 2.2.1. Morfološke i fiziološke karakteristike roda *Fucus*

Rod *Fucus* široko je rasprostranjen rod smeđih, višegodišnjih i jestivih morskih algi, a spada u porodicu Fucaceae, red Fucales i razred Ochrophyta koji obuhvaća preko 1500 vrsta smeđih algi. Ovaj rod nastanjuje većinom hladne do umjerene vode litoralnih i sublitoralnih područja uz stjenovite obale sjeverne hemisfere (**Slika 1**). Vrste roda *Fucus* većinom su pričvršćene za stijene, nasipe te druge morske organizme poput mekušaca i drugih morskih algi (Guiry i Guiry, 2021). Karakterizira ih zelenkasto smeđi talus koji se sastoji od držača, stapke i spljoštenih dihotomsko razgranjenih listova sa završnim receptakulima koji natiču tijekom sezone reprodukcije. Listovi imaju središnje zadebljano područje koje se naziva središnje rebro, a kod nekih vrsta mogu se naći i zračni mjehurići koji održavaju algu u vertikalnom položaju kada je potopljena (Kucera i Saunders, 2008).



**Slika 1** Prikaz rasprostranjenosti roda *Fucus* u svijetu (Izvor: Global Biodiversity Information Facility, 2021)

Karakterizira ih velika raznolikost fitokemikalija zbog kojih posjeduju različita biološka svojstva, a što ih čini poželjnim kandidatima za primjenu u različitim industrijama. Mogu se smatrati izvrsnim izvorom polisaharida, florotanina i fukoksantina za koje su utvrđena važna biološka djelovanja poput liječenja krvnih ugrušaka, reumatoidnog artritisa, astme, arteroskleroze, dijabetesa, raka i drugih upalnih stanja izazvanih oksidacijskim stresom (Chung i sur., 2013; Hentati i sur., 2020; Murray i sur., 2018). Dugi niz godina neke se vrste roda *Fucus* koriste kao izvor hrane u zemljama istočne Azije, ali i u nekim obalnim zemljama zapadne Europe i Aljaske (Pereira, 2016). Posebno se ističe *F. spiralis* koji se smatra delicijom na Azorskim otocima zbog svojih natečenih receptakula (**Slika 2**) (Patarra i sur., 2011). U tradicionalnoj medicini, vrste roda *Fucus* popularne su zbog visokog sadržaja joda što im daje izvanredna terapijska svojstva za liječenje komplikacija povezanih sa gušavosti, štitnjačom i njenim oticanjem (Circuncisão i sur., 2018).



**Slika 2** Receptakuli smeđe makroalge *Fucus spiralis* (Guiry i Guiry, 2021)

### 2.2.2. Kemijski profili različitih vrsta roda *Fucus*

Tijekom rasta i prilagodbe na abiotički stres, makroalge biosintetiziraju različite isparljive spojeve za koje je utvrđeno da služe za komunikaciju i interakciju s okolinom, ali i kao zaštita od predatora te kao antimikrobna sredstva koja štite algu od patogena i ublažavaju oksidacijski stres (Santos Leite Neta i Narain, 2018). Pronađene su veće koncentracije isparljivih kratkolančanih masnih kiselina (do 10 C atoma) u različitim vrstama makroalgi kada su tretirane s morskim patogenim *Vibrio haveyi*, koji je prijetnja mnogim morskim organizmima (Pham i sur., 2008). Također, djeluju i kao feromoni što je potvrđeno 1948. godine (Cook i sur., 1948) kada je tijekom eksperimenta pokretne spermatozoide privukao isparljivi spoj izlučen iz jajašaca smeđe makroalge *F. serratus*. Njihova koncentracija i sastav ovise o uvjetima okoliša, zrelosti makroalge, zemljopisnom podrijetlu, kao i o postupku sušenja i metodi ekstrakcije (Lopez-Perez i sur., 2016). Bravo-Linares i sur. (2010) utvrdili su da prisutnost ili odsutnost svjetlosti ne utječe na koncentraciju isparljivih spojeva što ukazuje na to da su ti spojevi prisutni



tijekom fotosinteze, ali i drugih metaboličkih procesa poput respiracije. S druge strane, sušenje odnosno izlaganje makroalgi zraku dovelo je do povećanja koncentracije isparljivih spojeva u svim ispitanim vrstama makroalgi uslijed oksidacijskog stresa. Ugljikovodici su karakteristični isparljivi spojevi koji se nalaze u smeđim algama, s pentadekanom kao najzastupljenijim spojem, a povezani su s degradacijom masnih kiselina (Youngblood i sur., 1971; Youngblood i Blumer, 1973; Clark i Blumer, 1967).

Literaturni podaci vezani uz identifikaciju isparljivih spojeva vrsta roda *Fucus* relativno su malo zastupljeni, a značajnija istraživanja kemijskog sastava isparljivih spojeva iz različitih *Fucus* vrsta dobivenih različitim postupcima izolacije, prikazana su u **Tablici 4**.

**Tablica 4** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja isparljivih spojeva iz različitih vrsta makroalgi roda *Fucus*

Makroalge roda <i>Fucus</i>	Metoda izolacije	Detektirani isparljivi spojevi	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>F. spiralis</i>	višestruka ekstrakcija vršnih para	dimetil-sulfid, etil-acetat, heptadekan, benzaldehid, heksanal, heptanal, butan-1-ol	GC-MS	Mirzayeva i sur., 2021
<i>F. vesiculosus</i>	HS-SPME	(Z)-pent-2-en-1-ol, okt-1-en-3-ol, (E)-okt-2-en-1-ol, 2,2,6-trimetilcikloheksan, $\beta$ -ciklocitral, $\beta$ -jonon, butan-2-on	GC-MS	Mouritsen i sur., 2019
<i>F. vesiculosus</i> , <i>F. spiralis</i>	HS-SPME	heksanal, heptanal, oktanal, okt-1-en-3-ol, hepta-2,4-dienal	GC-MS	Peinado i sur., 2014
<i>F. vesiculosus</i> , <i>F. serratus</i>	HS-SPME	bromoform, diiodometan, tetrakloreten, bromodiklorometan, dimetil-sulfid	GC-MS	Bravo-Linares i sur., 2010
<i>F. serratus</i>	dinamička tehnika izolacije vršnih para	oktan, etil-acetat, heksanal, pent-1-en-3-ol, heks-2-enal, okt-1-en-3-ol, oktanal, pent-2-en-1-ol, heksan-1-ol, heks-3-en-1-ol	GC-MS	Beauchene i sur., 2000
<i>F. distichus</i> , <i>F. spiralis</i> , <i>F. vesiculosus</i>	ekstrakcija po Soxhlet-u	tridekan, tetradekan, pentadekan, heksadekan, heptadekan, oktadekan, henikosan	GC-MS	Youngblood i sur., 1971

Alge iz porodice Fucaceae i roda *Fucus* sadrže visoke koncentracije miristinske kiseline te ih karakterizira veća zastupljenost  $\omega$ -6 masnih kiselina u odnosu na  $\omega$ -3 masne kiseline (Najdek i sur., 2014; Khotimchenko, 1998; Colombo i sur., 2006). Nadalje, rod *Fucus* je dobar izvor PUFAs sa poželjnim omjerom  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 masnih kiselina koji iznosi između 1,5-3 što predstavlja poželjan omjer u ljudskoj prehrani (Colombo i sur., 2006; Van Ginneken i sur., 2011). Najznačanije  $\omega$ -3 masne kiseline u smeđim algama su eikosapentaenska,  $\alpha$ -linolenska i stearidonska, dok je arahidonska najzastupljenija  $\omega$ -6 masna kiselina (Dembitsky i sur., 1990; Jones i Harwood, 1992; Miyashita i sur., 2013). Općenito, oleinska kiselina je dominantna

masna kiselina nađena u smeđim algama, a njena koncentracija ovisi o godišnjem dobu što je utvrđeno u algama *F. serratus* i *F. spiralis* koje su tijekom ljetnog perioda sadržavale najveće koncentracije spomenute masne kiseline (Kim i sur., 1996). Osim godišnjeg doba, utjecaj na ukupni sadržaj lipida i sastav masnih kiselina imaju i drugi čimbenici poput temperature, dostupnih nutrijenata i svjetlosti (Gosch i sur., 2012). Khotimchenko (2002) utvrdio je da makroalge koje rastu u sjenovitim područjima imaju veći udio lipida od onih koje rastu u područjima s dostupnom svjetlošću što se može objasniti činjenicom da tilakoidne membrane povećavaju svoju površinu sintetizirajući njihove gradivne elemente među kojima su i PUFAs kako bi se povećala površina za apsorpciju sunčeve svjetlosti (Sukenic i sur., 1989). Ukupni udio lipida u vrstama roda *Fucus* kreće se od 1 do 4 % (Kim i sur., 1996; Munda, 1964, Khotimchenko, 1998).

Pregledom literature vezane uz sastav masnih kiselina izdvojeni su najznačajniji znanstveni radovi koji uključuju analize na različitim makroalgama iz roda *Fucus*, a prikazani su u **Tablici 5**.

**Tablica 5** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja masnih kiselina iz različitih vrsta makroalgi roda *Fucus*

Makroalge roda <i>Fucus</i>	Otapalo/smjesa otapala	Detektirane masne kiseline	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>F. spiralis</i>	kloroform/metanol	C18:1n9c, C20:4n6, C16:0, C14:0, C20:5n3, C18:2n6c, C18:3n6, C18:4n3	GC-FID	Francisco i sur., 2020
<i>F. spiralis</i>	diklormetan/metanol	C16:0, C18:1n9c, C14:0, C20:2n6, C20:4n6, C20:5n3, C18:3n6, C18:2n6c, C18:0, C16:1	GC-FID	Grozdanic i sur., 2020
<i>F. vesiculosus</i>	kloroform/metanol/voda	C18:1n9c, C20:4n6, C16:0, C14:0, C20:5n3, C18:3n6, C20:2n6	GC-FID	Lorenzo i sur., 2017
<i>F. virsoides</i>	diklormetan/metanol	C16:0, C14:0, C18:1n9c, C20:4n6, C20:5n3	GC	Najdek i sur., 2014
<i>F. vesiculosus</i>	petroleter	C18:1n9c, C10:0, C14:0, C16:0, C18:2n6c, C20:5n3, C18:3n6, C22:6n3	GC-FID	Peinado i sur., 2014
<i>F. spiralis</i>	kloroform/metanol	C18:0, C20:5n3, C14:0, C16:1, C16:0, C18:1n9c, C20:0, C18:2n6c, C22:0, C17:0, C22:1n9	GC-MS	Silva i sur., 2013
<i>F. distichus</i>	kloroform/metanol	C16:0, C18:1n9c, C20:4n6, C20:5n3, C14:0, C18:2n6c, C18:3n6, C18:4n3	GC-FID	Khotimchenko i sur., 2002
<i>F. vesiculosus</i>	kloroform/metanol	C18:1n9c, C20:5n3, C16:0, C18:3n6, C16:1, C20:4n6, C22:6n3, C18:4n3	GC-FID	Herbreteau i sur., 1997

Pigmenti koji se nalaze u smeđim algama uključuju fukoksantin koji čini oko 70 % prisutnih karotenoida u *F. serratus* i *F. vesiculosus*, uz  $\beta$ -karoten koji je prisutan u znatno nižim koncentracijama (Haugan i Liaaen-Jensen, 1989; 1994). Nadalje, prisutni su klorofil *a*, koji je odgovoran za fotosintezu, te klorofil *c* koji služi kao pomoćni pigment. Fukoksantin pripada skupini ksantofila te je odgovoran za karakterističnu boju smeđih makroalgi budući da zamaskira klorofil i ostale prisutne karotenoide (Matsuno, 2001; Dasgupta, 2015). Međutim, utvrđena je i prisutnost feofitina *a* koji predstavlja derivat klorofila *a*, a neka istraživanja ukazuju da i on značajno doprinosi boji smeđih makroalgi davajući im maslinasto-smeđu boju (Silva i sur., 2019). Smeđe makroalge smatraju se vrlo važnim izvorom fukoksantina koji posjeduje različita biološka svojstva poput antioksidacijskih (Maeda i sur., 2018), antikancerogenih (Méresse i sur., 2020), neuroprotektivnih (Zhang i sur., 2017), protuupalnih (Heo i sur., 2008; Kim i sur., 2010), hipoglikemijskih (Maeda i sur., 2007), hepatoprotektivnih (Woo i sur., 2010) i drugih svojstava. Sadržaj ovog pigmenta u makroalgama roda *Fucus* ovisi o vrsti makroalge, životnom ciklusu, uvjetima okoliša, poput svjetlosti, temperature, saliniteta i kemijskom sastavu morske vode te o dubini na kojoj rastu (Lalegerie i sur., 2020). Utvrđeno je da je veći udio fukoksantina imala alga *F. vesiculosus* koja je rasla na 4 m dubine, u odnosu na one alge koje rastu u plićim predjelima (Catarino i sur., 2018).

U **Tablici 6** se može primijetiti kako su različita istraživanja koristila drugačije metode ekstrakcije i otapala za ekstrakciju fukoksantina iz makroalgi roda *Fucus*. Iznimno je važno pronaći odgovarajuću metodu ekstrakcije koja će omogućiti maksimalno iskorištenje ove vrlo važne bioaktivne komponente.

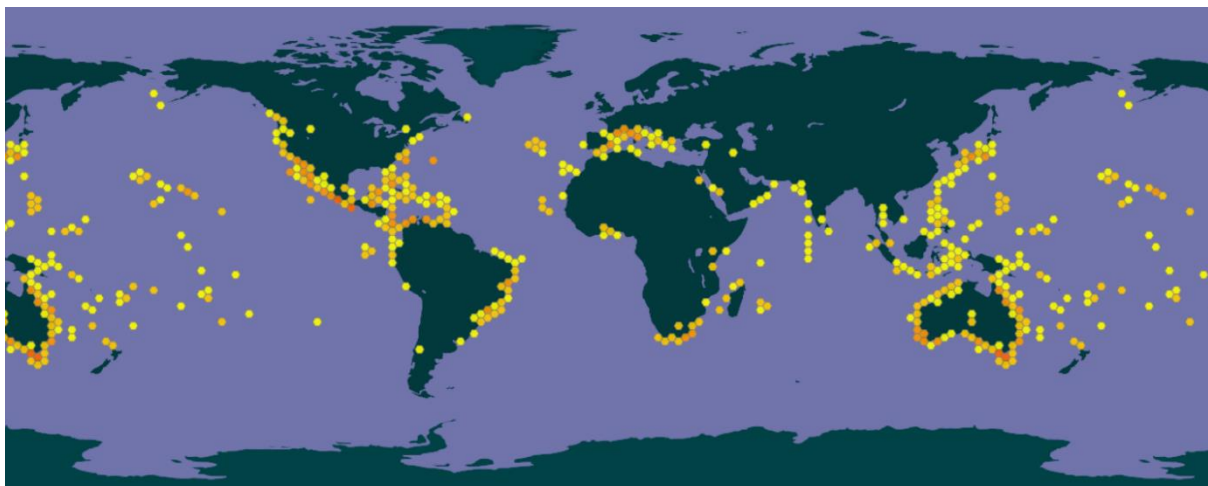
**Tablica 6** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja pigmentata iz različitih vrsta makroalgi roda *Fucus*

Makroalge roda <i>Fucus</i>	Metoda izolacije/otapalo	Detektirani pigmenti	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>F. vesiculosus</i>	mikroekstrakcija na krutoj fazi potpomognuta miješanjem	fukoksantin	HPLC	Nunes i sur., 2019
<i>F. vesiculosus</i>	aceton s 0,1 % butiliranog hidroksitoluena	fukoksantin, klorofil <i>a</i> , feofitin <i>a</i> , lutein, $\beta$ -karoten	UHPLC-DAD-ESI-MS	Silva i sur., 2019
<i>F. vesiculosus</i> , <i>F. serratus</i>	ekstrakcija potpomognuta enzimima	fukoksantin	HPLC, LC-MS	Shannon i Abu-Ghannam, 2018
<i>F. serratus</i>	heksan/aceton	fukoksantin	HPLC	Heffernan i sur., 2016
<i>F. vesiculosus</i>	aceton	fukoksantin	HPLC	Shannon i Abu-Ghannam, 2017
<i>F. evanescens</i>	etanol	fukoksantin	NMR, ESI-MS	Imbs i sur., 2013
<i>F. distichus</i>	metanol	fukoksantin	HPLC	Terasaki i sur., 2009
<i>F. distichus</i> , <i>F. spiralis</i> , <i>F. evanescens</i>	metanol/heksan	fukoksantin, $\beta$ -karoten, klorofil	spektrofotometrijska analiza	Collén i Davison, 1999

## 2.3. ROD *Amphiroa*

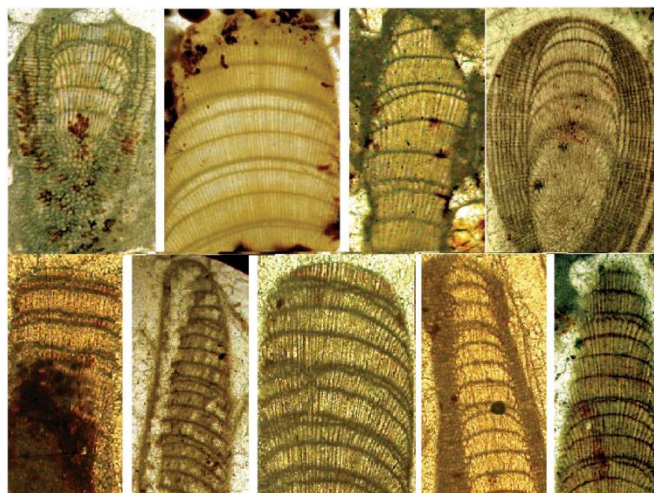
### 2.3.1. Morfološke i fiziološke karakteristike roda *Amphiroa*

*Amphiroa* je rod taloidnih crvenih algi koji obuhvaća oko 66 vrsta, a spada u porodicu Lithophyllaceae, red Corallinales i razred Rhodophyta. Rasprostranjen je u tropskim i suptropskim područjima (**Slika 3**) obuhvaćajući različite morfološke tipove koji mogu biti od nekoliko milimetara do čak 30 cm. Talus je obično uspravan, ponekad upleten, a grane se sastoje od naizmjeničnih dekalificiranih genikula i kalcificiranih intergenikula koji mogu biti dihotomski, trihotomski, nepravilno razgranjeni ili skupljeni (Guiry i Guiry, 2021). Economou-Amilli i sur. (1990) istražili su morfološke karakteristike *A. rigida* pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije i utvrdili da njeni listovi rastu vrlo blizu jedan drugomu u visinu od 1 do 2 cm, nepravilno su razgranati s jako kalcificiranim segmentima. Za razliku od *A. beauvoisii* čiji listovi su u potpunosti kalcificirani, dihotomski razgranjeni i tvore uspravne nakupine u visinu do 3 cm.



**Slika 3** Prikaz rasprostranjenosti roda *Amphiroa* u svijetu (Izvor: Global Biodiversity Information Facility, 2021)

Općenito, rod *Amphiroa* vrlo je malo istražen, sa samo nekoliko istraživanja vezanih uz morfologiju i anatomske karakteristike različitih vrsta (**Slika 4**) (Choi i Lee, 1988; Riosmena-Rodriguez i Siquelros-Beltrones, 1996; Kim, 1990; Garbary i Johansen, 1987; Economou-Amilli i sur., 1990). Osim istraživanja organizacije intergenikularnih površina, udubljenja epitela i varijacije u kalcifikaciji između različitih vrsta, vrlo su oskudna istraživanja o njihovom kemijskom sastavu.



**Slika 4** Morfološke karakteristike različitih vrsta makroalgi roda *Amphiroa* (Kundal i Mude, 2010)

Naime, nedavno Gopu i Selvam (2020) izolirali su polisaharide prisutne u *A. rigida* te su utvrdili da posjeduju značajnu antioksidacijsku aktivnost *in vitro*, antimikrobnu aktivnost protiv *Salmonella typhi* te da mogu inhibirati razvoj stanica raka dojke. Prema tome, polisaharidi iz crvene makroalge *A. rigida* imaju značajan potencijal za primjenu u farmaceutskoj industriji.

Istraživanja su provedena i na drugim algama roda *Amphiroa*, poput *A. dilatata* za koju je dokazana antioksidacijska aktivnost i inhibicija matricne metaloproteinaze što se može povezati s antikancerogenim djelovanjem (Khan i sur., 2010), a antifungalna i antibakterijska aktivnost utvrđene su za alge *A. bowerbankii* i *A. ephedraea* (Stirk i sur., 2007). Sastav masnih kiselina istražen je za *A. anceps* (Jayasree i sur., 2012) i *A. beauvoisii* (Fleury i sur., 2011) te je uočena značajna razlika među profilima masnih kiselina što može biti posljedica različitih uvjeta uzgoja i abiotičkih faktora.

### 2.3.2. Kemijski profili različitih vrsta roda *Amphiroa*

Istraživanja na isparljivim spojevima iz makroalgi roda *Amphiroa* nisu poznata te je to ujedno i razlog zašto nije prikazan pregled literature isparljivih spojeva. Generalno se za crvene makroalge može reći da su one poznate po svom sastavu organohalogenih spojeva koji se nalaze među 4 glavne skupine isparljivih spojeva prisutnih u crvenim makroalgama, a uključuju fenole, metabolite nastale iz masnih kiselina, terpenoide te spojeve do 7 C atoma koji sadrže halogeniranu karbonilnu skupinu (Faulkner, 2001; Blunt i sur., 2003; Kladi i sur., 2004). Različita istraživanja pokušala su ukazati na važnost isparljivih spojeva u crvenim makroalgama za njihova taksonomska obilježja (Dembitsky i Srebniak, 2002), ali postoji velika različitost među samim vrstama, ali i rodovima koji spadaju u skupinu crvenih makroalgi. Utvrđeno je da se koncentracije estera masnih kiselina razlikuju među vrstama *Corallina* i *Polysiphonia* koje pripadaju istom rodu. Nadalje, u svim ispitanim crvenim makroalgama uočena je dominantnost zasićenih ugljikovodika ravnog lanca, iako su pronađene i značajne koncentracije mononezasićenih alkana u pojedinim vrstama. Iako uloga spojeva s karbonilnom skupinom nije poznata, oni su prisutni u visokim koncentracijama što može biti pokazatelj značajnih alelopatskih funkcija (Kamenarska i sur., 2006). Crvene makroalge posjeduju jedinstvene biosintetske puteve za proizvodnju organohalogeniranih spojeva te se time ističu u usporedbi sa zelenim i smeđim makroalgama (Kladi i sur., 2004). Halogenirani spojevi služe kao alelokemikalije, a posjeduju antibakterijsko i antifungalno djelovanje te suzbijaju razvoj drugih algi. Prisutnost takvih spojeva karakteristična je za filogenetski naprednije crvene makroalge (npr. Ceramiales) (Oshihira i sur., 1999). Spojevi sa bromom puno su više zastupljeni od onih s klorom, iako se klor nalazi u većim koncentracijama u morskoj vodi (Kladi i sur., 2004).

Crvene makroalge koje pripadaju redu Corallinales karakterizira prisutnost različitih esencijalnih masnih kiselina, među kojima se ističu eikosapentaenska i arahidonska kiselina kao najzastupljenije, dok su linolna,  $\alpha$ -linolenska i stearidonska kiselina zastupljene u manjem udjelu (Khotimchenko i sur., 2002; Galloway i sur., 2012). Esencijalne masne kiseline, poput eikosapentaenske i dokosaheksaenske, imaju važnu ulogu u imunomodulaciji, razvoju mozga

i drugih fizioloških funkcija poput stanične signalizacije, regulacije transkripcijskih faktora, te u liječenju i prevenciji karcinoma, očnih, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i autoimunih bolesti (Gonçalves i sur., 2017). U usporedbi sa zelenim i smeđim makroalgama, crvene makroalge posjeduju veće razlike u sastavu masnih kiselina, što je utvrđeno kod različitih vrsta gdje se udio zasićenih masnih kiselina kretao od 26 % do 80 %. Također, udio PUFA isto tako varira između vrsta i može se kretati od 8 % do 55 % (Pereira i sur., 2012a; Li i sur., 2002). U literaturi se navodi da crvene makroalge mogu biti izvor nutritivno važne eikosapentaenske masne kiseline te se mogu koristiti kao dodatak prehrani ili pak primjeniti u farmaceutskoj industriji (Li i sur., 2002; Graeve i sur., 2002; Vaskovsky i sur., 1996). Jayasree i sur. (2012) prilikom istraživanja sastava masnih kiselina *A. anceps* utvrdili su da je palmitinska kiselina najzastupljenija zasićena masna kiselina, dok je arahidonska kiselina najzastupljenija PUFA. Međutim, u drugim algama roda *Amphiroa* pronađene su značajne razlike u najzastupljenijim masnim kiselinama, a pregled utvrđenih profila prikazan je u **Tablici 7**. Također, može se primijetiti da su prilikom ekstrakcija ukupnih lipida korištena različita otapala što može imati značajan utjecaj na sastav masnih kiselina (Cotas i sur., 2020).

**Tablica 7** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja masnih kiselina iz različitih vrsta makroalgi roda *Amphiroa*

Makroalge roda <i>Amphiroa</i>	Otapalo/smjesa otapala	Detektirane masne kiseline	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>Amphiroa</i> sp.	petroleter	C16:0, C18:1n9c, C14:0, C18:0, C18:2n6c, C16:1, C12:0, C15:0	GC-FID	Edirinsinghe i Abeysinghe, 2015
<i>A. anceps</i>	diklormetan/metanol/voda	C16:0, C18:1n9c, C18:0, C18:2n6c, C14:0	GC-FID	Hanson i sur., 2010
<i>A. fragilissima</i>	kloroform/metanol	C16:0, C18:1n9c, C14:0, C20:4n6, C22:0, C22:4, C17:1, C22:2	GC-FID	Heiba, 1989
<i>A. anceps</i>	kloroform/metanol	C16:0, C20:4n6, C18:1n9c, C14:0, C16:1, C18:0, C20:5n3	GC-MS	Jayasree i sur., 2012
<i>A. foliace</i> , <i>Amphiroa</i> sp.	metanol/benzen/sumporna kiselina	C16:0, C14:0, C18:1n9c, C15:0, C18:0, C17:0	GC-MS	Venkatesalu i sur., 2012

Glavni karotenoidi prisutni u crvenim makroalgama su  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten te njihovi dihidroksi derivati, zeaksantin i lutein (Bjørnland i Aguilar-Martinez, 1976). Naime, dostupna literatura ukazuje na veliku raznolikost prisutnih karotenoida koji ovise o vrsti makroalge i području rasta te su time Schubert i sur. (2006) zaključili da pojedine crvene makroalge jednostavno nemaju

sposobnost sinteze zeaksantina, nego nekih drugih ksantofila poput fukoksantina i neoksantina. Također, isto je utvrđeno i za  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten koji su predstavljeni kao najzastupljeniji karotenoidi u crvenim makroalgama, no ne nalaze se u svim vrstama (Terasaki i sur., 2012; Yalçın i sur., 2020). Može se zaključiti da alge koje pripadaju istoj skupini posjeduju neke sličnosti u profilu pigmenata, ali nemaju jedinstveni sastav koji se može primijeniti na svaku vrstu. Takva pojava otežava objašnjenje o ulozi pigmenata u crvenim makroalgama, prilikom prilagodbe na uvjete okoliša te na njihovu sposobnost zaštite stanica od UV zračenja (Schubert i sur., 2006). Od svih klorofila (*a*, *b*, *c* i *d*), jedino je klorofil *a* prisutan u crvenim makroalgama te je u pojedinim vrstama utvrđena i prisutnost njegovog derivata feofitina *a*, ali je njegova koncentracija bila značajno manja u usporedbi sa smeđim makroalgama (Yalçın i sur., 2020). Poznato je da pigmenti štite stanicu od okolišnog stresa te se mogu koristiti kao indikator izloženosti stresu. Yang i sur. (2021) zaključili su kako bi zatopljenje oceana u budućnosti moglo značajno utjecati na razgradnju pigmenata u algama, a time dovesti i do njihovog prestanka rasta. Prilikom praćenja omjera klorofila *a* i karotenoida u *A. fragilissima* uvidjeli su da se omjer značajno smanjivao kada je temperatura morske vode prilikom uzgoja bivala viša.

Dostupnih podataka o pigmentima u vrstama roda *Amphiroa* je vrlo malo, a većina podataka vezana je samo uz spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija klorofila i karotenoida (**Tablica 8**). Shodno tome, ključno je u budućim istraživanjima dati naglasak na primjeni visokosofisticiranih analitičkih metoda u analizi pigmenata kako bi se riješile nedoumice i kontradiktorna istraživanja koja su do sada provedena.

**Tablica 8** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja pigmenata iz različitih vrsta makroalgi roda *Amphiroa*

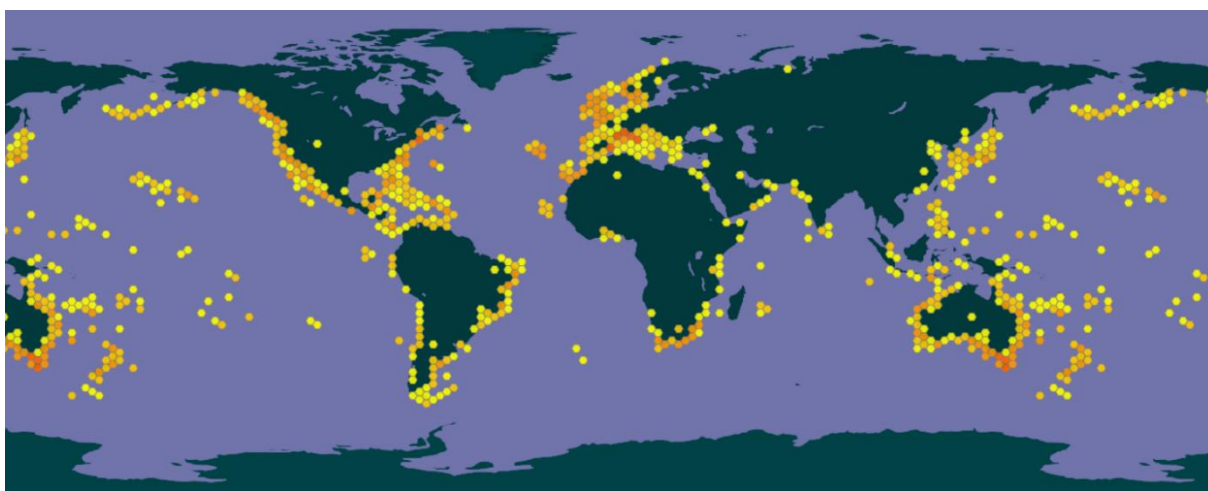
Makroalge roda <i>Amphiroa</i>	Otapalo/smjesa otapala	Detektirani pigmenti	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>A. fragilissima</i>	80 % aceton	klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , ukupni karotenoidi	spektrofotometrijsko određivanje	Roy i sur., 2020
<i>Amphiroa</i> sp.	DMSO, 80 % aceton	klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , ukupni karotenoidi, fukoksantin	spektrofotometrijsko određivanje	Vimala i sur., 2013
<i>A. fragilissima</i>	80 % aceton	klorofil <i>a</i> , ukupni karotenoidi	spektrofotometrijsko određivanje	Yang i sur., 2021



## 2.4. ROD *Codium*

### 2.4.1. Morfološke i fiziološke karakteristike roda *Codium*

Rod *Codium* spada u porodicu Codiaceae, red Bryopsidales i razred Chlorophyta te uključuju 144 taksonomski prihvaćene vrste koje su rasprostranjene u svim morskim vodama, osim na Arktiku i Južnim oceanima. Najveći broj vrsta nalazi se u prijelaznim florama između umjerene i suptropske klime, a ističu se Japan, Južna Afrika, Australija i Kalifornija-Meksiko (**Slika 5**). Iako većina vrsta roda *Codium* ima uski zemljopisni raspon i pokazuje malu morfološku varijabilnost, postoje pojedine vrste koje su rasprostranjene na širokom području i pokazuju složene morfološke varijabilnosti (Guiry i Guiry, 2021).



**Slika 5** Prikaz rasprostranjenosti roda *Codium* u svijetu (Izvor: Global Biodiversity Information Facility, 2021)

Talus je kod svih vrsta spužvast, priljubljen uz stijene ili školjke te može biti različitih veličina od 1 cm do 10 m. Unutarnja struktura sastavljena je od bezbojnog tkiva koje se sastoji od gusto isprepletenih cjevastih struktura i sloja zelenih pregrada zvanih utrikuli. Čvrsti apikalni zidovi koji čine površinu talusa, zajedno s međuprostorima čine *Codium* vrste izvrsnim domaćinom za brojne male alge poput *Ectocarpus*, *Streblonema* i *Ceramium* (Guiry i Guiry, 2021). *C. bursa* je svrstana u najsporije rastuće alge na svijetu zbog niske respiracije i fotosinteze (Geertz-Hansen i sur., 1994). Također, debele stanične pregrade omogućuju joj smanjivanje gubitaka hranjivih tvari što rezultira smanjenim potrebama za istim (Vidondo i Duarte, 1995). Potrebe za hranjivim tvarima može zadovoljiti recikliranjem i zadržavanjem hranjivih sastojaka u vodi koja se nalazi u unutrašnjosti, a sadrži jedinstvenu mikrobnu zajednicu (Vaquer i sur., 1994).

Različita istraživanja pokazuju da se bioaktivne komponente iz zelenih makroalgi mogu koristiti kao protuupalna sredstva, antioksidansi (Frikha i sur., 2011), antimikrobne (Moubayed i sur., 2017) i antigenotoksične molekule (Celikler i sur., 2009). Međutim, vrste roda *Codium*

najmanje su istražene od svih drugih vrsta koje pripadaju razredu Chlorophyta. *C. fragile* (**Slika 6**) privlači najviše pozornosti zbog svoje invazivne prirode, a posjeduje veliki potencijal korištenja u biomedicinske svrhe. Dokazano je da ima sposobnost obnove kostiju te stvaranja nove koštane mase (Surget i sur., 2017). Također, pojedine komponente izolirane iz *C. fragile* inhibiraju rast stanica melanoma (Kim i sur., 2013). Metanolni ekstrakti makroalgi *C. dichotomum*, *C. fragile*, *C. bursa* i *C. tomentosum* pokazali su značajno inhibicijsko djelovanje protiv *Staphylococcus aureus*, a utvrđeno je da na aktivnost utječe reproduktivno stanje alge i godišnje doba (Chiheb i sur., 2009). Etanolni ekstrakt *C. bursa* pokazao je značajno antibakterijsko djelovanje protiv *Escherichia coli* i *Staphylococcus simulans* (Frikha i sur., 2011).



**Slika 6** Najraširenija invazivna vrsta u svijetu *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* (Guiry i Guiry, 2021)

#### 2.4.2. Kemijski profili različitih vrsta roda *Codium*

Zelene makroalge poznate su po većoj raznolikosti isparljivih spojeva u odnosu na smeđe i crvene makroalge (Santos Leite i Narain, 2018). Karakterizira ih prisutnost dimetil-sulfida (DMS) koji je odgovoran za nepoželjan miris algi, a njegova prisutnost ukazuje na ulogu algi u kruženju sumpora u prirodi (Malin i Kirst, 1997). Poželjan miris makroalgama daju terpeni koji su općenito vrlo malo zastupljeni, za razliku od nezasićenih ugljikovodika koji su u zelenim makroalgama najviše zastupljeni (Güven i sur., 2013; Youngblood i sur., 1971). Nadalje, isparljivi spojevi posjeduju značajna biološka djelovanja među kojima se posebno ističe loliloid izoliran iz *C. divaricatum* s antirepelentnim (Ozdemir i sur., 2006) i imunosupresivnim (Yilmaz Koz i sur., 2009) djelovanjem, inhibicijom klijanja (Karabay-Yavasoglu i sur., 2007) i rasta različitih stanica raka (Yilmaz Koz i sur., 2009). Glavne isparljive komponente utvrđene u *Codium* sp. su DMS, etil-acetat, heptadekan,  $\alpha$ -jonon, 2-feniletil-acetat i dimetil-sulfoksid (Mirzayeva i sur., 2021). Međutim, prisutnost određenih spojeva ovisi o mnogo faktora, a među

njima može biti i tehnika sušenja samih algi. Utvrđeno je da alge koje su sušene pomoću tri različite metode (sušenje na zraku, sušenje u sušioniku i liofilizacija) posjeduju različite kemijske profile (Chan i sur., 1977). Prisutnost norizoprenoida u *C. tomentosum* (Valentão i sur., 2010) može biti uslijed degradacije karotenoida što upućuje na razvoj alge i daje im antifungalna svojstva te doprinosi aromi (Lu i Li, 2008). Nadalje, aldehidi koji su prisutni u algama roda *Codium* nastaju razgradnjom prisutnih masnih kiselina (Schwab i sur., 2008).

Istraživanja isparljivih spojeva u algama roda *Codium* sežu do 1958. godine (Katayama, 1958), a najznačajnija istraživanja prikazana su u **Tablici 9** gdje su izdvojeni najzastupljeniji spojevi pronađeni u različitim *Codium* vrstama.

**Tablica 9** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja isparljivih spojeva iz različitih vrsta makroalgi roda *Codium*

Makroalge roda <i>Codium</i>	Metoda izolacije	Najzastupljeniji detektirani isparljivi spojevi	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>Codium</i> sp.	višestruka ekstrakcija vršnih para	DMS, etil-acetat, heptadekan, $\alpha$ -jonon, 2-feniletil- acetat, dimetil- sulfoksid	GC-MS	Mirzayeva i sur., 2021
<i>C. tomentosum</i>	kombinacija ekstrakcije organskim otapalima (metanol/diklormetan) i frakcioniranja	dokos-1-en, eikos-9-en, eksakos-1-en, trikosan-1-ol, oktadekan-1,2-diol, cikloheksan, eikosan, dokosan, oktadekanal, 2-heksildekan-1-ol, lolioid, perhidrofarnezil-aceton	GC-MS	Silva i sur., 2020
<i>C. tomentosum</i>	metoda po Soxhlet-u (diklormetan) i hidroliza	dokosan-1-ol, tetrakosan-1-ol, neofitadien, fitol, heptadekan	GC-MS	Santos i sur., 2015
<i>C. tomentosum</i>	HS-SPME	limonen, dihidroaktinidiolid, 2,3-epoksi- $\beta$ -jonon, benzotiazol, $\alpha$ -jonon, dekanolakton, heksahidrofarnezil-aceton, metil-dihidrojasmonat, ( <i>E,E</i> )-deka-2,4-dienal, linalool	GC-MS	Valentão i sur., 2010
<i>C. fragile</i>	HD u aparaturi po Clevenger-u	<i>n</i> -trikosan, 2,2,4-trimetil-1,3-dioksolan, <i>n</i> -heksadekan, <i>n</i> -eikosan, <i>n</i> -tetrakosan, 3-etil-3-metilheptan, 2,4,6-trimetiloktan, <i>n</i> -tridekan	GC-MS	Yilmaz Koz i sur., 2009

Prisutnost visokih koncentracija palmitinske, heksadekatrienske, oleinske i  $\alpha$ -linolenske masne kiseline karakteristična je za *Codium* vrste, među kojima je palmitinska zastupljena u najvećim udjelima (Da Costa i sur., 2015; Valentão i sur., 2010; Khotimchenko i sur., 2002; Dembitsky i

sur., 2003; Goecke i sur., 2010). Također, dugolančane kiseline poput arahidonske, isto su pronađene u tim algama što ukazuje na sposobnost *Codium* vrsta za sintezu takvih kiselina, vjerojatno zbog prilagodbe na ekstremne uvjete u kojima žive (Aliya i Shameel, 1993). Pretpostavlja se da prisutnost heksadekatrienske masne kiseline može poslužiti kao kemotaksonomski marker za *Codium* vrste budući da je dokazana u različitim vrstama porodice Codiaceae (Dembitsky i sur., 2003; Khotimchenko, 2003; Goecke i sur., 2010). Neki autori navode i da oleinska kiselina može biti od kemotaksonomske važnosti budući da je prisutna u visokim koncentracijama u vrstama roda *Codium* (Khotimchenko, 2003). Utvrđena je povezanost između sastava masnih kiselina i geografskog položaja rasta te uvjeta okoliša. Vrste koje su prikupljene tijekom zimskog perioda sadržavale su veće udjele nezasićenih masnih kiselina, za razliku od vrsta koje obitavaju u toplijim vodama te posjeduju veći udio zasićenih masnih kiselina (Xu i sur., 1998). Postupak sušenja algi može imati utjecaj na sastav masnih kiselina budući da su Xu i sur. (1998) utvrdili kako su osušeni uzorci algi posjedovali niže udjele PUFAs što ukazuje na činjenicu da su te komponente osjetljive na oksidaciju. Zanimljivo je da u algama roda *Codium* nije utvrđena prisutnost *trans* masnih kiselina koje su poznate po tome da povećavaju rizik od kardiovaskularnih bolesti što čini ove alge poželjnim za primjenu u prehrambenoj industriji (Kumari i sur., 2013; Ferreri i Chatgialiloglu, 2005).

U dostupnoj literaturi ima dosta podataka vezanih za profil masnih kiselina u različitim vrstama roda *Codium*, a u **Tablici 10** prikazana su najznačajnija istraživanja te detektirane masne kiseline iz pojedinih algi.

**Tablica 10** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja masnih kiselina iz različitih vrsta makroalgi roda *Codium*

Makroalge roda <i>Codium</i>	Otapalo/ smjesa otapala	Detektirane masne kiseline	Metoda identifikacije	Literaturna referenca
<i>C. tomentosum</i>	metanol/ kloroform	C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C16:1, C18:1n9c, C16:2, C18:2n6c, C16:3, C16:4, C18:3n9, C18:4, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3	GC-MS	Rey i sur., 2020
<i>C. tomentosum</i>	kloroform/ metanol	C14:0, C16:0, C18:0, C22:0, C24:0, C16:1, C18:1n9c, C16:2, C16:3, C18:2n6c, C18:3n9, C20:3n6, C20:5n3	GC-MS	Da Costa i sur., 2015
<i>C. fragile</i>	metanol s 2 % sumpornom kiselinom	C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C14:1, C16:1, C18:1n9c, C18:2n6c, C16:3, C18:3n6, C18:4, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3	GC-FID	Schmid i sur., 2014

<i>C. dwarkense</i>	kloroform/ metanol/ fosfatni pufer	C14:0, C16:0, C18:0, C16:1, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n6, C18:4	GC-MS	Kumari i sur., 2013
<i>Codium</i> sp., <i>C. fragile</i>	acetil klorid/ metanol, heksan	C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C16:1, C18:1n9c, C20:1n9, C16:2, C18:2n6c, C16:3, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3	GC-MS	Pereira i sur., 2012a
<i>C. dimorphum</i> , <i>C. fernandezianum</i> , <i>C. fragile</i>	heksan, diklormetan	C14:0, C16:0, C16:2, C16:3, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n6, C20:0, C20:4n6, C22:0	GC-MS	Goecke i sur., 2010
<i>C. fragile</i>	metanol/ kloroform/ voda	C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C15:1, C16:1, C18:1n9c, C18:2n6c, C18:3n6, C18:4, C20:4n6, C20:5n3	GC-FID	Ortiz i sur., 2009
<i>C. fragile</i> , <i>C. tomentosum</i> , <i>C. geppi</i> , <i>Codium</i> sp.	kloroform/ metanol	C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C22:0, C16:1, C16:2, C18:1n9c, C18:2n6c, C16:3, C18:3n6, C18:4, C20:2n6, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3, C22:5, C22:6n3	GC-MS	Khotimche nko, 2003
<i>C. duthiae</i> , <i>C. fragile</i> , <i>C. galeatum</i> , <i>C. harveyi</i> , <i>C. muelleri</i> , <i>C. pomoides</i>	metanol/ kloroform	C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C16:1, C18:1n9c, C20:1, C18:2n6c, C16:2, C16:3, C18:3n6, C18:4, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3, C22:4	GC-FID	Xu i sur., 1998

Sifonalne zelene makroalge, među kojima su i Codiaceae, sadrže vrlo neobičan profil karotenoida. Općenito, makroalge sadrže veće koncentracije  $\beta$ -karotena u odnosu na  $\alpha$ -karoten. U slučaju sifonalnih algi  $\alpha$ -karoten je dominantan, dok  $\beta$ -karotena ima vrlo malo ili ga uopće nema. Nadalje, karakteristična je prisutnost sifonaksantina i njegovog estera sifoneina umjesto ili uz lutein koji je glavni ksantofil u zelenim algama i bijkama (Jeffrey, 1968). Pretpostavlja se da je sifonaksantin prije razvijanja ozonskog sloja štutio algu od previsokih UV zračenja (Anderson, 1983; 1985). *C. fragile* sadrži oko 60 % sifonaksantina i sifoneina od ukupnih karotenoida (Benson i Cobb, 1981), dok *C. tomentosum* sadrži 54 % (Marques i sur., 2021). Klorofil *b* je zastupljen u većim koncentracijama od klorofila *a*, a oba su odgovorna za karakterističnu boju zelenih algi (Hegazi, 2002). Visoke koncentracije sifonaksantina i klorofila *b* povezane su s povećanom apsorpcijom svjetla budući da alge roda *Codium* rastu u dubljim i mutnijim vodama u kojima je sunčeva svjetlost ograničena (Marques i sur., 2021). Upravo zbog prisutnog sifonaksantina koji je karakterističan za rod *Codium*, većina istraživanja bavi se upravo određivanjem tog pigmenta u algama. U **Tablici 11** prikazana su najznačajnija

istraživanja i metode ekstrakcije navedenog pigmenta, ali i drugih pigmenata koji su prisutni u nižim koncentracijama.

**Tablica 11** Prikaz najznačajnijih znanstvenih istraživanja pigmenata iz različitih vrsta makroalgi roda *Codium*

Makroalge roda <i>Codium</i>	Otapalo/smjesa otapala	Detektirani pigmenti	Identifikacijska metoda	Literaturna referenca
<i>C. tomentosum</i>	95 % metanol puferiran s 2 % amonijevim acetatom	sifonaksantin, <i>trans</i> -neoksantin, 9- <i>cis</i> -neoksantin, violaksantin, sifonaksantin-dodecenoat, klorofil <i>b</i> , klorofil <i>a</i> , $\beta,\epsilon$ -karoten	HPLC	Marques i sur., 2021
<i>C. tomentosum</i>	95 % metanol puferiran s 2 % amonijevim acetatom	sifonaksantin, <i>trans</i> - i <i>cis</i> - neoksantin, violaksantin, sifonaksantin-dodecenoat, $\beta, \epsilon$ -karoten, klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i>	HPLC	Rey i sur., 2020
<i>C. tomentosum</i>	95 % metanol puferiran s 2 % amonijevim acetatom	sifonaksantin, neoksantin, violaksantin, sifonaksantin- dodecenoat, klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , $\epsilon,\epsilon$ -karoten, $\beta,\epsilon$ - karoten	HPLC	Cruz i sur., 2014
<i>C. intricatum</i>	dimetil-formamid	sifonaksantin, 9- <i>cis</i> -neoksantin, violaksantin, sifonein, klorofil <i>b</i> , klorofil <i>a</i> , $\alpha$ - karoten	HPLC	Uragami i sur., 2014
<i>C. fragile</i>	100 % aceton	lutein, $\beta$ -karoten	HPLC	Ortiz i sur., 2009
<i>C. dwarkense</i>	100 % aceton	klorofilid <i>a</i> , klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , neoksantin, sifonein, sifonaksantin, neoksantin, violaksantin, lutein-5,6-epoksid, lutein, $\alpha$ -karoten, $\beta$ -karoten, feofitin <i>a</i>	HPLC	Hegazi, 2002
<i>C. fragile</i>	100 % aceton	klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , $\alpha$ -karoten, sifonaksantin, sifonein, neoksantin, violaksantin	TLC	Benson i Cobb, 1981

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo te na Katedri za kakvoću hrane na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku i u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu.

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ove doktorske disertacije bio je:

- prikupiti uzorke morskih makroalgi (*Fucus virsoides*, *Amphiroa rigida* i *Codium bursa*) iz Jadranskog mora na lokacijama odabranim od strane stručnjaka ronioca (morskog biologa);
- provesti pripremu uzoraka koja uključuje uklanjanje viška morske vode za dobivanje svježih uzoraka (a), sušenje uzoraka na zraku (b) i liofilizaciju uzoraka (c) te usitnjavanje s ciljem povećanja površine uzorka;
- provesti postupak ekstrakcije najisparljivijih spojeva iz tri makroalge (uzorci a) i b)) pomoću ekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) iz uzoraka a) i b) koristeći vlakna različite polarnosti (polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB), divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS)) kako bi se utvrdila prikladnost polarnosti pojedinog vlakna za određivanje profila isparljivih spojeva u različitim makroalgama;
- provesti izolaciju isparljivih spojeva iz tri makroalge (uzorci a) i b)) pomoću hidrodestilacije (HD) u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u;
- ekstrahirati ukupne lipide metodom po Folch-u iz tri makroalge (uzorak c));
- ekstrahirati, pročistiti i koncentrirati pigmente iz tri makroalge (uzorak c)) pomoću kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE);
- ekstrahirati isparljive spojeve i pigmente iz tri makroalge (uzorak c)) pomoću CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju na laboratorijskom uređaju za superkričnu ekstrakciju (ESCO<sub>2</sub>);
- identificirati isparljive spojeve vezanim sustavom plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS) iz uzoraka dobivenih pomoću HS-SPME, HD i ESCO<sub>2</sub>;
- identificirati i kvantificirati masne kiseline metodom plinske kromatografije s plameno-ionizirajućim detektorom (GC-FID) iz ekstrakata ukupnih lipida;
- identificirati i kvantificirati pigmente u ekstraktima makroalgi primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-PDA);
- spektrofotometrijski odrediti ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima makroalgi.



## 3.2. MATERIJALI

### 3.2.1. *Fucus virsoides*

Smeđa makroalga *Fucus virsoides* J. Agardh 1868 (**Slika 7**) prikupljena je u središnjem dijelu Jadranskog mora, u blizini jugozapadne obale Novigradskog mora (44° 12' 02" N; 15° 28' 51" E), u veljači 2021. godine. Uzorak je prikupljen s dubine od 0,5 m.



**Slika 7** *Fucus virsoides* (Izvor: ronilac Donat Petricioli)

### 3.2.2. *Amphiroa rigida*

Crvena makroalga *Amphiroa rigida* J.V. Lamouroux (**Slika 8**) prikupljena je u središnjem dijelu Jadranskog mora, u blizini Zadra, plaža Šepurine (44° 12' 42" N; 15° 09' 23" E), u rujnu 2020. godine. Uzorak je prikupljen s dubine od 2 m.



**Slika 8** *Amphiroa rigida* (Izvor: ronilac Donat Petricioli)

### 3.2.3. *Codium bursa*

Zelena makroalga *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh (**Slika 9**) prikupljena je u središnjem dijelu Jadranskog mora u blizini otoka Iški Mrtovnjak (44° 00' 36" N; 15° 10' 36" E), u svibnju 2018. godine. Uzorak je prikupljen s dubine od 10 do 15 m.



**Slika 9** *Codium bursa* (Izvor: ronilac Donat Petricioli)

### 3.2.4. Kemikalije i standardi

- Vlakna (PDMS/DVB i DVB/CAR/PDMS) korištena za HS-SPME kupljena su od tvrtke Supelco Co. (Bellefonte, PA, SAD).
- Za trap organskog otapala tijekom HD korištena su otapala pentan i dietil-eter (Kemika, Zagreb).
- Za GC-MS analizu isparljivih spojeva korišten je helij čistoće 99,999 % proizvođača Messer Croatia Plin (Dugi rat, Hrvatska).
- Za ekstrakciju ukupnih lipida korišteni su metanol HPLC čistoće (J.T. Baker, Nizozemska), kloroform (p.a. čistoće, Carlo Erba Reagents, Francuska) i 0,9 %-tna vodena otopina natrij klorida (Merck, Njemačka).
- Za SPE korištena je ultračista voda te metanol i diklormetan HPLC čistoće (J. T. Baker, Milano, Italija). C<sub>18</sub> prah koji je pomiješan s dobivenim ekstraktima kupljen je od tvrtke FischerScientific (Massachusetts, SAD). Dušik tip 5.0 (čistoće 99,999 %) korišten za uparavanje ekstrakata kupljen je od proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).
- Za ESCO<sub>2</sub> korišten je CO<sub>2</sub> čistoće 99,97 % proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).

- Za pripremu uzoraka za GC-MS analizu CO<sub>2</sub> ekstrakata makroalgi korišten je *n*-heksan (J. T. Baker, Milano, Italija).
- Za pripremu metilnih estera masnih kiselina korišten je *n*-heptan čistoće 99 % (Carlo Erba Reagents, Francuska) i 2 mol/L otopina kalijevog hidroksida u metanolu. Metilni esteri masnih kiselina C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> korišteni za identifikaciju i kvantifikaciju masnih kiselina u makroalgama kupljeni su od tvrtke Supelco Co. (Bellefonte, PA, SAD).
- Za GC-FID analizu masnih kiselina korišteni su dušik, vodik i zrak čistoće 99,999 % proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).
- Za pripremu uzoraka za HPLC analizu frakcija dobivenih pomoću SPE i CO<sub>2</sub> ekstrakata makroalgi te kao mobilne faze tijekom HPLC analize korišteni su metanol, izopropanol HPLC čistoće (J. T. Baker, Milano, Italija) i ultračista voda.
- HPLC standardi α-karoten (čistoće ≥ 97 %), klorofil *a* (čistoće ≥ 95 %), lutein (čistoće ≥ 96 %) i fukoksantin (čistoće ≥ 97 %) kupljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, SAD), a β-karoten (čistoće ≥ 95 %) je kupljen od tvrtke dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka).
- Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata korišten je metanol HPLC čistoće (J. T. Baker, Milano, Italija).

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema uzoraka makroalgi

Nakon prikupljanja uzoraka morskih makroalgi, uzorci su stavljeni u nepropusne plastične vrećice koje su sadržavale okolnu morsku vodu i odmah su transportirane u laboratorij.

Prije HS-SPME i HD uzorci su držani u mraku na 4 °C te su postupci izolacije isparljivih spojeva bili provedeni u roku od 48 h nakon prikupljanja. Alge su izrezane na manje komadiće te su stavljene između filter papira kako bi se uklonio višak morske vode (morska voda nije bila potpuno uklonjena) i takav uzorak predstavljao je svježi uzorak koji je korišten za HS-SPME i HD. Nadalje, dio uzoraka podvrgnut je sušenju na zraku u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 14 dana te se kao takav osušen koristio za HS-SPME i HD.

Za ekstrakciju masnih kiselina i pigmenata, svježi uzorci podvrgnuti su postupku liofilizacije. Za postupak sušenja zamrzavanjem, uzorci su isprani tri puta u demineraliziranoj vodi prije nego što su bili izrezani na manje komadiće te su nakon toga zamrznuti na -20 °C tijekom 24 h. Plitice sa zamrznutim uzorcima stavljene su u laboratorijski liofilizator (Martin Christ, Alpha 2-4 LSCplus, Osterode am Harz, Njemačka). Postupak je proveden tijekom 96 h pod visokim vakuumom (0,5-1,81 hPa) s primarnom temperaturom sušenja od -20 °C i sekundarnom

temperaturom od 20 °C. Liofilizirani uzorci su se potom usitnili na laboratorijskom mlinu (MRC Sample mill C-SM/450-C, Holon, Izrael) i dalje koristili za određivanje sadržaja masnih kiselina i pigmenata.

### 3.3.2. Izolacija isparljivih spojeva iz odabranih vrsta makroalgi

#### 3.3.2.1. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME)

Tijekom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi, vršne pare se skupljanju u prostoru iznad uzorka koji se nalazi u hermetički zatvorenoj bočici tzv. vijalici. Najčešći polimerni materijali koji se upotrebljavaju za vlakno su polidimetilsiloksan, divinilbenzen, Carbowax i poliakrilat. Na ekstrakciju spojeva može se utjecati odabirom najpogodnijeg vlakna za spojeve određene polarnosti, isparljivosti i veličine (Harvey, 2000).

Za ekstrakciju vršnih para iz odabranih vrsta makroalgi odabrana su dva vlakna različite polarnosti: PDMS/DVB (debljine filma 65 µm, Supelco Co., SAD) i DVB/CAR/PDMS (debljine filma 50/30 µm, Supelco Co., SAD). Prije upotrebe bilo je potrebno aktivirati navedena vlakna, a to je učinjeno u skladu s uputama proizvođača. Plavo vlakno aktivirano je kondicioniranjem 30 min na 250 °C, a sivo vlakno 60 min na 270 °C i to uvođenjem igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon provedenog postupka kondicioniranja, vlakna su korištena za ekstrakciju vršnih para iz uzoraka makroalgi.

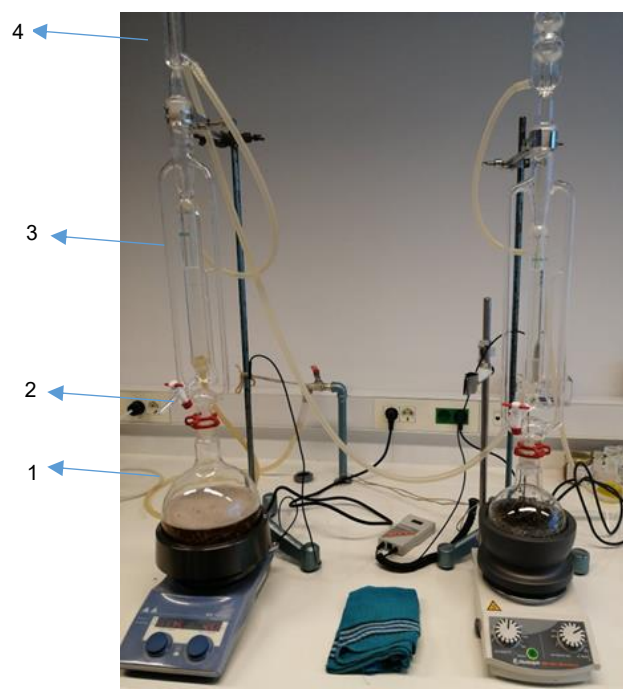
U staklenu bočicu volumena 5 mL stavljen je 1 g pripremljenog uzorka makroalgi te je bočica nakon toga hermetički zatvorena čepom sa septom. Vijalice su se 15 min nalazile u vodenoj kupelji zagrijanoj na 60 °C, nakon čega je provedeno uzorkovanje vršnih para (45 min) pomoću vlakna koje je uvedeno iznad uzorka. Nakon uzorkovanja, vlakno je uvučeno u iglu i prenešeno do GC-MS injektora (250 °C) za termalnu desorpciju tijekom 6 min izravno u GC kolonu (**Slika 10**). Postupak je proveden u tri ponavljanja posebno za svježe i suhe uzorke makroalgi.



**Slika 10** Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (automatski sustav) zajedno s vezanim sustavom plinska kromatografija i spektrometrija masa (Izvor: autor)

### 3.3.2.2. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u (HD)

Hidrodestilacija je provedena u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u (Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Njemačka) s trapom organskog otapala (1 mL pentan:dietil-eter, 1:2 v/v) tijekom 2 h (**Slika 11**).



**Slika 11** Aparatura za hidrodestilaciju po Clevenger-u: 1) grijaće tijelo; 2) tikvica s okruglim dnom; 3) aparatura po Clevenger-u; 4) hladilo (Izvor: autor)

U tikvicu s okruglim dnom zasebno je dodano 10 g svježih (odnosno suhih) uzoraka makroalgi izrezanih na male komadiće. Hidrodestilat se skupljao u trapu organskog otapala te je odvojen pipetom i propušten je kroz sloj magnezijevog sulfata u malom staklenom lijevku te koncentriran u struji dušika do volumena 0,2 mL. Postupak je proveden u tri ponavljanja posebno za svježe i suhe uzorke makroalgi. 2  $\mu$ L uzorka korišteno je za GC-MS analizu.

### **3.3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida metodom po Folch-u**

Ekstrakcija ukupnih lipida iz liofiliziranih uzoraka odabranih vrsta makroalgi provedena je metodom po Folch-u (Folch i sur., 1957). 1 g uzorka pomiješan je s 20 mL smjese otapala kloroform:metanol (2:1, v/v) te je smjesa podvrgnuta miješanju tijekom 20 min pri 400 rpm (IKA, KS 260 Basic, Staufen, Njemačka). Nakon miješanja, uzorci su filtrirani kroz filter papir i pomiješani s 4 mL 0,9 %-tne otopine natrijevog klorida. Nakon što su se faze odvojile, gornja faza je uklonjena, a donja kloroformska faza koja sadrži lipide uparena je na rotacijskom vakuum uparivaču (Laborota 4010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Njemačka) na 60 °C. Dobiveni uzorci lipida osušeni su u sušioniku na 105 °C do konstantne mase. Postupak je proveden u tri ponavljanja.

Tako dobivene ekstrakte bilo je potrebno pripremiti za GC-FID analizu. Provedena je transesterifikacija masnih kiselina za dobivanje metilnih estera masnih kiselina (FAME) pomoću otopine kalijevog hidroksida u metanolu, prema postupku opisanom u Prilogu X.B Uredbe Komisije br. 796/2002 (EZ, 2002). U dobivene osušene uzorke lipida dodano je 2 mL heptana i zatim promiješano 30 sekundi, a nakon toga dodano je 0,2 mL 2 mol/L otopine kalijevog hidroksida u metanolu te ponovno promiješano 30 sekundi. Nakon odvajanja slojeva, pomoću pipete gornji heptanski sloj koji sadrži metilne estere profiltriran je u vijalicu i kao takav injektiran je u plinski kromatograf za analizu profila masnih kiselina.

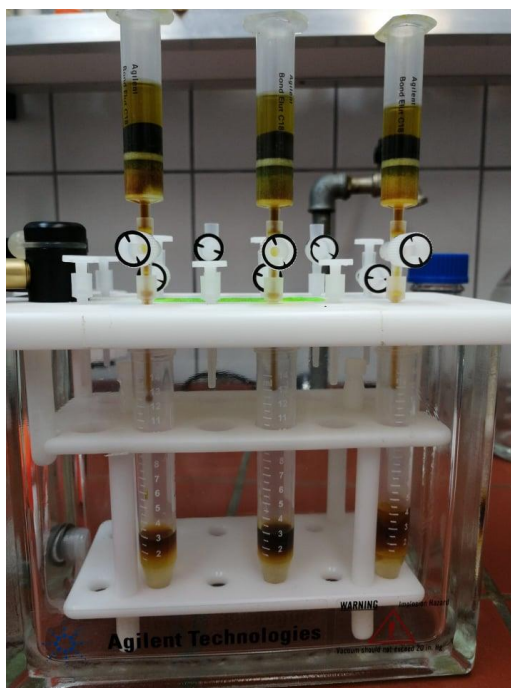
### **3.3.4. Ekstrakcija pigmenata iz odabranih vrsta makroalgi pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE)**

Ekstrakcija na čvrstoj fazi koristi se prvenstveno za ekstrakciju, koncentriranje i pročišćavanje uzoraka. Tijekom ekstrakcije koriste se kolone punjene različitim čvrstim sorpcijskim materijalom kojeg najčešće čine sitne porozne čestice silikagela s vezanom organskom fazom. Propuštanje uzorka kroz kolonu omogućuje vezanje željenih spojeva za čvrstu fazu, a koji se kasnije uklanjaju s kolone ispiranjem sa odgovarajućim otapalom. Eluirani spojevi skupljaju se u obliku frakcija u kolektoru unutar vakuum komore.

Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji (Elma, Elmasonic P 70 H, 37 kHz/50 W, Singen, Njemačka) na liofiliziranim uzorcima makroalgi na sobnoj temperaturi sa smjesom otapala metanol:diklormetan (1:1, v/v) i omjerom tekuće:kruto 10 mL/g, tri puta po 5 min. Nakon toga,

uzorak je filtriran kroz filter papir i pomiješan s C<sub>18</sub> prahom (Macherey-Nagel Polygoprep 60-50, C<sub>18</sub>, 40–63 μm). Smjesa je podvrgnuta uparavanju pod dušikom kako bi se uklonilo otapalo. SPE kolona (C<sub>18</sub>, 1 g, 6 mL, 40 μm; Agilent Bond Elut, Waldbronn, Njemačka) je prije ekstrakcije kondicionirana pomoću 12 mL metanola i 12 mL vode, a nakon toga je suhi ekstrakt zajedno s C<sub>18</sub> prahom prenesen na kolonu. Uzorak je eluiran pomoću 12 mL otapala različite polarnosti: frakcija 1 (F1) – voda; frakcija 2 (F2) – metanol:voda (1:1, v/v); frakcija 3 (F3) – metanol; frakcija 4 (F4) – metanol:diklormetan (1:1, v/v) (**Slika 12**).

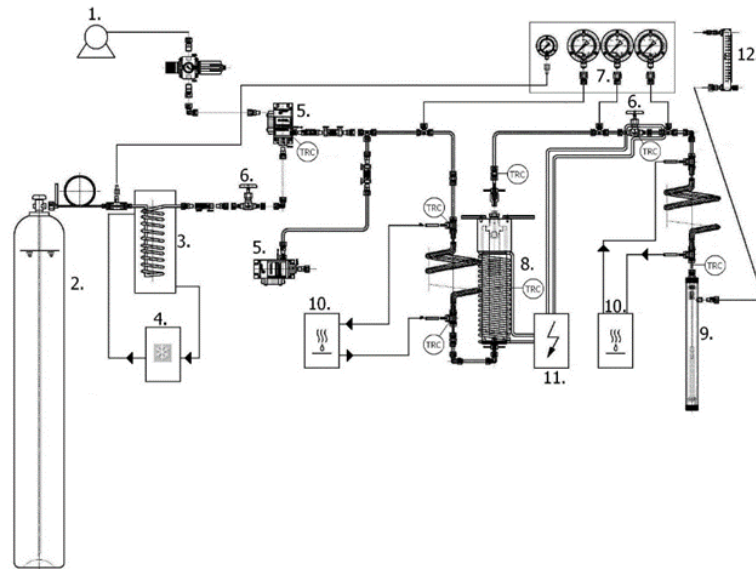
Polarni spojevi eluirani su u F1 i F2 što je dovelo do boljeg pročišćavanja i dobivanja veće koncentracije spojeva od interesa, u ovom slučaju pigmentata. Frakcijama F3 i F4 uklonjeno je otapalo pomoću SpeedVac-a (SPD1030, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) te su pohranjene na 4 °C do HPLC analize. Postupak je proveden u tri ponavljanja za pojedinu makroalgu.



**Slika 12** Sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Izvor: autor)

### **3.3.5. Ekstrakcija isparljivih spojeva i pigmentata iz makroalgi pomoću CO<sub>2</sub> u superkričnom stanju (ESCO<sub>2</sub>)**

Ekstrakcija isparljivih spojeva i pigmentata iz liofiliziranih uzoraka makroalgi provela se na uređaju za ekstrakciju superkričnim fluidima čija je shema dana na **Slici 13**.



**Slika 13** Shematski prikaz uređaja za superkritičnu ekstrakciju (Aladić, 2015)

1. Kompresor; 2. CO<sub>2</sub> spremnik; 3. Izmjenjivač toplote od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

Komprimirani CO<sub>2</sub> uvodio se u ekstraktor pomoću visokotlačne pumpe, a prethodno je pothlađen na -5 °C pomoću rashladne kupelji. Pomoću istostrujnog izmjenjivača toplote stlačeni CO<sub>2</sub> se zagrijavao na željenu temperaturu ekstrakcije i uvodio u ekstraktor u kojem se nalazio suhi materijal (usitnjeni liofilizirani uzorci makroalgi). Ekstraktor se zagrijavao pomoću centraliziranog sustava grijača na željenu temperaturu ekstrakcije. Tijekom postupka SC-CO<sub>2</sub> zajedno s ekstraktom odlazio je do reduksijskog ventila gdje se tlak snižavao na tlak separacije od 1,5 MPa i temperaturu od 25 °C (Mujić i Jokić, 2018; Aladić, 2015). Dobiveni ekstrakt skupljao se na dnu separatora i čuvao na 4 °C do analiza.

Prema preliminarnim istraživanjima za ekstrakciju isparljivih spojeva i pigmenta iz odabranih vrsta makroalgi odabrani su sljedeći uvjeti ekstrakcije: tlak 30 MPa, temperatura 40 °C i vrijeme ekstrakcije 60 min, uz maseni protok CO<sub>2</sub> od 2 kg/h. Masa makroalgi (liofilizirani uzorci) korištena za ekstrakciju bila je 100 g. Dobiveni ekstrakti korišteni su za GC-MS analizu isparljivih spojeva i HPLC analizu pigmenta.

### **3.3.6. Identifikacija isparljivih spojeva vezanim sustavom plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS)**

Analiza isparljivih spojeva provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS), a identifikacija spojeva na kromatogramu postignuta je usporedbom retencijskih indeksa (RI) u odnosu na vrijeme zadržavanja *n*-alkana (C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub>), s onima objavljenim u literaturi (National Institute of Standards and Technology) i njihovim



masenim spektrima u usporedbi sa spektrima dostupnim u bazama podataka Wiley 9 (Wiley, New York, NY, SAD) i NIST 17 (Gaithersburg, SAD). Postotci identificiranih spojeva izraženi su kao srednja vrijednost rezultata tri GC-MS analize svakog uzorka.

Analiza plinskom kromatografijom provedena je koristeći Agilent Technologies (Palo Alto, Kalifornija, SAD) plinski kromatograf model 7820A u kombinaciji s masenim detektorom 5977E (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, SAD) spojenim na računalo i kapilarnom kolonom HP-5MS (Agilent Technologies, J&W, Santa Clara, SAD) (**Slika 14**). GC-MS uvjeti analize prikazani su u **Tablici 12**.



**Slika 14** Vezani sustav plinska kromatografija i spektrometrija masa (GC-MS) (Izvor: autor)

**Tablica 12** GC-MS uvjeti za analizu isparljivih spojeva u makroalgama

<b>GC kolona</b>	HP-5MS nepolarna kapilarna kolona (5 % fenil-metilpolisiloksan stacionarna faza; 30 m duljina; 0,25 mm unutarnji promjer; 0,25 $\mu$ m debljina stacionarne faze)
<b>Plin nositelj</b>	helij, protok: 1 mL/min
<b>Injektor</b>	temperatura: 250 °C, omjer cijepanja: 1:50
<b>Temperaturni program kolone</b>	70°C izotermno 2 min; porast od 70 °C do 200°C po 3 °C/min; 200 °C izotermno 15 min
<b>Uvjeti rada MS detektora</b>	temperatura: 300 °C, energija ionizacije: 70 eV, interval snimanja masa: 30-300 masenih jedinica

### 3.3.7. Identifikacija i kvantifikacija masnih kiselina metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID)

FAMEs pripremljeni prema postupku opisanom u odlomku 3.3.3. podvrgnuti su analizi na plinskom kromatografu Shimadzu GC-2010 Plus s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) i kapilarnom kolonom SH-Rtx-Wax (Shimadzu, Kyoto, Japan) (**Slika 15**). Identifikacija

odvojenih FAMEs u uzorcima postignuta je na temelju usporedbe vremena zadržavanja s retencijskim vremenima certificiranog referentnog standarda (Supelco F.A.M.E. Mix C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>) analiziranog pri istim uvjetima. Rezultati identificiranih masnih kiselina izraženi su u postotcima kao srednja vrijednost tri ponavljanja s obzirom na ukupni postotak masnih kiselina (%). Uvjeti tijekom GC-FID analize prikazani su u **Tablici 13**.



**Slika 15** GC-FID sustav korišten za identifikaciju i kvantifikaciju masnih kiselina u makroalgama (Izvor: autor)

**Tablica 13** GC-FID uvjeti za analizu profila masnih kiselina u makroalgama

<b>GC kolona</b>	SH-Rtx-Wax kapilarna kolona (30 m duljina; 0,25 mm unutarnji promjer; 0,25 µm debljina stacionarne faze)
<b>Plin nositelj</b>	dušik, protok: 1,33 mL/min
<b>Injektor</b>	temperatura: 250 °C, volumen injektiranog uzorka: 2 µL, omjer cijepanja: 1:10
<b>Temperaturni program kolone</b>	110 °C izotermno 2 min; porast od 110 °C do 175 °C po 10 °C/min, 8 min; porast od 175 °C do 210 °C po 5 °C/min, 5 min; porast od 210 °C do 230 °C po 5 °C/min; 230 °C izotermno 7 min
<b>Uvjeti rada FID detektora</b>	temperatura: 300 °C, protok vodika: 40 mL/min, protok zraka: 400 mL/min; protok dušika: 30 mL/min

### 3.3.8. Određivanje pigmenata u ekstraktima makroalgi

3.3.8.1. Identifikacija i kvantifikacija pigmenata primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Za analizu pigmenata u ekstraktima makroalgi korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) opremljen kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), uređajem za automatsko injektiranje (G7129A), detektorom s

nizom dioda (PDA detektor, G7115A) i sakupljačem frakcija (G1364E) (**Slika 16**). Sustavom se upravlja i podaci se obrađuju pomoću računalnog programa ChemStation.



**Slika 16** HPLC sustav korišten za identifikaciju i kvantifikaciju pigmenata u ekstraktima makroalgi (Izvor: autor)

Navedeni sustav korišten je za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju klorofila i karotenoida iz frakcija F3 i F4 dobivenih pomoću SPE te CO<sub>2</sub> ekstrakata. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone YMC-C30 (YMC Europe, Schernbeck, Njemačka), duljine 250 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 5 μm. Smjesa otapala metanol:izopropanol:voda (90:7:3, v/v/v) korištena je kao A mobilna faza, dok je smjesa metanol:izopropanol (10:90, v/v) korištena kao B mobilna faza prema sljedećem gradijentu: 0 % B; 50 min, 100 % B i 60 min, 0 % B. Protok je iznosio 0–50 min, 0,6–0,8 mL/min i 50–60 min, 0,8 mL/min, volumen injektiranja bio je 30 μL, dok su pigmenti detektirani na 450 i 660 nm (snimljeni spektri od 350 do 660 nm pomoću PDA detektora). Korištena metoda modifikacija je iz znanstvenog rada Castro-Puyana i sur. (2017).

Identifikacija karotenoida i klorofila provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova sa standardima pigmenata, dok je kvantifikacija izvršena pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja. Standardne kalibracijske krivulje za α-karoten (linearnost R<sup>2</sup>=0,99189), β-karoten (linearnost R<sup>2</sup>=0,98610), klorofil a (linearnost R<sup>2</sup>=0,99934), lutein (linearnost R<sup>2</sup>=0,99630) i fukoksantin (linearnost R<sup>2</sup>=0,99967) dobivene su pripremom otopina u koncentracijskom rasponu od 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 500,0 μg/mL s odgovarajućim razrjeđivanjem matične otopine. Uzorci ekstrakata su razrijeđeni do koncentracije 20 mg/mL u smjesi otapala metanol:izopropanol:voda (90:7:3, v/v/v), profiltrirani kroz 0,20 μm politetrafluoroetilen (PTFE) filtere te podvrgnuti HPLC analizi.

### 3.3.8.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida

Za određivanje ukupnih koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida korištene su jednadžbe iz rada Lichtenthaler i Buschmann (2001). Frakcije F3 i F4 dobivene pomoću SPE i CO<sub>2</sub> ekstrakti upareni su na SpeedVac-u te su razrijeđeni u metanolu na koncentraciju 10 mg/mL. Tako pripremljeni uzorci profiltrirani su kroz 0,20 µm PTFE filter direktno u kivetu za spektrofotometrijsko određivanje pigmenata. Spektrofotometrijska mjerenja provedena su na UV/VIS spektrofotometru Boeco S-220 (Hamburg, Njemačka).

Apsorbancije su izmjerene pri 665,2 nm jer pri toj valnoj duljini klorofil *a* pokazuje maksimalnu apsorbanciju, zatim pri 652,4 nm koja predstavlja maksimum apsorbancije klorofila *b* te pri 470 nm što je maksimalna apsorbancija karotenoida. Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja. Količina navedenih pigmenata (µg/mL) izračunata je prema sljedećima jednadžbama:

$$c_a = 16,82 \times A_{665,2} - 9,28 \times A_{652,4} \quad (1)$$

$$c_b = 36,92 \times A_{652,4} - 16,54 \times A_{665,2} \quad (2)$$

$$c_{(x+c)} = \frac{1000 \times A_{470} - 1,91 \times c_a - 95,15 \times c_b}{225} \quad (3)$$

## **4. REZULTATI**

Prikaz rezultata rada podijeljen je u cjeline s obzirom na tri odabrane makroalge:

- Rezultati istraživanja provedenih na smeđoj algi *Fucus virsoides*
- Rezultati istraživanja provedenih na crvenoj algi *Amphiroa rigida*
- Rezultati istraživanja provedenih na zelenoj algi *Codium bursa*

## 4.1. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA SMEĐOJ ALGI *Fucus virsoides*

### 4.1.1. GC-MS analiza isparljivih spojeva vršnih para izoliranih koristeći HS-SPME

Tablica 14 Vršne pare makroalge *F. virsoides* izolirane koristeći HS-SPME

Br.	Spoj	RI	I SV ± SD	II SV ± SD	III SV ± SD	IV SV ± SD
1.	heksanal	< 900	-	1,14 ± 0,03	-	0,72 ± 0,01
2.	3-metilbutanska kiselina	< 900	-	0,25 ± 0,02	-	-
3.	heptanal	901	-	1,41 ± 0,02	-	0,60 ± 0,02
4.	(E)-hept-2-enal	962	-	0,35 ± 0,01	-	-
5.	benzaldehyd	968	-	1,43 ± 0,04	-	1,18 ± 0,03
6.	okt-1-en-3-on	983	-	0,18 ± 0,01	-	0,14 ± 0,01
7.	okt-1-en-3-ol	983	-	0,87 ± 0,02	-	0,52 ± 0,01
8.	6-metilhept-5-en-2-on	988	-	0,47 ± 0,02	-	-
9.	oktanal	1003	-	0,56 ± 0,01	-	-
10.	benzil-alkohol	1044	-	19,67 ± 0,42	-	15,75 ± 0,51
11.	nonanal	1106	-	3,36 ± 0,05	-	1,98 ± 0,02
12.	tridekan	1300	-	0,89 ± 0,01	-	1,66 ± 0,02
13.	pentadec-1-en	1493	17,98 ± 0,82	-	11,00 ± 0,50	-
14.	pentadekan	1500	61,90 ± 1,51	60,27 ± 2,00	71,55 ± 1,98	71,43 ± 1,84
15.	tridekanal	1511	-	1,13 ± 0,02	5,45 ± 0,10	1,03 ± 0,03
16.	(E)-tridec-7-en	1517	9,12 ± 0,80	-	-	-

I – svježi uzorak analiziran pomoću DVB/CAR/PDMS vlakna; II – svježi uzorak analiziran pomoću PDMS/DVB vlakna; III – suhi uzorak analiziran pomoću DVB/CAR/PDMS vlakna; IV – suhi uzorak analiziran pomoću PDMS/DVB vlakna; RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; - spoj nije detektiran.

## 4.1.2. GC-MS analiza isparljivih spojeva izoliranih koristeći HD

Tablica 15 Isparljivi spojevi hidrodestilata makroalge *F. virsoides*

Br.	Spoj	RI	I SV ± SD	II SV ± SD
1.	(E)-heks-2-enal	< 900	-	1,13 ± 0,03
2.	heptanal	901	-	0,86 ± 0,05
3.	(Z)-hept-2-enal	961	0,32 ± 0,01	0,42 ± 0,02
4.	benzaldehyd	968	0,09 ± 0,01	0,69 ± 0,02
5.	okt-1-en-3-ol	983	-	0,73 ± 0,03
6.	oktan-2,3-dion	985	-	0,24 ± 0,01
7.	2-pentilfuran	993	0,15 ± 0,01	0,70 ± 0,02
8.	(E,E)-hepta-2,4-dienal	999	-	0,28 ± 0,01
9.	oktanal	1003	-	0,23 ± 0,01
10.	(E,Z)-hepta-2,4-dienal	1007	-	0,13 ± 0,01
11.	(Z,Z)-hepta-2,4-dienal	1015	-	0,63 ± 0,05
12.	2,2,6-trimetil-cikloheksan	1040	0,01 ± 0,01	0,22 ± 0,03
13.	benzil-alkohol	1044	0,62 ± 0,05	0,67 ± 0,05
14.	fenilacetaldehyd	1050	0,54 ± 0,03	0,87 ± 0,02
15.	(E)-okt-2-enal	1062	-	0,45 ± 0,02
16.	(E)-okt-2-en-1-ol	1073	-	0,32 ± 0,02
17.	(E,E)-okta-3,5-dien-2-on	1074	-	0,44 ± 0,08
18.	oktan-1-ol	1076	-	0,18 ± 0,01
19.	nonan-2-on	1094	-	0,95 ± 0,03
20.	(E,Z)-okta-3,5-dien-2-on	1095	-	0,20 ± 0,01
21.	nonanal	1106	0,52 ± 0,02	3,48 ± 0,08
22.	2,6-dimetilcikloheksanol	1111	-	0,74 ± 0,02
23.	4-ketoizoforon	1148	0,89 ± 0,03	1,36 ± 0,05
24.	(E,E)-nona-2,6-dienal	1157	-	0,09 ± 0,01
25.	5-metilundekan	1159	-	0,14 ± 0,01
26.	(E)-non-2-enal	1163	-	0,26 ± 0,01
27.	dodec-1-en	1193	0,03 ± 0,01	0,20 ± 0,03
28.	dekanal	1207	-	0,27 ± 0,02
29.	β-ciklocitral	1224	0,15 ± 0,01	0,75 ± 0,04
30.	benzotiazol	1228	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,01
31.	fenilpropanitril	1245	-	0,45 ± 0,03
32.	β-homociklocitral	1260	-	0,31 ± 0,02
33.	(E)-dec-2-enal	1265	3,48 ± 0,05	1,34 ± 0,07
34.	(E,Z)-deka-2,4-dienal	1295	0,32 ± 0,01	0,51 ± 0,02
35.	1H-indol	1301	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,01

36.	undekanal	1308	-	0,64 ± 0,03
37.	( <i>E,E</i> )-deka-2,4-dienal	1320	0,66 ± 0,01	2,23 ± 0,04
38.	tetradec-1-en	1393	0,12 ± 0,01	-
39.	dodekanal	1410	-	3,16 ± 0,01
40.	α-jonon	1430	-	0,79 ± 0,01
41.	( <i>E</i> )-geranil-aceton	1455	-	0,50 ± 0,02
42.	dodekan-1-ol	1480	-	1,47 ± 0,05
43.	β-jonon		0,77 ± 0,04	5,80 ± 0,06
44.	pentadec-1-en	1493	19,32 ± 1,21	1,54 ± 0,02
45.	pentadekan	1500	5,87 ± 0,04	3,28 ± 0,03
46.	tridekanal	1511	2,67 ± 0,01	18,51 ± 1,10
47.	( <i>E</i> )-pentadec-7-en	1517	8,35 ± 0,12	3,16 ± 0,08
48.	tridekan-1-ol	1581	-	0,59 ± 0,02
49.	tetradekanal	1614	0,51 ± 0,01	1,01 ± 0,05
50.	( <i>E</i> )-heptadec-8-en	1679	0,61 ± 0,01	-
51.	γ-dodekalakton	1681	3,31 ± 0,08	2,20 ± 0,21
52.	( <i>Z</i> )-heptadec-3-en	1688	6,07 ± 0,51	1,23 ± 0,11
53.	heptadec-1-en	1694	5,05 ± 0,51	0,91 ± 0,02
54.	heptadekan	1700	0,95 ± 0,01	-
55.	pentadekanal	1716	1,34 ± 0,22	4,09 ± 0,11
56.	miristinska kiselina	1778	3,07 ± 0,03	4,77 ± 0,11
57.	heksahidrofarnezil-aceton	1848	2,23 ± 0,11	1,59 ± 0,10
58.	palmitinska kiselina	1973	-	2,69 ± 0,08
59.	heksadekanal	1917	1,31 ± 0,04	-
60.	dibutil-ftalat	1961	0,33 ± 0,05	0,20 ± 0,01
61.	( <i>Z,Z,Z</i> )-oktadeka-9,12,15-trien-1-ol (linolenski alkohol)	2042	12,89 ± 1,01	5,08 ± 0,21
62.	fitol	2115	7,19 ± 0,82	4,06 ± 0,11

I – hidrodestilat svježeg uzorka; II – hidrodestilat suhog uzorka; RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; - spoj nije detektiran.



### 4.1.3. GC-MS analiza isparljivih spojeva ekstrahiranih pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Tablica 16 Isparljivi spojevi CO<sub>2</sub> ekstrakta makroalge *F. virsoides*

Br.	Spoj	RI	%
1.	pentanska kiselina	< 900	0,01
2.	kapronska kiselina	< 900	0,75
3.	oktanal	997	0,04
4.	heptanska kiselina	1084	0,03
5.	nonanal	1104	0,11
6.	kaprilna kiselina	1181	0,03
7.	dekanal	1206	0,01
8.	3-etil-4-metil-1H-pirol-2,5-dion	1237	0,07
9.	( <i>E</i> )-dec-2-enal	1264	0,03
10.	nonanska kiselina	1278	0,05
11.	<i>p</i> -anetol	1287	0,04
12.	( <i>E,E</i> )-deka-2,4-dienal	1294	0,07
13.	( <i>Z,Z</i> )-deka-2,4-dienal	1317	0,05
14.	<i>trans</i> -β-kariofilen	1417	0,07
15.	α-humulen	1452	0,01
16.	β-jonon	1485	0,08
17.	pentadec-1-en	1492	0,01
18.	pentadekan	1500	1,56
19.	dihidroaktinidiolid	1526	0,13
20.	laurinska kiselina	1570	0,09
21.	kariofilen oksid	1580	0,07
22.	tridekanska kiselina	1667	0,04
23.	heptadec-1-en	1694	0,07
24.	heptadekan	1700	0,07
25.	metil-miristat	1727	0,32
26.	loliolid	1762	0,34
27.	miristinska kiselina	1771	22,38
28.	heksahidrofarnezil-aceton	1846	0,13
29.	pentadekanska kiselina	1866	0,71
30.	heksadekan-1-ol	1880	0,31
31.	metil-palmitat	1927	0,20
32.	palmitoleinska kiselina	1949	1,10
33.	palmitinska kiselina	1976	18,24
34.	oleinska kiselina	2140	31,36
35.	stearinska kiselina	2159	6,87
36.	<i>cis</i> -oktadec-13-enska kiselina	2185	1,44

RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); % –postotak površine kromatograma.

## 4.1.4. GC-FID analiza sastava masnih kiselina

Tablica 17 Sastav masnih kiselina makroalge *F. virsoides*

Br.	Masna kiselina		SV ± SD (%)
1.	miristinska kiselina	C14:0	17,80 ± 0,14
2.	pentadekanska kiselina	C15:0	0,23 ± 0,01
3.	palmitinska kiselina	C16:0	17,98 ± 0,17
4.	heptadekanska kiselina	C17:0	0,14 ± 0,01
5.	stearinska kiselina	C18:0	3,78 ± 0,10
6.	arahidska kiselina	C20:0	0,92 ± 0,01
7.	behenska kiselina	C22:0	0,54 ± 0,02
8.	lignocerinska kiselina	C24:0	2,63 ± 0,10
	<b>Zasićene masne kiseline</b>		<b>44,01</b>
9.	miristoleinska kiselina	C14:1	0,10 ± 0,01
10.	palmitoleinska kiselina	C16:1	0,78 ± 0,01
11.	<i>cis</i> -10-heptadekanska kiselina	C17:1	0,16 ± 0,01
12.	oleinska + elaidična kiselina	C18:1n9t + C18:1n9c	50,69 ± 0,21
13.	<i>cis</i> -11-eikosenska kiselina	C20:1n9	0,65 ± 0,10
14.	eručna kiselina	C22:1n9	0,32 ± 0,01
	<b>Mononezasićene masne kiseline</b>		<b>51,73</b>
15.	<i>cis</i> -linolna kiselina	C18:2n6c	0,10 ± 0,00
16.	α-linolenska kiselina	C18:3n3	0,28 ± 0,01
17.	γ-linolenska kiselina	C18:3n6	0,42 ± 0,02
18.	eikosadienska kiselina	C20:2n6	0,13 ± 0,00
19.	eikosatrienska kiselina	C20:3n6	0,16 ± 0,01
20.	arahidonska kiselina	C20:4n6	0,81 ± 0,06
21.	eikosapentaenska kiselina	C20:5n3	0,86 ± 0,03
22.	dokosaheksaenska kiselina	C22:6n3	0,30 ± 0,01
	<b>Polinezasićene masne kiseline</b>		<b>4,26</b>
	<b>ω3 masne kiseline</b>		<b>1,45</b>
	<b>ω6 masne kiseline</b>		<b>2,81</b>

SV – srednje vrijednosti izražene u postotcima (%) dobivene iz tri ponavljanja zajedno sa SD

#### 4.1.5. HPLC analiza pigmenata

**Tablica 18** Koncentracija fukoksantina dobivenog u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *F. virsoides*

Pigment	F3 SV ± SD (mg/g suhe frakcije)	F4 SV ± SD (mg/g suhe frakcije)
fukoksantin	6,15 ± 0,30	n.k.

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhe frakcije zajedno sa SD; n.k. – nije kvantificirano.

**Tablica 19** Koncentracija fukoksantina dobivenog u CO<sub>2</sub> ekstraktu iz makroalge *F. virsoides*

Pigment	SV ± SD (mg/g suhog ekstrakta)
fukoksantin	5,28 ± 0,28

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhog ekstrakta zajedno sa SD.

#### 4.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata

**Tablica 20** Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *F. virsoides*

Pigmenti	F3 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)	F4 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)
klorofil <i>a</i>	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,00
klorofil <i>b</i>	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,01
karotenoidi	0,19 ± 0,08	0,02 ± 0,00

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhe frakcije zajedno sa SD.

**Tablica 21** Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u CO<sub>2</sub> ekstraktu makroalge *F. virsoides*

Pigmenti	SV ± SD (mg/g suhog ekstrakta)
klorofil <i>a</i>	7,62 ± 0,15
klorofil <i>b</i>	1,06 ± 0,23
karotenoidi	6,74 ± 0,65

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhog ekstrakta zajedno sa SD.

## 4.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA CRVENOJ ALGI *Amphiroa rigida*

### 4.2.1. GC-MS analiza isparljivih spojeva vršnih para izoliranih koristeći HS-SPME

Tablica 22 Vršne pare makroalge *A. rigida* izolirane koristeći HS-SPME

Br.	Spoj	RI	I SV ± SD	II SV ± SD	III SV ± SD	IV SV ± SD
1.	dimetil-sulfid	<900	-	-	4,38 ± 0,14	1,22 ± 0,02
2.	pentanal	<900	1,25 ± 0,03	0,79 ± 0,03	1,84 ± 0,05	0,68 ± 0,01
3.	( <i>E</i> )-pent-2-enal	<900	0,53 ± 0,02	-	-	-
4.	pentan-1-ol	<900	0,67 ± 0,02	0,86 ± 0,03	-	-
5.	( <i>Z</i> )-pent-2-en-1-ol	<900	1,22 ± 0,03	-	-	-
6.	heksanal	<900	6,72 ± 0,10	2,31 ± 0,02	6,31 ± 0,21	2,01 ± 0,02
7.	( <i>E</i> )-heks-2-enal	<900	7,41 ± 0,23	0,48 ± 0,03	2,47 ± 0,04	0,87 ± 0,03
8.	heksan-1-ol	<900	2,36 ± 0,02	1,09 ± 0,03	-	-
9.	tribrommetan	<900	1,52 ± 0,04	1,27 ± 0,02	-	-
10.	heptanal	901	0,49 ± 0,02	0,47 ± 0,02	1,00 ± 0,03	0,48 ± 0,01
11.	benzaldehyd	967	0,93 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,16 ± 0,05	1,04 ± 0,03
12.	okt-1-en-3-ol	982	0,50 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,51 ± 0,03	0,47 ± 0,01
13.	oktan-2,3-dion	984	-	-	1,21 ± 0,05	0,80 ± 0,03
14.	6-metilhept-5-en-2-on	988	0,67 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,90 ± 0,02	0,71 ± 0,02
15.	2-pentilfuran	993	-	-	0,98 ± 0,03	0,80 ± 0,04
16.	oktanal	1003	0,53 ± 0,02	0,74 ± 0,02	-	-
17.	( <i>E,E</i> )-hepta-2,4-dienal	1014	-	0,14 ± 0,01	-	-
18.	benzil-alkohol	1042	-	-	8,58 ± 0,10	9,44 ± 0,23
19.	( <i>E</i> )-okt-2-enal	1061	0,69 ± 0,03	0,48 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,44 ± 0,05
20.	( <i>E,E</i> )-okta-3,5-dien-2-on	1073	-	-	-	1,13 ± 0,04
21.	oktan-1-ol	1074	0,34 ± 0,05	0,49 ± 0,02	-	-
22.	nonanal	1099	1,27 ± 0,05	1,63 ± 0,03	0,99 ± 0,02	1,50 ± 0,05
23.	6-[( <i>1Z</i> )-1-butenil]-ciklohepta-1,4-dien (ektokarpen)	1150	0,97 ± 0,02	0,66 ± 0,05	-	-
24.	dekanal	1296	-	-	-	0,62 ± 0,03
25.	β-ciklocitral	1222	0,78 ± 0,05	0,47 ± 0,02	-	0,67 ± 0,01
26.	( <i>E</i> )-dec-2-enal	1264	-	0,16 ± 0,02	-	-

27.	$\alpha$ -kubeben	1366	-	0,88 $\pm$ 0,03	-	-
28.	$\beta$ -burbonen	1385	-	0,37 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	1,53 $\pm$ 0,02
29.	germakren D	1481	-	1,13 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,06	2,66 $\pm$ 0,05
30.	( <i>E</i> )- $\beta$ -jonon	1486	1,55 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02
31.	pentadec-1-en	1492	1,10 $\pm$ 0,06	13,05 $\pm$ 0,24	-	-
32.	( <i>E</i> )-pentadec-7-en*	1495	-	6,00 $\pm$ 0,32	-	-
33.	pentadekan	1500	5,51 $\pm$ 0,25	7,08 $\pm$ 0,20	5,21 $\pm$ 0,10	7,02 $\pm$ 0,23
34.	heksadec-7-en*	1515	-	11,25 $\pm$ 0,22	-	-
35.	tetradekan-1-ol	1678	0,96 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,06	-	-
36.	heptadec-1-en	1692	0,62 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,06	-	-
37.	( <i>E</i> )-heptadec-8-en	1678	0,76 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02
38.	heptadekan	1700	47,77 $\pm$ 2,66	30,08 $\pm$ 1,67	50,16 $\pm$ 3,05	53,96 $\pm$ 4,05
39.	( <i>E</i> )-heptadec-3-en*	1717	3,63 $\pm$ 0,05	4,79 $\pm$ 0,06	6,44 $\pm$ 0,25	7,41 $\pm$ 0,45
40.	eikosan	2000	-	0,58 $\pm$ 0,03	-	-

I – svježi uzorak analiziran pomoću DVB/CAR/PDMS vlakna; II – svježi uzorak analiziran pomoću PDMS/DVB vlakna; III – suhi uzorak analiziran pomoću DVB/CAR/PDMS vlakna; IV – suhi uzorak analiziran pomoću PDMS/DVB vlakna; RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; - spoj nije detektiran; \* - spoj uvjetno identificiran.

#### 4.2.2. GC-MS analiza isparljivih spojeva izoliranih koristeći HD

Tablica 23 Isparljivi spojevi hidrodestilata makroalge *A. rigida*

Br.	Spoj	RI	I Av $\pm$ SD	II Av $\pm$ SD
1.	( <i>E</i> )-heks-2-enal	<900	0,85 $\pm$ 0,02	1,55 $\pm$ 0,03
2.	heptan-2-on	<900	-	0,12 $\pm$ 0,01
3.	heptanal	901	0,04 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
4.	( <i>E</i> )-hept-2-enal	961	-	0,05 $\pm$ 0,01
5.	benzaldehyd	967	0,26 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02
6.	okt-1-en-3-ol	982	-	0,09 $\pm$ 0,01
7.	oktan-2,3-dion	984	-	0,21 $\pm$ 0,02
8.	6-metilhept-5-en-2-on	988	0,50 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,02
9.	oktan-2-on	992	0,05 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04
10.	oktanal	1003	0,12 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,07
11.	( <i>E,E</i> )-hepta-2,4-dienal	1014	-	0,12 $\pm$ 0,02
12.	2-etilheksan-1-ol	1033	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01
13.	2,6,6-trimetilcikloheksanon	1040	-	0,03 $\pm$ 0,01
14.	benzil-alkohol	1042	0,26 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01

15.	fenilacetaldehid	1049	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,02
16.	( <i>E</i> )-okt-2-enal	1061	0,08 ± 0,02	0,22 ± 0,03
17.	acetofenon	1072	-	0,08 ± 0,01
18.	oktan-1-ol	1074	0,16 ± 0,02	0,23 ± 0,03
19.	nonan-2-on	1091	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01
20.	( <i>E,Z</i> )-okta-3,5-dien-2-on	1095	-	0,06 ± 0,01
21.	nonanal	1099	0,10 ± 0,02	0,23 ± 0,04
22.	( <i>E,E</i> )-okta-2,4-dienal	1111	-	0,18 ± 0,02
23.	fenilacetoni-tril	1144	0,08 ± 0,01	0,01 ± 0,00
24.	4-ketoizoforon	1148	0,04 ± 0,01	-
25.	6-[(1 <i>Z</i> )-1-butenil]-ciklohepta-1,4-dien (ektokarpen)	1150	0,01 ± 0,00	-
26.	( <i>E,Z</i> )-nona-2,6-dienal	1157	-	0,12 ± 0,01
27.	( <i>Z</i> )-non-2-enal	1163	-	0,12 ± 0,02
28.	3-metilacetofenon	1187	-	0,06 ± 0,01
29.	dekan-2-on	1194	0,18 ± 0,02	0,48 ± 0,05
30.	dekanal	1296	-	0,16 ± 0,02
31.	β-ciklocitral	1222	-	0,16 ± 0,03
32.	benzotiazol	1227	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01
33.	β-ciklohomocitral	1260	-	0,14 ± 0,02
34.	( <i>E</i> )-dec-2-enal	1264	-	0,16 ± 0,023
35.	dekan-1-ol	1276	-	0,21 ± 0,02
36.	undekan-2-on	1294	0,04 ± 0,01	-
37.	( <i>E,Z</i> )-deka-2,4-dienal	1294	-	0,14 ± 0,02
38.	undekanal	1307	-	0,17 ± 0,01
39.	( <i>E,E</i> )-deka-2,4-dienal	1318	-	0,31 ± 0,03
40.	undekan-1-ol	1377	-	0,18 ± 0,02
41.	β-burbonen	1385	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
42.	β-kubeben	1391	-	0,09 ± 0,02
43.	tetradekan	1400	0,05 ± 0,01	-
44.	dodekanal	1409	-	0,36 ± 0,05
45.	α-jonon	1429	-	0,13 ± 0,06
46.	( <i>E</i> )-geranil-aceton	1455	-	0,85 ± 0,04
47.	dodekan-1-ol	1477	0,44 ± 0,02	2,11 ± 0,20
48.	germakren D	1481	1,01 ± 0,06	0,46 ± 0,07
49.	( <i>E</i> )-β-jonon	1486	0,29 ± 0,02	2,55 ± 0,06
50.	pentadec-1-en	1492	0,50 ± 0,02	0,39 ± 0,01
51.	( <i>E</i> )-pentadec-7-en*	1495	0,04 ± 0,01	-
52.	pentadekan	1500	2,36 ± 0,05	0,91 ± 0,02
53.	<i>N,N</i> -dimetildodekan-1-amin	1504	0,94 ± 0,02	-

54.	tridekanal	1510	-	0,47 ± 0,05
55.	kubebol	1516	0,59 ± 0,03	0,57 ± 0,01
56.	tridekan-1-ol	1578	0,29 ± 0,01	0,63 ± 0,01
57.	heksadekan	1600	-	0,23 ± 0,02
58.	tetradekanal	1612	-	0,48 ± 0,02
59.	benzofenon	1627	-	0,66 ± 0,03
60.	kubenol	1644	0,42 ± 0,02	1,95 ± 0,05
61.	tetradekan-1-ol	1678	0,48 ± 0,02	2,76 ± 0,09
62.	eudezma-4(15),7-dien-1β-ol	1686	1,06 ± 0,03	0,29 ± 0,02
63.	heptadec-1-en	1692	0,75 ± 0,02	0,82 ± 0,03
64.	( <i>E</i> )-heptadec-8-en	1678	0,31 ± 0,02	2,02 ± 0,03
65.	heptadekan	1700	3,80 ± 0,21	12,22 ± 0,23
66.	pentadekanal	1714	0,50 ± 0,02	1,07 ± 0,06
67.	( <i>E</i> )-heptadec-3-en*	1717	0,29 ± 0,02	2,50 ± 0,06
68.	<i>trans</i> -farnazol	1724	0,10 ± 0,01	0,29 ± 0,02
69.	( <i>E</i> )-2-heksilcimetni aldehid	1748	-	0,25 ± 0,04
70.	pentadekan-1-ol	1780	0,18 ± 0,02	0,95 ± 0,03
71.	2-etilheksil-sačilat	1805	0,64 ± 0,02	1,03 ± 0,09
72.	oktadekan	1800	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,02
73.	6,10,14-trimetilpentadekan-2-on (fiton)	1845	2,21 ± 0,09	7,28 ± 0,12
74.	( <i>Z</i> )-heksadec-11-en-1-ol	1861	-	2,02 ± 0,10
75.	diizobutil-ftalat	1868	0,55 ± 0,02	0,47 ± 0,03
76.	heksadekan-1-ol	1881	1,13 ± 0,09	3,79 ± 0,80
77.	nonadekan	1900	-	0,22 ± 0,02
78.	heptadekan-2-on	1900	0,08 ± 0,01	0,22 ± 0,02
79.	( <i>E,E</i> )-farnetil-aceton	1918	-	1,15 ± 0,08
80.	metil-palmitat	1926	-	0,57 ± 0,02
81.	dibutil-ftalat	1962	0,94 ± 0,04	1,65 ± 0,05
82.	ciklooktasulfur	2009	0,22 ± 0,02	-
83.	oktadekanal	2019	-	0,87 ± 0,02
84.	epimanool	2051	3,18 ± 0,09	1,77 ± 0,08
85.	( <i>E</i> )-fitol	2112	41,75 ± 1,87	16,44 ± 0,15
86.	pačidiktiol A	2123	2,97 ± 0,09	1,11 ± 0,04
87.	izopačidiktiol A	2136	2,41 ± 0,02	1,75 ± 0,03
88.	trikosan	2300	-	0,69 ± 0,02
89.	feruginol	2331	1,45 ± 0,02	-

I – hidrodestilat svježeg uzorka; II – hidrodestilat suhog uzorka; RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; - spoj nije detektiran; \* - spoj uvjetno identificiran.

### 4.2.3. GC-MS analiza isparljivih spojeva ekstrahiranih pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Tablica 24 Isparljivi spojevi CO<sub>2</sub> ekstrakta makroalge *A. rigida*

Br.	Spoj	RI	%
1.	pentanska kiselina	< 900	0,01
2.	kapronska kiselina	< 900	0,14
3.	kaprilna kiselina	1181	0,03
4.	nonanska kiselina	1278	0,04
5.	<i>p</i> -anetol	1287	0,09
6.	kaprinska kiselina	1375	0,03
7.	<i>trans</i> - β-kariofilen	1417	0,04
8.	2,6-di( <i>t</i> -butil)-4-hidroksi-4-metil-cikloheksa-2,5-dien-1-on	1492	0,09
9.	β-jonon	1485	0,19
10.	pentadec-1-en	1492	0,05
11.	pentadekan	1500	0,11
12.	dihidroaktinidiolid	1526	0,36
13.	laurinska kiselina	1570	0,11
14.	kariofilen oksid	1580	0,08
15.	heksadekan	1600	0,03
16.	dietil-ftalat	1603	0,05
17.	( <i>E</i> )-heptadec-8-en	1678	0,47
18.	heptadec-1-en	1694	0,17
19.	heptadekan	1700	3,00
20.	loliolid	1762	0,14
21.	miristinska kiselina	1771	8,33
22.	heksahidrofarnezil-aceton	1846	0,33
23.	pentadekanska kiselina	1866	1,03
24.	heksadekan-1-ol	1880	0,75
25.	nonadec-1-en	1892	0,09
26.	nonadekan	1900	0,08
27.	palmitoleinska kiselina	1949	5,09
28.	dibutil-ftalat	1961	0,58
29.	palmitinska kiselina	1976	40,63
30.	oktadekan-1-ol	2056	0,83
31.	heptadekanska kiselina	2063	0,71
32.	( <i>E</i> )-fitol	2108	9,14
33.	linolna kiselina	2129	1,39
34.	oleinska kiselina	2140	13,30
35.	stearinska kiselina	2159	0,28
36.	<i>cis</i> -oktadec-13-enska kiselina	2185	0,04

RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); % –postotak površine kromatograma.



#### 4.2.4. GC-FID analiza sastava masnih kiselina

Tablica 25 Sastav masnih kiselina makroalge *A. rigida*

Br.	Masna kiselina		SV ± SD (%)
1.	maslačna kiselina	C4:0	0,20 ± 0,02
2.	kapronska kiselina	C6:0	0,91 ± 0,08
3.	miristinska kiselina	C14:0	3,34 ± 0,15
4.	pentadekanska kiselina	C15:0	0,69 ± 0,01
5.	palmitinska kiselina	C16:0	42,86 ± 0,26
6.	stearinska kiselina	C18:0	1165 ± 0,10
	<b>Zasićene masne kiseline</b>		<b>59,65</b>
7.	palmitoleinska kiselina	C16:1	1,73 ± 0,09
8.	oleinska + elaidična kiselina	C18:1n9c + C18:1n9t	5,46 ± 0,03
	<b>Mononezasićene masne kiseline</b>		<b>7,19</b>
9.	<i>cis</i> -linolna kiselina	C18:2n6c	3,03 ± 0,03
10.	<i>trans</i> -linolna kiselina	C18:2n6t	2,22 ± 0,02
11.	γ-linolenska kiselina	C18:3n6	0,46 ± 0,05
12.	α-linolenska kiselina	C18:3n3	0,41 ± 0,06
13.	eikosadienska kiselina	C20:2n6	7,90 ± 0,11
14.	eikosapentaenska kiselina	C20:5n3	19,14 ± 0,32
	<b>Polinezasićene masne kiseline</b>		<b>33,16</b>
	<b>ω3 masne kiseline</b>		<b>21,96</b>
	<b>ω6 masne kiseline</b>		<b>13,61</b>

SV – srednje vrijednosti izražene u postotcima (%) dobivene iz tri ponavljanja zajedno sa SD.

#### 4.2.5. HPLC analiza pigmentata

Tablica 26 Koncentracija pigmentata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *A. rigida*

Pigmenti	F3 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)	F4 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)
fukoksantin	0,63 ± 0,62	n.d.
lutein	5,83 ± 0,97	n.d.
klorofil <i>a</i>	n.d.	13,65 ± 0,81
β-karoten	n.d.	6,18 ± 0,72
α-karoten	n.d.	n.k.

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhe frakcije zajedno sa SD; n.k. – nije kvantificirano; n.d. – nije detektirano.

**Tablica 27** Koncentracija pigmenata dobivenih u CO<sub>2</sub> ekstraktu makroalge *A. rigida*

Pigment	SV ± SD (mg/g suhog ekstrakta)
fukoksantin	0,76 ± 0,35
lutein	0,41 ± 0,15
β-karoten	0,90 ± 0,43

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhog ekstrakta zajedno sa SD.

#### 4.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata

**Tablica 28** Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *A. rigida*

Pigmenti	F3 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)	F4 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)
klorofil <i>a</i>	0,75 ± 0,01	0,67 ± 0,02
klorofil <i>b</i>	0,98 ± 0,02	0,74 ± 0,00
karotenoidi	0,57 ± 0,01	0,24 ± 0,00

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhe frakcije zajedno sa SD.

**Tablica 29** Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u CO<sub>2</sub> ekstraktu makroalge *A. rigida*

Pigmenti	SV ± SD (mg/g suhog ekstrakta)
klorofil <i>a</i>	0,44 ± 0,10
klorofil <i>b</i>	0,01 ± 0,01
karotenoidi	2,22 ± 0,34

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhog ekstrakta zajedno sa SD.

### 4.3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA PROVEDENIH NA ZELENOJ ALGI *Codium bursa*

#### 4.3.1. GC-MS analiza isparljivih spojeva vršnih para izoliranih koristeći HS-SPME

Tablica 30 Vršne pare makroalge *C. bursa* izolirane koristeći HS-SPME

Br.	Spoj	RI	I SV ± SD	II SV ± SD	III SV ± SD	IV SV ± SD
1.	2-tiapropan (DMS)	<900	56,51 ± 2,45	3,72 ± 0,10	36,22 ± 1,58	3,10 ± 0,10
2.	pentan-1-ol	<900	-	1,02 ± 0,10	-	-
3.	heksanal	<900	1,44 ± 0,15	1,41 ± 0,11	0,20 ± 0,01	0,71 ± 0,02
4.	dimetil-sulfoksid	<900	-	1,52 ± 0,14	-	2,63 ± 0,10
5.	etilbenzen	<900	-	2,23 ± 0,08	-	0,42 ± 0,01
6.	heksan-1-ol	<900	0,62 ± 0,01	-	-	-
7.	α-pinen	940	1,43 ± 0,09	-	-	0,32 ± 0,01
8.	benzaldehyd	965	5,21 ± 0,15	6,14 ± 0,11	4,73 ± 0,09	1,42 ± 0,02
9.	okt-1-en-3-on	981	-	-	-	0,10 ± 0,01
10.	okt-1-en-3-ol	982	1,12 ± 0,14	2,61 ± 0,10	9,71 ± 0,18	0,81 ± 0,02
11.	oktan-2,3-dion	985	-	0,80 ± 0,03	-	0,41 ± 0,01
12.	6-metil-hept-5-en-2-on	988	-	1,42 ± 0,08	-	0,41 ± 0,02
13.	2-pentilfuran	992	-	0,30 ± 0,01	-	-
14.	oktanal	1003	0,81 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,40 ± 0,01
15.	δ-3-karen	1013	-	0,10 ± 0,01	-	0,30 ± 0,01
16.	p-cimen	1031	0,51 ± 0,02	-	-	0,10 ± 0,01
17.	2-etil-heksan-1-ol	1032	-	0,40 ± 0,01	-	0,72 ± 0,01
18.	limonen	1035	2,20 ± 0,09	-	-	-
19.	benzil-alkohol	1037	9,31 ± 0,30	3,42 ± 0,09	0,20 ± 0,01	5,40 ± 0,03
20.	(E)-okt-2-enal	1061	-	0,80 ± 0,01	-	0,11 ± 0,01
21.	oktan-1-ol	1074	0,62 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,30 ± 0,01
22.	nonanal	1103	3,51 ± 0,15	1,00 ± 0,05	2,51 ± 0,14	1,40 ± 0,05
23.	4-ketoizoforon	1147	-	0,10 ± 0,01	-	0,10 ± 0,01
24.	6-[(Z)-1-butenil]- ciklohepta-1,4-dien (diktipteren D)	1158	-	-	-	0,41 ± 0,01
25.	6-butil-ciklohepta-1,4- dien (diktipteren C)	1174	-	-	-	0,40 ± 0,01

26.	dekanal	1206	1,01 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,80 ± 0,02
27.	β-ciklocitral	1222	-	0,50 ± 0,01	-	0,42 ± 0,01
28.	farnezan	1376	-	0,42 ± 0,02	-	0,71 ± 0,03
29.	tetradekan	1400	-	-	-	0,30 ± 0,01
30.	dodekanal	1409	-	0,31 ± 0,01	-	0,10 ± 0,01
31.	(E)-α-jonon	1428	-	6,40 ± 0,30	-	3,02 ± 0,19
32.	geranil-aceton	1454	-	0,10 ± 0,01	-	0,31 ± 0,01
33.	β-selinen	1462	-	0,50 ± 0,02	-	-
34.	leden	1472	-	0,71 ± 0,01	-	-
35.	dodekan-1-ol	1477	-	0,42 ± 0,01	-	-
36.	ar-kurkumen	1483	-	0,10 ± 0,01	-	2,11 ± 0,08
37.	(E)-β-jonon	1486	-	1,52 ± 0,09	-	1,02 ± 0,05
38.	pentadekan	1500	-	3,81 ± 0,09	0,20 ± 0,01	3,10 ± 0,11
39.	dihidro-aktinolid	1528	-	1,02 ± 0,01	-	-
40.	heksadekan	1600	-	0,50 ± 0,01	-	2,41 ± 0,12
41.	benzofenon	1627	-	0,32 ± 0,01	-	0,80 ± 0,05
42.	(E)-heptadec-8-en	1678	-	1,40 ± 0,09	-	2,41 ± 0,03
43.	heptadekan	1700	4,82 ± 0,16	41,50 ± 2,01	32,51 ± 1,85	52,62 ± 2,30
44.	oktadekan	1800	-	0,10 ± 0,01	-	1,60 ± 0,08
45.	diizobutil-ftalat	1867	-	-	-	0,40 ± 0,01
46.	nonadec-1-en**	1872	-	0,31 ± 0,01	-	0,70 ± 0,02
47.	nonadekan	1900	-	0,10 ± 0,01	-	0,81 ± 0,02
48.	eikosan	2000	-	0,40 ± 0,01	-	-
49.	heneikosan	2100	-	1,40 ± 0,10	-	-

I – svježi uzorak analiziran pomoću DVB/CAR/PDMS vlakna; II – suhi uzorak analiziran pomoću DVB/CAR/PDMS vlakna; III – svježi uzorak analiziran pomoću PDMS/DVB vlakna; IV – suhi uzorak analiziran pomoću PDMS/DVB vlakna; RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; - spoj nije detektiran; \*\* - točan izomer nije identificiran.

### 4.3.2. GC-MS analiza isparljivih spojeva izoliranih koristeći HD

Tablica 31 Isparljivi spojevi hidrodestilata makroalge *C. bursa*

Br.	Spoj	RI	I SV ± SD	II SV ± SD
1.	nonan	900	-	0,10 ± 0,01
2.	α-pinen	940	0,81 ± 0,02	-
3.	benzaldehyd	965	1,40 ± 0,01	1,41 ± 0,03
4.	2-pentilfuran	992	-	0,60 ± 0,02
5.	benzil-alkohol	1037	18,02 ± 1,04	0,10 ± 0,01
6.	nonanal	1103	-	0,62 ± 0,01
7.	tetradekan	1400	-	0,71 ± 0,01
8.	dodekanal	1409	-	-
9.	( <i>E</i> )-α-jonon	1428	-	2,22 ± 0,08
10.	( <i>E</i> )-β-jonon	1486	-	0,70 ± 0,03
11.	pentadekan	1500	-	0,71 ± 0,03
12.	( <i>E</i> )-heptadec-8-en	1678	0,22 ± 0,01	0,71 ± 0,02
13.	heptadekan	1700	23,44 ± 1,01	9,41 ± 0,09
14.	heksahidrofarnezil-aceton (fiton)	1845	1,61 ± 0,09	5,91 ± 0,11
15.	diizobutil-ftalat	1867	2,22 ± 0,12	0,82 ± 0,02
16.	nonadec-1-en**	1872	-	0,71 ± 0,03
17.	heksadekan-1-ol	1882	-	1,21 ± 0,15
18.	nonadekan	1900	-	0,31 ± 0,01
19.	dibutil-ftalat	1961	9,80 ± 0,15	1,03 ± 0,10
20.	ciklooktasumpor	2009	0,21 ± 0,01	5,12 ± 0,09
21.	( <i>E</i> )-fitol	2110	3,31 ± 0,09	58,42 ± 2,50
22.	dokosan	2200	13,90 ± 1,28	0,42 ± 0,08
23.	diizooktil-ftalat	2274	13,30 ± 1,11	-

I – hidrodestilat svježeg uzorka; II – hidrodestilat suhog uzorka; RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; - spoj nije detektiran; \*\* - točan izomer nije identificiran.

### 4.3.3. GC-MS analiza isparljivih spojeva ekstrahiranih pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Tablica 32 Isparljivi spojevi CO<sub>2</sub> ekstrakta makroalge *C. bursa*

Br.	Spoj	RI	SV ± SD
1.	2-fenoksietanol	1215	6,02 ± 0,16
2.	( <i>E</i> )-heptadec-8-en	1678	0,82 ± 0,01
3.	heptadekan	1700	7,20 ± 0,08
4.	loliolid	1763	3,51 ± 0,08
5.	neofitadien	1840	3,20 ± 0,11
6.	nonadec-1-en**	1872	0,70 ± 0,02
7.	heksadekan-1-ol	1882	3,10 ± 0,21
8.	palmitinska kiselina	1963	17,51 ± 1,13
9.	( <i>Z</i> )-oktadec-9-en-1-ol	2060	2,51 ± 0,12
10.	oktadekan-1-ol	2084	2,02 ± 0,12
11.	( <i>E</i> )-fitol	2110	42,30 ± 2,01
12.	oleinska kiselina	2147	3,02 ± 0,09

RI - indeksi zadržavanja određeni u odnosu na *n*-alkane (C<sub>9</sub> - C<sub>25</sub>); SV – srednje vrijednosti postotaka površine kromatograma dobivenih pomoću GC-MS analize provedene u tri ponavljanja; SD – standardna devijacija postotaka površina dobivenih iz tri ponavljanja; \*\* - točan izomer nije identificiran.

### 4.3.4. GC-FID analiza sastava masnih kiselina

Tablica 33 Sastav masnih kiselina makroalge *C. bursa*

Br.	Masna kiselina		SV ± SD (%)
1.	miristinska kiselina	C14:0	4,29 ± 1,46
2.	palmitinska kiselina	C16:0	27,38 ± 1,59
3.	stearinska kiselina	C18:0	9,26 ± 0,48
4.	arahidska kiselina	C20:0	14,49 ± 1,30
5.	behenska kiselina	C22:0	2,84 ± 0,16
	<b>Zasićene masne kiseline</b>		<b>58,25</b>
6.	palmitoleinska kiselina	C16:1	2,43 ± 1,59
7.	oleinska + elaidična kiselina	C18:1n9c + C18:1n9t	24,73 ± 1,19
	<b>Mononezasićene masne kiseline</b>		<b>27,16</b>
8.	<i>cis</i> -linolna kiselina	C18:2n6c	7,42 ± 1,02
9.	$\alpha$ -linolenska kiselina	C18:3n3	2,34 ± 0,30
10.	eikosadienska kiselina	C20:2n6	1,73 ± 0,19
11.	dokosadienska kiselina	C22:2n6	3,10 ± 0,14
	<b>Polinezasićene masne kiseline</b>		<b>14,59</b>
	<b><math>\omega</math>3 masne kiseline</b>		<b>2,34</b>
	<b><math>\omega</math>6 masne kiseline</b>		<b>12,25</b>

SV – srednje vrijednosti izražene u postotcima (%) dobivene iz tri ponavljanja zajedno sa SD.

### 4.3.5. HPLC analiza pigmenata

**Tablica 34** Koncentracija pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *C. bursa*

Pigmenti	F3 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)	F4 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)
fukoksantin	1,91 ± 0,14	n.d.
astaksantin	3,29 ± 0,85	n.d.
klorofil <i>b</i>	n.d.	7,21 ± 0,75

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhe frakcije zajedno sa SD; n.d. – nije detektirano.

**Tablica 35** Koncentracija pigmenata dobivenih u CO<sub>2</sub> ekstraktu makroalge *C. bursa*

Pigmenti	SV ± SD (mg/g suhog ekstrakta)
fukoksantin	0,34 ± 0,07
astaksantin	1,18 ± 0,15

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhog ekstrakta zajedno sa SD.

### 4.3.6. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata

**Tablica 36** Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *C. bursa*

Pigmenti	F3 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)	F4 (mg/g suhe frakcije) (SV ± SD)
klorofil <i>a</i>	0,12 ± 0,57	1,25 ± 0,00
klorofil <i>b</i>	1,75 ± 0,52	2,66 ± 0,00
karotenoidi	0,56 ± 0,04	0,39 ± 0,00

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhe frakcije zajedno sa SD.

**Tablica 37** Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u CO<sub>2</sub> ekstraktu makroalge *C. bursa*

Pigmenti	SV ± SD (mg/g suhog ekstrakta)
klorofil <i>a</i>	0,69 ± 0,27
klorofil <i>b</i>	0,21 ± 0,11
karotenoidi	1,43 ± 0,02

SV – srednje vrijednosti dobivene iz tri ponavljanja izražene u mg/g suhog ekstrakta zajedno sa SD.

## **5. RASPRAVA**



Ispitivane vrste makroalgi u doktorskoj disertaciji odabrane su zbog svog potencijala za primjenu u različitim industrijama poput prehrambene, kozmetičke i/ili farmaceutske. Budući da su odabrane vrste vrlo slabo ili uopće nisu istražene, rezultati ove doktorske disertacije značajno će doprinijeti boljem shvaćanju njihove kemijske bioraznolikosti.

## 5.1. KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA SMEĐE ALGE *Fucus virsoides*

### 5.1.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani koristeći HS-SPME

HS-SPME provedena je na svježim i suhim uzorcima makroalgi, kako bi se utvrdilo ima li proces sušenja utjecaja na sastav isparljivih spojeva u uzorcima. Također, ispitivana je i razlika u kemijskim profilima svježih i suhih uzoraka s obzirom na primijenjeno vlakno. Tijekom postupka korištena su dva različita vlakna; DVB/CAR/PDMS i PDMS/DVB. GC-MS analizom vršnih para utvrđeno je da je pentadekan bio glavni spoj u uzorcima makroalge *F. virsoides* s udjelom od 61,90 % za svježe uzorke do 71,55 % za suhe uzorke. Drugi po zastupljenosti bio je pentadec-1-en s postotkom od 11,00 % za suhe uzorke do 17,98 % za svježe uzorke prilikom korištenja DVB/CAR/PDMS vlakna. Nadalje, uočene su razlike prilikom primjene različitih vlakana pri čemu je (*E*)-pentadec-7-en pronađen jedino pri korištenju DVB/CAR/PDMS vlakna, dok je tridekanal dobiven jedino pomoću PDMS/DVB vlakna. Općenito i u istraživanjima drugih autora (Youngblood i sur., 1971; Youngblood i Blumer, 1973; Clark i Blumer, 1967) u smeđim makroalgama pentadekan se pokazao kao glavni isparljivi spoj, za razliku od crvenih makroalgi u kojima je dominantan bio heptadekan. Međutim, ugljikovodici prisutni u smeđim makroalgama značajno variraju od potpuno zasićenih do potpuno olefinskih. Isto tako, omjeri alkana/alkena se značajno razlikuju čak i unutar same alge (Youngblood i sur., 1971) tako da su potrebne detaljne i precizne analize. Clark i Blumer (1967) su istražili različite vrste roda *Fucus* te su uočili da se sadržaj zasićenih i nezasićenih ugljikovodika razlikuje. Primjenom ekstrakcije po Soxhletu dobili su udjele od 99% za zasićene ugljikovodike i 0,1 % za nezasićene ugljikovodike za makroalgu *F. distichus*, za *F. spiralis* ti udjeli su iznosili 96,5 % za zasićene i 3,5 % za nezasićene ugljikovodike, dok je *F. vesiculosus* imao najniži udio zasićenih (81,6 %) i najveći udio nezasićenih (18,4 %) ugljikovodika. Nadalje, u istom istraživanju potvrđena je prisutnost pentadekana i pentadec-1-ena u sve tri alge, čija je prisutnost potvrđena za suhe i svježe uzorke *F. virsoides* iz Jadranskog mora istraženih tijekom ove doktorske disertacije (**Tablica 14**).

Uočene su značajne razlike prilikom usporedbe dobivenih kemijskih profila svježih i suhih uzoraka makoalge *F. virsoides*. Pentadekan prisutan u suhom uzorku imao je sličan udio kao i u svježem uzorku, no pentadec-1-en nije detektiran u suhom uzorku, nego samo u svježem. Budući da pentadec-1-en ima sličnu isparljivost (268,7 °C) kao pentadekan (270,6 °C) može

se pretpostaviti da je došlo do njegove oksidacije tijekom procesa sušenja, a ne isparavanja. Iako je pentadekan ostao dominantan spoj i u suhom uzorku, pentadec-1-en se vjerojatno razgradio u tridekan čija je prisutnost detektirana jedino u suhom uzorku. Osim toga, prilikom korištenja PDMS/DVB vlakna utvrđena je prisutnost i nekih novih aromatskih spojeva uključujući benzil-alkohol (19,67 % u svježem uzorku; 15,75 % u suhom uzorku) i benzaldehid (1,43 % u svježem uzorku; 1,18 % u suhom uzorku). Pojava nižih alifatskih karbonilnih spojeva, poput heksanala, heptanala, (*E*)-hept-2-enala, okt-1-en-3-ola, okt-1-en-3-ona, oktanala i nonanala, u suhom uzorku može biti posljedica izraženih oksidacijskih reakcija i razgradnje lipida tijekom sušenja. Hidalgo i Zamora (2019) utvrdili su da se benzaldehid i feniloctena kiselina pojavljuju uslijed oksidacije lipida uz prisustvo zraka. U navedenom istraživanju fenilacetaldehid bio je glavni izvor benzaldehida koji je nastao uz prisutnost kisika, niskog pH i lipidnih hidroperoksida ili iz smjese 4-oksonon-2-enala i lipidnih peroksida.

### 5.1.2. Isparljivi spojevi izolirani koristeći HD

Tijekom istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji praćene su razlike u kemijskom sastavu isparljivih spojeva hidrodestilata dobivenih iz svježih i suhih uzoraka makroalgi. GC-MS analizom hidrodestilata svježeg uzorka makroalge *F. virsoides*, utvrđeno je da su glavni spojevi bili viši alifatski spojevi. Pentadec-1-en (19,32 %), (*E*)-pentadec-7-en (6,07 %), heptadec-1-en (5,05 %) i (*E*)-heptadec-8-en (0,61 %) bili su najzastupljeniji alkeni, dok su prisutni alkani bili pentadekan (5,87 %) i heptadekan (0,95 %). Za razliku od vršnih para svježeg i suhog uzorka *F. virsoides* (**Tablica 14**), pentadekan je bio znatno manje zastupljen u hidrodestilatu svježeg uzorka (5,87 %), dok je pentadec-1-en bio prisutan u većem udjelu (19,32 %) (**Tablica 15**). Prisutnost pentadec-1-ena i heptadec-1-ena u hidrodestilatu *F. virsoides* može se pripisati degradaciji masnih kiselina. Iako su masne kiseline u hidrodestilatu *F. virsoides* bile prisutne u niskim udjelima, one su u potpunosti detektirane nakon derivatizacije ekstrakta ukupnih lipida (**Tablica 17**). McInnes i sur. (1980) predložili su nekoliko mehanizama dekarboksilacije masnih kiselina koji uključuju nastajanje vinilne skupine u međuproduktima koja se dalje reducira u odgovarajući alkan, a moguća je i direktna dekarboksilacija u alkane.

Fitol je nađen u udjelu od 7,19 % u hidrodestilatu svježeg uzorka *F. virsoides*, dok je u hidrodestilatu suhog uzorka bio prisutan u nižem udjelu (4,06 %). Nadalje, heksahidrofarnezil-aceton pronađen je u hidrodestilatu suhog uzorka u udjelu od 2,23 %. Podrijetlo oba navedena spoja najčešće se povezuje s fotodegradacijom fitilnog lanca klorofila ili oksidacijom koja je uzrokovana hidroperoksidima (Rontani i Volkman, 2003). Također, Rontani i sur. (1992) utvrdili su da keton, heksahidrofarnezil-aceton, predstavlja kemijski marker fotodegradacije klorofila u morskim organizmima.

Kemijski profil hidrodestilata suhog uzorka *F. virsoides* značajno se razlikovao od hidrodestilata svježeg uzorka, a sadržavao je produkte oksidacije koji nisu detektirani u hidrodestilatu svježeg uzorka. Ukupno 25 spojeva bilo je prisutno u hidrodestilatu suhog uzorka, a glavni spoj bio je tridekanal s količinom od 18,51 % što je otprilike 7 puta više nego što je pronađeno u hidrodestilatu svježeg uzorka. Tridekanal je mogao nastati oksidacijom dvostruke veze odgovarajućih masnih kiselina tijekom procesa sušenja. Osim toga, pronađeni su i povišeni udjeli pentadekanala i miristinske kiseline. Niži alifatski spojevi pronađeni jedino u hidrodestilatu suhog uzorka bili su sljedeći aldehidi: (*E*)-heks-2-enal, heptanal, (*E,E*)-hepta-2,4-dienal, oktanal, (*E,Z*)-hepta-2,4-dienal, (*Z,Z*)-hepta-2,4-dienal, (*E*)-okt-2-enal, (*E,E*)-nona-2,6-dienal, (*E*)-non-2-enal, dekanal i dodekanal. (*Z*)-Hept-2-enal, nonanal i (*E,Z*)-deka-2,4-dienal bili su prisutni u većim udjelima u hidrodestilatu suhog uzorka, u usporedbi sa svježim uzorkom. Nezasićeni aldehidi vjerojatno su nastali cijepanjem dvostrukih veza odgovarajućih masnih kiselina (**Tablica 17**) ili linolenskog alkohola čiji je postotak smanjen s 12,89 % u svježem uzorku na 5,08 % u hidrodestilatu suhog uzorka. Nađeni su i alifatski ketoni poput oktan-2,3-diona, (*E,E*)-okta-3,5-dien-2-ona, nonan-2-ona i (*E,Z*)-okta-3,5-dien-2-ona, kao i alifatski alkoholi, (*E*)-okt-2-en-1-ol, okt-1-en-3-ol i oktan-1-ol. Udjeli benzil-alkohola, fenilacetaldehida i benzaldehida nađeni su u većem postotku u hidrodestilatu suhog uzorka (**Tablica 15**). Također, udjeli norizoprenoida bili su veći u hidrodestilatu suhog uzorka, 1,5 puta veći za 4-ketoizoforon i oko 7,5 puta veći za  $\beta$ -jonon, dok se  $\alpha$ -jonon pojavio u postotku od 0,79 % u hidrodestilatu suhog uzorka što ukazuje na razgradnju karotenoida tijekom sušenja.

### 5.1.3. Isparljivi spojevi ekstrahirani pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Ekstrakcijom pomoću SC-CO<sub>2</sub> iz liofiliziranog uzorka *F. virsoides* ekstrahirane su masne kiseline (**Tablica 16**) koje su činile najveći udio isparljivih spojeva u usporedbi s hidrodestilatom svježih i suhих uzoraka gdje su one bile prisutne u znatno manjim količinama (**Tablica 15**). Najveći udio pripadao je oleinskoj kiselini s postotkom od 31,36 %, zatim slijedi miristinska kiselina (22,38 %) i palmitinska kiselina (18,24 %) (**Tablica 16**). Dok je pentadekan bio glavni spoj vršnih para i hidrodestilata, njegov udio u CO<sub>2</sub> ekstraktu iznosio je 1,56 %. Pomoću SC-CO<sub>2</sub> bilo je moguće ekstrahirati komponente veće molekulske mase koje nisu izolirane pomoću prethodne dvije primijenjene metode, HS-SPME i HD. Poznato je da se pomoću SC-CO<sub>2</sub> dobiju ekstrakti koji su bogati masnim kiselinama i drugim nepolarnim spojevima (del Pilar Sanchez-Camargo i sur., 2017). U literaturi nema podataka vezanih uz isparljive spojeve dobivene pomoću ESCO<sub>2</sub> iz smeđe makroalge *F. virsoides*, što daje ovim rezultatima značajan doprinos u cjelokupnoj kemijskoj karakterizaciji makroalgi iz Jadranskog mora. Primjena SC-CO<sub>2</sub> za ekstrakciju spojeva iz makroalgi uglavnom je vezana za pigmente, lipide, polifenole i vitamine (Michalak i sur., 2015). Hattab i sur. (2007) analizirali su isparljive spojeve dobivene pomoću ESCO<sub>2</sub> iz smeđe makroalge *Dicyopteria membranacea* te su primijetili prisutnost

seskviterpena, C<sub>11</sub>-ugljikovodika i spojeva sa sumporom koji su bili najzastupljeniji u ekstraktu s 3-heksil-4,5-ditiacikloheptanonom kao dominantnim spojem. Upotrebom superkritičnih fluida za ekstrakciju isparljivih spojeva uklanjaju se nedostaci drugih metoda poput zagrijavanja uzorka tijekom hidrodestilacije što može uzrokovati degradaciju nekih termolabilnih spojeva (Pourmortazavi i Hajmirsadeghi, 2007).

#### 5.1.4. Sastav masnih kiselina

Ukupni lipidi iz liofiliziranih uzoraka makroalgi ekstrahirani su pomoću metode po Folch-u prilikom čega je bilo moguće dobiti vezane i slobodne masne kiseline. Ekstrakt ukupnih lipida *F. virsoides* analiziran je nakon provedenog postupka derivatizacije pomoću GC-FID analize. Određene su 22 masne kiseline koje su prikazane u **Tablici 17**. Glavne pronađene masne kiseline bili su *cis*- i *trans*-izomeri oleinske kiseline (C18:1n9t+C18:1n9c) u vrijednosti od 50,69 %, dok su druge najzastupljenije bile palmitinska (17,98 %) i miristinska kiselina (17,80 %).

Udio zasićenih masnih kiselina bio je 44,01 %, dok je udio mononezasićenih kiselina iznosio 51,73 %, a polinezasićene masne kiseline bile su prisutne u udjelu od 4,26 %. ω-6 masne kiseline zauzimale su veći udio (2,81 %), u odnosu na ω-3 masne kiseline (1,45 %). Eikosapentaenska kiselina bila je dominantna ω-3 masna kiselina (0,86 %), dok je arahidonska kiselina bila najzastupljenija ω-6 masna kiselina (0,81 %). Za porodicu Fucaceae i rod *Fucus* karakteristična je veća zastupljenost ω-6 masnih kiselina, u odnosu na ω-3 masne kiseline (Grozdanic i sur., 2019). PUFAs su poznate po svom blagotvornom utjecaju na ljudsko zdravlje (Grozdanic i sur., 2020), a posebno se ističe omjer ω-6 i ω-3 masnih kiselina koji bi trebao biti između 1,5 i 3 što je općenito prihvaćena uravnotežena vrijednost za ljudsku prehranu (van Ginneken i sur., 2011). Dobiveni rezultati za ω-6 i ω-3 masne kiseline u skladu su s prijašnjim istraživanjima koja su provedena na *F. spiralis* (Francisco i sur., 2020) i *F. vesiculosus* (Lorenzo i sur., 2017). Međutim, Najdek i sur. (2014) dobili su niže udjele oleinske (33,90 %) i miristinske kiseline (14,00 %) iz makroalge *F. virsoides* prikupljene s područja Istre. Iz dostupnih literaturnih podataka do razlike u udjelima masnih kiselina dolazi uslijed različitih mjesta i vremenskih perioda skupljanja algi. Predloženo je u prethodnim istraživanjima da sadržaj oleinske i arahidonske kiseline može varirati ovisno o sezoni skupljanja alge pri čemu je utvrđeno da je najveći udio bio prisutan kod algi koje su prikupljene tijekom ljetnog perioda (Kim i sur., 1996; Paiva i sur., 2014), dok je udio eikosapentaenske kiseline bio veći tijekom zimskog perioda (Paiva i sur., 2014). Općenito, smeđe alge su poznate po svom udjelu oleinske kiseline kao dominantne masne kiseline što je utvrđeno za mnoge vrste prikupljene iz različitih regija (Grozdanic i sur., 2020; Khotimchenko i sur., 2002; Herbreteau i sur., 1997; Silva i sur., 2013).

### 5.1.5. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SPE

Prilikom korištenja SPE dobivene su 4 frakcije (F1, F2, F3, F4), a HPLC analiza pigmenata provedena je na frakcijama F3 i F4 za koje su korištena otapala metanol (F3) i metanol:diklormetan (F4). Naime, u F1 i F2 izdvojeni su polarni spojevi primjenom otapala voda (F1) i metanol:voda (1:1, v/v; F2). Budući da su pigmenti manje polarni, njih je bilo moguće izdvojiti i koncentrirati u frakcijama F3 i F4 te je to ujedno i razlog njihovog korištenja za određivanje sastava prisutnih pigmenata. Tijekom HPLC analize frakcija F3 i F4 makroalge *F. virsoides* utvrđena je jedino prisutnost fukoksantina, dok ostali pigmenti nisu detektirani. Rezultati HPLC analize pokazuju da je veća koncentracija fukoksantina dobivena u frakciji F3 u koncentraciji od 6,15 mg/g suhe frakcije (**Tablica 18**). S druge strane, HPLC analizom frakcije F4, gdje je korištena smjesa otapala metanol:diklormetan, utvrđene su vrlo niske koncentracije fukoksantina koje su bile ispod limita detekcije. Vidljivo je da se metanol pokazao boljim otapalom za ekstrakciju fukoksantina u usporedbi s više nepolarnim otapalom metanol:diklormetan, a što je prethodno potvrđeno istraživanjima od strane Conann (2015) i Osório i sur. (2020). U navedenim istraživanjima metanol se pokazao kao najpogodnije otapalo za ekstrakciju fukoksantina zbog njegove strukture i prisutnosti hidroksilnih i epoksidnih skupina. Usporedbom dobivenih rezultata s onima u dostupnoj literaturi vidljive su značajne razlike u koncentracijama. Zaragoza i sur. (2008) analizirali su etanolni ekstrakt *F. vesiculosus* i utvrdili da je veća koncentracija fukoksantina bila prisutna kada je korištena 50-70 % vodena otopina etanola (1,24 mg/100 g), u usporedbi s ekstraktima dobivenim pomoću 30-35 % vodene otopine etanola (0,26 mg/100 g). Ramus i sur. (1977) kvantificirali su fukoksantin u *F. vesiculosus* i dobili koncentracije od 0,202 do 0,751 mg/g. S druge strane, Terasaki i sur. (2009) utvrdili su veće koncentracije fukoksantina od 0,9 mg/g. Ove utvrđene razlike među vrstama roda *Fucus* mogu biti posljedica različitih čimbenika okoliša i karakteristika samih vrsta. Maeda i sur. (2018) utvrdili su da niska temperatura morske vode i stres uzrokovan uvjetima okoliša utječu na sintezu fukoksantina te ostalih karotenoida, pri čemu su veće koncentracije bile prisutne u algama iz hladnijih područja s temperaturom mora oko 12 °C (Lalegerie i sur., 2020). Smanjenje sadržaja fukoksantina od 70 % primijećeno je u makroalgama koje su rasle u sunčanim i plićim područjima u istraživanju provedenom od strane Ramus i sur. (1977). Matishov i Makarov (2004) ispitivali su koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofili i karotenoidi) u *F. serratus* i *F. vesiculosus* tijekom dužeg izlaganja mraku i otkrili da je veća količina ukupnih karotenoida i klorofila bila prisutna u tami. Sezonske varijacije i razlike u geografskim lokacijama mogu značajno utjecati na sadržaj fukoksantina u makroalgama.

Spektrofotometrijskom analizom utvrđene su koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida u frakcijama F3 i F4, a koncentracije su navedene u **Tablici 20**. Frakcija F4 sadržavala je veće

koncentracije klorofila *a* (0,19 mg/g suhe frakcije) u usporedbi s frakcijom F3 (0,02 mg/g suhe frakcije). Klorofil *b* bio je prisutan u vrlo niskim koncentracijama, 0,06 mg/g suhe frakcije za F3 i 0,08 mg/g suhe frakcije za F4. Općenito, smeđe makroalge karakterizira prisutnost klorofila *a* i njegovih derivata čime se mogu objasniti veće koncentracije klorofila *a* u odnosu na klorofil *b*. Connan (2015) pretpostavio je da kiselost alkohola, koji se koristi za ekstrakciju, može dovesti do stvaranja produkata razgradnje, kao i derivata klorofila koji mogu ometati određivanje klorofila u ekstraktima. Najzastupljeniji derivat klorofila *a* je feofitin *a* za kojeg je poznato da je prisutan u značajnim količinama u makroalgama (Kuczynska i sur., 2015). Ukupna koncentracija karotenoida dobivena spektrofotometrijskom analizom frakcija *F. virsoides* bila je veća u frakciji F3 (0,19 mg/g suhe frakcije), dok je njihova koncentracija u F4 bila vrlo niska (0,02 mg/g suhe frakcije). Rezultati dobiveni za ukupne karotenoide mogu se povezati s koncentracijama fukoksantina koje su detektirane tijekom HPLC analize gdje je frakcija F3 sadržavala veće koncentracija fukoksantina u usporedbi s frakcijom F4.

#### 5.1.6. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Poznato je da se ESCO<sub>2</sub> primjenjuje za ekstrakciju karotenoida iz makroalgi budući da je izrazito selektivna prema tim spojevima upravo zbog nepolarnih svojstava CO<sub>2</sub> kao otapala (Fabrowska i sur., 2016; Sivagnanam i sur., 2015). Prema dobivenim rezultatima HPLC analize CO<sub>2</sub> ekstrakta *F. virsoides* u ovom istraživanju utvrđena je niža koncentracija fukoksantina u usporedbi sa ekstraktom/frakcijom dobivenom pomoću SPE, a iznosila je 5,28 mg/g suhog ekstrakta (**Tablica 19**). Dostupni literaturni podaci (Heffernan i sur., 2016; Sivagnanam i sur., 2015) pokazuju da se pomoću klasične ekstrakcije kruto-tekuće dobije veće iskorištenje fukoksantina, dok se primjenom ESCO<sub>2</sub> dobije veća čistoća same komponente što je potvrđeno za smeđe makroalge *Laminaria digitata* i *F. serratus*. Također, Heffernan i sur. (2016) dobili su veća iskorištenja fukoksantina prilikom primjene kootapala tijekom ESCO<sub>2</sub>, ali je čistoća same komponente bila niža u usporedbi kada je korišten samo CO<sub>2</sub> kao otapalo. Saravana i sur. (2017) kao kootapalo koristili su suncokretovo ulje pri čemu je dobiveno najveće iskorištenje ukupnih karotenoida i fukoksantina iz smeđe makroalge *Saccharina japonica*. Macías-Sánchez i sur. (2007) su utvrdili da iskorištenje ekstrahiranih spojeva ovisi i o primijenjenim procesnim parametrima koji imaju utjecaj na gustoću CO<sub>2</sub> i samim time na selektivnost. Povećanjem tlaka, povećava se i iskorištenje uslijed veće gustoće CO<sub>2</sub> i topljivosti spojeva u otapalu (Cheung, 1999). S druge strane, utjecaj temperature na iskorištenje je složeniji. Crampon i sur. (2011) uočili su da je povećanje temperature pri niskim tlakovima imalo negativan utjecaj na iskorištenje spojeva, dok je veća temperatura pri višim tlakovima dala veće iskorištenje. Za ekstrakciju fukoksantina iz *F. virsoides* tijekom ovog istraživanja odabrana je temperatura ekstrakcije od 40 °C kako bi se smanjila njegova degradacija. Većina dostupnih literaturnih podataka (Heffernan i sur., 2016; Fabrowska i sur., 2016; Roh i sur.,

2008) pokazuje da je najveće iskorištenje karotenoida dobiveno pri tlaku od 300 bar i temperaturi ekstrakcije od 50 °C, ali Quitain i sur. (2013) primijenili su tlak od 400 bar i temperaturu od 40 °C budući da su uočili degradaciju fukoksantina prilikom primjene veće temperature tijekom ekstrakcije iz smeđe makroalge *Undaria pinnatifida*. Osim toga, u istraživanjima drugih autora utvrđen je i utjecaj različitih vremenskih uvjeta tijekom prikupljanja uzoraka na sadržaj fukoksantina u makroalgama. *L. digitata* prikupljena u zimu i proljeće sadržavala je veće koncentracije fukoksantina, u usporedbi s onim uzorcima koji su prikupljeni u ljeto i jesen (Heffernan i sur., 2016).

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 21** vidljivo je da je udio ukupnih karotenoida iznoso 6,74 mg/g suhog ekstrakta, dok je klorofil *a* bio prisutan u većoj koncentraciji od klorofila *b* te je iznosio 7,62 mg/g suhog ekstrakta (**Tablica 21**). Razlog tomu može biti prisutnost feofitina *a* za kojeg je već literaturno dokazano da se nalazi u visokim koncentracijama u smeđim makroalgama (Silva i sur., 2019).

## 5.2. KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA CRVENE ALGE *Amphiroa rigida*

### 5.2.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani koristeći HS-SPME

Usporedbom vršnih para svježih i suhих uzoraka makroalge *A. rigida*, GC-MS analizom utvrđena je prisutnost dva neparna alkana; heptadekana i pentadekana, koji su činili većinu od ukupnog profila vršnih para. Heptadekan je u svježem uzorku bio prisutan u udjelu od 47,77 % korištenjem DVB/CAR/PDMS vlakna, dok je u suhom uzorku njegov udio iznosio 53,96 % korištenjem PDMS/DVB vlakna. Nadalje, pentadekan je bio otprilike jednako zastupljen u svježem i suhom uzorku s udjelom većim korištenjem PDMS/DVB vlakna, a iznosio je 7,08 % u svježem uzorku i 7,02 % u suhom uzorku. Drugi spojevi koji su nađeni u svježem uzorku bili su nezasićeni ugljikovodici uključujući: pentadec-1-en (do 13,05 %), heksadec-1-en (do 11,25 %), (*E*)-pentadec-7-en (do 6,00 %), (*E*)-heptadec-3-en (4,79 %), heptadec-1-en (1,04 %) i (*E*)-heptadec-8-en (0,77 %) (**Tablica 22**). Ektokarpen (6-[(*Z*)-but-1-enil]-ciklohepta-1,4-dien) jedini je ciklički nezasićeni ugljikovodik koji je identificiran u svježem uzorku. Udjeli nezasićenih ugljikovodika bili su malo drugačiji u uzorku sušenom na zraku, dok C<sub>15</sub>-alkeni nisu bili prisutni (**Tablica 22**). Youngblood i sur. (1971), Youngblood i Blumer (1973) te Clark i Blumer (1967) pronašli su zasićene i olefinske ugljikovodike u različitim vrstama morskih algi među kojima su crvene makroalge *Porphyridium cruentum*, *Gigartina* sp. i *Plocamium* sp. sadržavale visoko zasićene, ravnolančane C<sub>15</sub> i C<sub>17</sub> ugljikovodike kao glavne spojeve. Dostupni literaturni podaci navode da je heptadekan bio dominantan spoj u crvenim makroalgama uključujući *Myriogramme manginii*, *Gigartina skottisbergii*, *Cordia racovitzae* i *Georgiella confluens* (Berneira i sur., 2020). Heptadekan pronađen u vršnim parama *A. rigida* tijekom ovog

istraživanja mogao je nastati iz stearinske kiseline koja je također prisutna u ovoj algi (**Tablica 25**). Ranije je pronađeno da dekarboksilacijom stearinske kiseline nastaje heptadekan što je potvrđeno od strane McInnes i sur. (1980) na algi *Anacystis nidulans* pomoću  $^{13}\text{C}$  i  $^2\text{H}$  nuklerane magnetske rezonancije. Youngblood i Blumer (1973) utvrdili su da je prisutnost izomera heptadekana uključujući heptadec-3-en i heptadec-7-en karakteristična za crvene i smeđe makroalge.

Zasićeni aldehidi bili su druga skupina prisutnih alifatskih spojeva u svježem uzorku *A. rigida*, uključujući heksanal (do 6,72 %), heptanal, nonanal (do 1,63 %) i pentanal (do 1,25 %). Nadalje, nezasićeni alkenali koji su također bili prisutni u svježem uzorku uključivali su (*E*)-pent-2-enal, (*E*)-heks-2-enal, (*E,E*)-hepta-2,4-dienal, (*E*)-okt-2-enal i (*E*)-dec-2-enal. Od spomenutih samo su  $\text{C}_{16}$ -,  $\text{C}_{17}$ - i  $\text{C}_{18}$ -aldehidi te (*E*)-heks-2-enal identificirani u suhom uzorku *A. rigida*. Heksanal je bio glavni identificirani aldehyd u svježem i suhom uzorku *A. rigida*, a pretpostavlja se da je on nastao degradacijom linolne kiseline koja je isto tako detektirana u *A. rigida* (**Tablica 25**). Prisutnost heksanala potvrđena je ranije i u drugim morskim algama koje su istraživane od strane Boonprab i sur. (2003; 2014). Općenito, aldehidi koji su nađeni u makroalgama mogu nastati degradacijom PUFAs autooksidacijom ili djelovanjem enzima lipoksigenaze (Le Pape i sur., 2004), a Bemeira i sur. (2020) uočili su povećanje koncentracije aldehida u crvenim makroalgama uslijed smanjenja koncentracije PUFAs. Dostupna literaturna istraživanja (Boonprab i sur., 2006; Azarbad i Jelen, 2015) ukazuju da uzastopnim djelovanjem lipoksigenaze/hidroperoksid liaze iz linolne kiseline nastaje heksanal. Za pojedine aldehide, poput  $\text{C}_7$ ,  $\text{C}_8$  i  $\text{C}_{10}$  nezasićenih aldehida, utvrđena je obrambena uloga (Pohnert, 2005), a osim u crvenim makroalgama pronađeni su u zelenim i smeđim makroalgama (Takahasi i sur., 2002; Sugisawa i sur., 1990), jastozima (Lee i sur., 2001) i kamenicama (Pennarun i sur., 2002).

Nekoliko alifatskih alkohola i alkenola pronađeno je u svježem uzorku *A. rigida* poput heksan-1-ola (do 2,36 %), (*Z*)-pent-2-en-1-ola (do 1,22 %), tetradekan-1-ola (do 1,02 %), pentan-1-ola (do 0,86 %), okt-1-en-3-ola (do 0,50 %) i oktan-1-ola (do 0,49%). Među njima samo je okt-1-en-3-ol bio prisutan i u suhom uzorku *A. rigida* u udjelu do 0,51 %, jednako kao i u svježem uzorku. Aldehidi se mogu enzimski ili spontano pretvoriti u druge alkohole ili alkenole. 6-Metilhept-5-en-2-on jedini je alifatski keton koji je bio prisutan u svježem (do 0,67 %) i u suhom uzorku (do 0,90 %), dok su oktan-2,3-dion i (*E,E*)-okta-3,5-dien-2-on bili prisutni samo u suhom uzorku. 6-Metilhept-5-en-2-on je bio najzastupljeniji keton, a ranije je pronađen i u drugim algama poput zelene alge *Capsosiphon fulvescens* (Sun i sur., 2012).

(*E*)- $\beta$ -Jonon pronađen u svježem (do 1,55 %) i u suhom uzorku (do 0,53 %) te  $\beta$ -ciklocitral pronađen samo u svježem uzorku (do 0,78 %) predstavljaju razgradne produkte karotenoida, točnije  $\beta$ -karotena koji je detektiran u *A. rigida* tijekom ovog istraživanja (**Tablica 26**). Ranijim



istraživanjima potvrđeno je da navedeni spojevi nastaju enzimskim cijepanjem  $\beta$ -karotena (Ishida i Bartley, 2005), a njihova prisutnost utvrđena je i u ostalim morskim algama koje su analizirane u radu autora Jüttner (1995). U kasnijim fazama razgradnje karotenoida, tijekom oksidacije dugolančanih međuprodukata, povećava se količina mono- i dioksigeneranih spojeva među kojima je i  $\beta$ -ciklocitral (Silva Ferreira i sur., 2008). Dostupna istraživanja ukazuju na različita biološka djelovanja  $\beta$ -ciklocitrala,  $\alpha$ -jonona i  $\beta$ -jonona poput inhibitornih učinaka na rast *Chlorella pyrenoidosa* (Ikawa i sur., 2001). Nadalje, utvrđeno je da  $\beta$ -ciklocitral može uzrokovati pucanje stanica diatoma *Nitzschia palea* (Chang i sur., 2011), a visoke koncentracije  $\beta$ -ciklocitrala utjecale su na sprječavanje rasta cijanobakterije *Microcystis* koja je odgovorna za štetno cvjetanje algi (Ozaki i sur., 2008).

U svježim i suhim uzorcima *A. rigida* pronađen je benzaldehid čiji je udio bio veći u svježim uzorcima (do 1,60 %). S druge strane, benzil-alkohol pronađen je isključivo u suhom uzorku s udjelom do čak 9,44 %. Identificirana su i tri seskviterpena uključujući germakren D i  $\beta$ -burbonen koji su bili prisutni u svježem i suhom uzorku te  $\alpha$ -kubenen koji je potvrđen jedino u svježem uzorku. Osim toga, tribrommetan nađen je u svježem uzorku u udjelu do 1,52 %, a njegova prisutnost ranije je potvrđena i u drugim smeđim makroalgama poput *Ascophyllum nodosum* (Newman i Gschwend, 1987) i *Halopteris filicina* (Garbary i Johansen, 1987; Jerković i sur., 2018). La Barre i sur. (2010) utvrdili su da su makroalge sposobne fiksirati halogene ione u prisutnosti vodikovog peroksida i pomoću djelovanja haloperoksidaze, čime dolazi do njihove oksidacije i kao takvi mogu reagirati s organskim supstratima.

Usporedbom vršnih para svježeg i suhog uzorka uočene su sličnosti u prisutnosti glavnih detektiranih spojeva (**Tablica 22**) poput heptadekana, pentadekana, heksanala, (*E*)-heks-2-enala i (*E*)-heptadec-3-ena, ali i nekih spojeva koji su prisutni u manjim količinama uključujući heptanal, okt-1-en-3-ol, 6-metilhept-5-en-2-on, (*E*)-okt-2-enal, nonanal i benzaldehid. Međutim, neki spojevi poput 2-pentilfurana, benzil-alkohola, oktan-2,3-diona, (*E*)-okta-3,5-dien-2-ona i dekanala detektirani su jedino u suhom uzorku što upućuje na nastajanje produkata oksidacije tijekom postupka sušenja na zraku. Najveća razlika bila je u postotku prisutnog benzil-alkohola u suhom uzorku u udjelu do 9,44 %, a koji je mogao nastati iz benzil aldehida tijekom sušenja na zraku. Također, DMS je bio prisutan jedino u suhom uzorku, a poznat je kao osmolit algi koji potječe od DMSP za kojeg je ranije potvrđena prisutnost u raznim vrstama makroalgi u istraživanju provedenom od strane Malin i Kirst (1997). Nadalje, prisutnost 2-pentilfurana u suhom uzorku *A. rigida* može se pripisati oksidacijskoj razgradnji linolenske kiseline ili razgradnji šećera tijekom Maillardovih reakcija što je uočeno u ranijim istraživanjima Gu i sur. (2013) te Fors (1983).

### 5.2.2. Isparljivi spojevi izolirani koristeći HD

Dominantan spoj u hidrodestilatu svježeg uzorka *A. rigida* bio je (*E*)-fitol u postotku od 41,75 %, a prisutan je bio i njegov razgradni produkt fiton (2,21 %) (**Tablica 23**). Za prisutnost diterpenskog alkohola (*E*)-fitola u publiciranim istraživanjima potvrđeno je da se većinom nalazi u makroalgama koje sadrže visoke koncentracije klorofila *a* (De Souza i Nes, 1969), a potvrđeno je da se nalazi i u eteričnom ulju nekih zelenih makroalgi (Jerković i sur., 2019; Yin i sur., 2005). Crvene makroalge poznate su po većem sadržaju klorofila *a* u odnosu na zelene makroalge (Bianchi i sur., 1997) tako da bi detektirani (*E*)-fitol mogao nastati razgradnjom klorofila *a* koji je također detektiran u *A. rigida* korištenoj u ovom istraživanju (**Tablica 26**). Nadalje, oksidacijom fitola može nastati metilirani keton masne kiseline, heksahidrofarnezil acetone (fiton) koji je pronađen u hidrodestilatu suhog uzorka u većem udjelu (7,28 %), nego u svježem uzorku (2,21 %). Porast udjela u suhom uzorku upućuje na razgradnju fitola tijekom procesa sušenja. Rontani i Volkman (2003) utvrdili su da fiton predstavlja rezultat hidrolize klorofila, a može biti i fotoprodukt bakterioklorofila *a* te produkt biorazgradnje fitola.

U svježim i suhim uzorcima pronađena su dva hidroazulenska diterpena; pačidiktiol A (2,97 % u svježem uzorku; 1,11 % u suhom uzorku) i izopačidiktiol A (2,41 % u svježem uzorku; 1,75 % u suhom uzorku). Oba spoja prethodno su već utvrđena u smeđoj makroalgi *Dictyota crenulata* (De-Paula i sur., 2008). Diterpenski alkohol epimanol bio je prisutan u svježem i suhom uzorku s udjelima od 3,18 % za svježi uzorak te 1,77 % za suhi uzorak. S druge strane, diterpen koji pripada skupini abietana, feruginol pronađen je jedino u hidrodestilatu svježeg uzorka u udjelu od 1,45 %. Seskviterpeni uključujući  $\beta$ -burbonen, germakrem D, kubebol, *trans*-farnezol i eudesma-4(15),7-dien-1- $\beta$ -ol bili su detektirani u hidrodestilatima svježeg i suhog uzorka, dok je kubenol bio prisutan jedino u suhom uzorku (**Tablica 23**). Navedeni spojevi nisu nađeni u vršnim parama *A. rigida* vjerojatno zbog niže isparljivosti te ih je bilo moguće izolirati jedino hidrodestilacijom.

U usporedbi s vršnim parama uzoraka gdje su alkani heptadekan i pentadekan bili dominantni, u hidrodestilatu oni su bili prisutni u znatno nižim količinama. Svježi uzorak je sadržavao 3,80 % heptadekana i 12,22 % pentadekana, dok je u suhom uzorku bilo 2,36 % heptadekana i 0,91 % pentadekana. Viši alifatski alkeni koji su pronađeni u vršnim parama, u hidrodestilatu su bili prisutni kao manje zastupljeni spojevi, npr. pentadec-1-en, (*E*)-pentadec-7-en, (*E*)-heptadec-8-en i (*E*)-heptadec-3-ene. Također, identificirani su zasićeni i nezasićeni karbonilni spojevi uključujući (*E*)-heks-2-enal, heptanal, 6-metilhept-5-en-2-on, oktan-2-on, oktanal, (*E*)-okt-2-enal, nonan-2-on, nonanal, undekan-2-on, pentadekanal i heptadekan-2-on. Nadalje, identificirano je i nekoliko alifatskih alkanola i alkenola, npr. 2-etilheksan-1-ol, oktan-1-ol, dodekan-1-ol, tridekan-1-ol, pentadekan-1-ol, (*E*)-heksadec-11-en-1-ol i heksadekan-1-ol. Dva

derivata benzena, benzil-alkohol i 2-fenilacetaldehid, pronađena su u hidrodestilatu svježeg i suhog uzorka.

Iz **Tablice 23** može se primijetiti da su profili isparljivih spojeva dobiveni hidrodestilacijom iz svježeg i suhog uzorka bili značajno različiti. Najviše se izdvaja udio (*E*)-fitola čiji je udio u suhom uzorku iznosio 16,44 % što je značajno manje u usporedbi sa svježim uzorkom. Međutim, udio njegovog razgradnog produkta, fitona, porastao je u hidrodestilatu suhog uzorka na 7,28 % što ukazuje na njegovu degradaciju tijekom sušenja. Također, udio heptadekana povećao se na 12,22 %, (*E*)-heptadec-8-ena na 2,02 % te (*E*)-heptadec-3-ena na 2,50 % što upućuje na intenzivniju razgradnju masnih kiselina. Odvijanje oksidacijskih reakcija tijekom sušenja očituje se i u povećanim udjelima spojeva sa kisikom kao što su (*E*)-heks-2-enal, heptanal, oktan-2-on, oktanal, (*E*)-okt-2-enal, oktan-1-ol, nonanal, dekan-2-on, pentadekanal, pentadekan-1-ol, heksadekan-1-ol i heptadekan-2-on. Potvrđena je intenzivnija razgradnja masnih kiselina budući da su nastali novi oksidirani spojevi kao što su heptan-2-on, (*E*)-hept-2-enal, okt-1-en-3-ol, oktan-2,3-dion, (*E,Z*)-okta-3,5-dien-2-on, (*E,E*)-okta-2,4-dienal, (*E,Z*)-nona-2,6-dienal, (*Z*)-non-2-enal, dekanal, dekan-1-ol, (*E,Z*)-deka-2,4-dienal, (*E,E*)-deka-2,4-dienal, undekan-1-ol, dodekan-1-ol, tridekanal, tetradekanal, (*Z*)-heksadec-11-en-1-ol i oktadekanal. Nadalje, uočeni su i produkti razgradnje karotenoida poput  $\beta$ -jonona, čiji se udio povećao u suhom uzorku (2,55 %), te  $\beta$ -ciklocitrala koji je bio prisutan jedino u suhom uzorku (0,16 %).

### 5.2.3. Isparljivi spojevi ekstrahirani pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Prema rezultatima GC-MS analize CO<sub>2</sub> ekstrakta dobivenog iz liofiliziranog uzorka *A. rigida* utvrđena je dominantnost masnih kiselina kao glavnih spojeva ekstrakta (**Tablica 24**). Palmitinska kiselina bila je najzastupljenija u udjelu od 40,63 %, zatim oleinska s udjelom od 13,30 % te (*E*)-fitol 9,14 %. Dominantni spojevi vršnih para, heptadekan i pentadekan, bili su prisutni i u CO<sub>2</sub> ekstraktu samo u značajno nižim udjelima. Heptadekan je bio prisutan u udjelu od 3,00 %, dok je pentadekan bio prisutan sa 0,11 %. Nadalje, (*E*)-fitol koji je u hidrodestilatu bio najzastupljeniji spoj (41,75 %), u CO<sub>2</sub> ekstraktu on je zastupljen sa 9,14 % što može upućivati na razgradnju klorofila *a* i u CO<sub>2</sub> ekstraktu liofiliziranog uzorka *A. rigida*, ali u manjoj mjeri nego što je to bilo tijekom HD.  $\beta$ -Jonon bio je prisutan u udjelu od 0,19 % što je vrlo slično udjelu u hidrodestilatu svježeg uzorka *A. rigida* (0,29 %). Tijekom postupka liofilizacije uzorka *A. rigida* i ESCO<sub>2</sub> karotenoidi se nisu degradirali u tolikoj mjeri koliko se to odvijalo tijekom sušenja na zraku i HD suhog uzorka, s obzirom da je tada udio  $\beta$ -jonona bio veći (2,55 %). Općenito, u crvenim makroalgama vrlo je kompleksan sadržaj isparljivih spojeva, a ranije je utvrđeno da su glavne skupine spojeva esteri masnih kiselina i ugljikovodici (Kamenarska i sur., 2006) što je dobiveno i tijekom ovog istraživanja prilikom analize CO<sub>2</sub> ekstrakta *A. rigida*.

Sadržaj estera masnih kiselina može varirati čak i između algi koje pripadaju istom rodu, poput *Corallina* i *Polysiphonia* rodova crvenih makroalgi (Riguera i sur., 1984; Kamenarska i sur., 2000). Dostupna literaturna istraživanja pokazuju da esteri masnih kiselina imaju vrlo važne uloge u algama, kao što imaju u kopnenim biljkama gdje su odgovorni za komunikaciju između insekata i biljaka te se pretpostavlja da je sličan mehanizam i u algama (Kamenarska i sur., 2006). Kanas i sur. (1992) utvrdili su da se antibiotska aktivnost pojedinih algi može pripisati stearinskoj, linolnoj, palmitinskoj, miristinskoj, laurinskoj i kaprinskoj kiselini, a sve navedene kiseline pronađene su i u CO<sub>2</sub> ekstraktu *A. rigida* (**Tablica 24**). Kamenarska i sur. (2006) primijetili su da crvena makroalga *Callithamnion granulatum* sadrži jedino kratkolančane masne kiseline (4-6 C atoma) te su zaključili da masne kiseline mogu biti taksonomski markeri pojedinih vrsta.

Nadalje, terpeni su vrlo važni isparljivi spojevi, no u crvenim makroalgama nalaze se u niskim koncentracijama. U CO<sub>2</sub> ekstraktu *A. rigida* nađeni su dihidroaktinidiolid (0,36 %) te heksahidrofarnezil-aceton (0,33 %) za koje je od ranije poznato da se nalaze u većini crvenih makroalgi i predstavljaju razgradne produkte β-karotena (Kamenarska i sur., 2006). Također, od strane Sakan i sur. (1967) utvrđeno je da navedeni spojevi posjeduju različite bioaktivnosti kao feromonski spojevi za prepoznavanje matice *Solenopsis invicta* Buren (crveni vatreni mrav) te kao zaštitna barijera protiv gljivičnih patogena.

#### 5.2.4. Sastav masnih kiselina

Ekstrakt ukupnih lipida liofiliziranog uzorka *A. rigida* analiziran je pomoću GC-FID analize te je utvrđena prisutnost 14 masnih kiselina, a iste su navedene u **Tablici 25**. Dominantna masna kiselina bila je palmitinska kiselina s udjelom od 42,86 %, zatim slijedi eikosapentaenska (19,14 %) te stearinska kiselina (11,65 %). Ukupni sadržaj zasićenih masnih kiselina iznosio je 59,65 %, a zatim su po zastupljenosti utvrđene PUFAs s 33,16 %. Za PUFAs je poznato da imaju važnu ulogu u prevenciji različitih srčanih bolesti, ateroskleroze, dijabetesa tipa 2 te pretilosti. Općenito, prisutnost različitih esencijalnih masnih kiselina karakteristična je za crvene makroalge rodova Gigartinales, Corallinales i Gracilariales. Alge koje pripadaju navedenim rodovima poznate su po visokim udjelima eikosapentaenske kiseline i arahidonske kiseline (Pereira i sur., 2012a; Galloway i sur., 2012). Budući da *A. rigida* istražena tijekom ove doktorske disertacije sadrži visoke udjele eikosapentaenske kiseline, potencijalno se može koristiti kao izvor ove visokovrijedne esencijalne ω-3 masne kiseline. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila njena bioraspoloživost. *A. rigida* ispitana u ovom istraživanju sadržavala je značajno veću količinu eikosapentaenske kiseline (19,14 %), u usporedbi s drugim ranije ispitanim crvenim makroalgama čije su se vrijednosti eikosapentaenske kiseline kretale od 0,47 % do 7,95 % (Bernerira i sur., 2020). Jayasree i sur.

(2012) ispitivali su sastav masnih kiselina *A. anceps* i utvrdili da je palmitinska kiselina bila dominantna s 57,57 %, zatim je slijedila arahidonska kiselina (18,67 %), dok je udio eikosapentaenske kiseline bio nizak i iznosio je 2,46 %. S druge strane, *A. beauvoisii* istražena od strane Jayasree i sur. (2012) imala je veću količinu eikosapentaenske kiseline (25,2 %). Razlike u količinama masnih kiselina među vrstama koje pripadaju istom rodu mogu biti uslijed korištenja različitih metoda ekstrakcije, izloženosti različitim abiotičkim čimbenicima i geografskom području što rezultira različitim profilima masnih kiselina (Fleury i sur., 2011). Istraživanja skupine autora Li i sur. (2002) te Schmid i sur. (2014) ukazuju na to da crvene makroalge sadrže visoke koncentracije arahidonske kiseline koja nije pronađena u ovom istraživanju na makroalgi *A. rigida*.

### 5.2.5. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SPE

Na primjeru smeđe alge *F. virsoides* (odlomak 5.1.5.) objašnjeno je da su za HPLC analizu pigmenata iz svih makroalgi tijekom ove doktorske disertacije korištene jedino frakcije F3 i F4 dobivene pomoću SPE. Rezultati dobiveni HPLC analizom frakcija F3 i F4 pokazali su prisutnost različitih pigmenata s obzirom na primijenjeno otapalo (**Tablica 26**). Ranijim istraživanjima drugih autora (Aburai i sur., 2013; Henriques i sur., 2007), metanol i metanol:diklormetan pokazali su se kao pogodna otapala za ekstrakciju lipofilnih pigmenata poput klorofila i karotenoida iz makroalgi, a to je ujedno i razlog njihovog korištenja tijekom ove doktorske disertacije. Prilikom korištenja metanola bilo je moguće ekstrahirati lutein i fukoksantin koji su detektirani u frakciji F3. Lutein je bio dominantan pigment u frakciji F3 s koncentracijom od 5,83 mg/g suhe frakcije, a fukoksantin je bio prisutan u znatno nižoj koncentraciji (0,63 mg/g suhe frakcije). Niti lutein niti fukoksantin nisu detektirani u frakciji F4 za čije je dobivanje korišteno manje polarno otapalo, smjesa metanol:diklormetan. Nadalje, u frakciji F4 detektiran je klorofil a u koncentraciji od 13,65 mg/g suhe frakcije te  $\beta$ -karoten (6,18 mg/g suhe frakcije).  $\alpha$ -Karoten je također detektiran u frakciji F4, ali je njegova koncentracija bila ispod limita detekcije. Iako je za crvene makroalge poznato da  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten predstavljaju glavne pigmente, tijekom ovog istraživanja nisu utvrđene visoke koncentracije  $\alpha$ -karotena. Visoka koncentracija luteina pronađenog u *A. rigida* tijekom ovog istraživanja može se objasniti hidroksilacijom  $\alpha$ -karotena koja je ranije potvrđena od strane autora Takaichi (2011).

Kavalappa i sur. (2019) za ekstrakciju pigmenata iz crvene alge *Gracillaria* spp. koristili su sličnu smjesu otapala, metanol:diklormetan:voda. Crvena alga *Gracillaria* spp. sadržavala je  $\beta$ -karoten i lutein kao dominantne pigmente, a što je utvrđeno i za *A. rigida* tijekom ovog istraživanja. Općenito, prisutnost  $\beta$ -karotena i luteina karakteristična je za crvene alge koje pripadaju rodu Corallinales u koji spada i *A. rigida*. Vrlo je teško pronaći povezanost između profila pigmenata i filogenije crvenih algi, budući da postoje suprotna istraživanja vezana uz

sastav pigmenata. Pojedina istraživanja tvrde da su glavni ksantofili u crvenim algama zeaksantin i lutein (Bjørnland i Aguilar-Martinez, 1976), dok su drugi utvrdili da je profil pigmenata kompleksniji te da sadrže fukoksantin i neoksantin (Schubert i sur., 2006). Tijekom ove doktorske disertacije u *A. rigida* pronađeni su lutein i fukoksantin, što nije bilo u skladu sa spomenutim istraživanjima, a to ukazuje na veliku raznolikost profila pigmenata među crvenim algama. Nedostatak nekih pigmenata, poput zeaksantina koji je karakterističan za crvene alge, može biti objašnjen činjenicom da pojedine alge nemaju sposobnost sintetiziranja tog pigmenta, što ovisi o sposobnosti akumuliranja svjetlosti. Schubert i sur. (2006) nisu detektirali zeaksantin u vrstama koje su prikupljene u zonama oseke, dok se u vrstama prikupljenim u zoni plime on nalazio u visokim koncentracijama. Nadalje, u istom tom istraživanju utvrđeno je da je lutein bio dominantan karotenoid u algama iz roda Corallinales, dok je zeaksantin bio prisutan u vrlo niskim koncentracijama ili uopće nije detektiran. Bjørnland i Aguilar-Martinez (1976) utvrdili su da prisutnost fukoksantina u nekim algama može biti posljedica kontaminacije uzoraka epifitima. Prema literaturnim podacima (Bianchi i sur., 1997), među klorofilima *a*, *b*, *c* i *d* koji mogu biti prisutni u algama, jedino je klorofil *a* prisutan u crvenim makroalgama što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Količina prisutnog klorofila *a* ovisi o dostupnoj sunčevoj svjetlosti. Naime, Pereira i sur. (2012b) utvrdili su da je udio klorofila *a* najviši u mjesecima kada je sunčeva svjetlost ograničena. Roy (2020) je ispitivao udio klorofila *a* u različitim crvenim algama, a rezultati su pokazali da je udio pronađen u *A. fragilissima* bio niži kada se uspoređi s vrijednostima dobivenim ovim istraživanjem, dok je udio pronađen u drugoj crvenoj algi *Gracilaria foliifera* bio vrlo sličan udjelu u *A. rigida* koja je korištena u ovom istraživanju.

Prema dobivenim rezultatima spektrofotometrijskog određivanja pigmenata u frakcijama F3 i F4, utvrđeno je da su karotenoidi bili više zastupljeni u frakciji F3 (0,57 mg/g suhe frakcije), nego u frakciji F4 (0,24 mg/g suhe frakcije) (**Tablica 28**). Nadalje, koncentracije klorofila *a* i *b* također su bile veće u frakciji F3, a iznosile su 0,75 mg/g suhe frakcije za klorofil *a* i 0,98 mg/g suhe frakcije za klorofil *b*. Osório i sur. (2020) ispitivali su različita otapala za ekstrakciju klorofila iz crvene makroalge *Porphyra* sp. te su utvrdili da se prilikom korištenja metanola dobije njihova najveća koncentracija. Korištenjem otapala koja imaju niski pH, može doći do degradacije klorofila ili stvaranja različitih kompleksa pri čemu se ometa njihova detekcija tijekom spektrofotometrijskog određivanja. Taj problem se može riješiti neutralizacijom otapala koja se koriste tijekom ekstrakcije i spektrofotometrijske analize (Osório i sur., 2020)

### 5.2.6. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SC-CO<sub>2</sub>

Nakon provedene ESCO<sub>2</sub> liofiliziranog uzorka *A. rigida* i HPLC analize, uočena je prisutnost karotenoida koji su detektirani i u frakcijama F3 i F4, no bez prisutnosti klorofila *a* čime se potvrdila selektivnost metode za karotenoide (**Tablica 27**). Fukoksantin je bio prisutan u koncentraciji od 0,76 mg/g suhog ekstrakta što je iznosilo malo više od koncentracije dobivene koristeći SPE. Međutim, koncentracije za lutein (0,41 mg/g suhog ekstrakta) i β-karoten (0,90 mg/g suhog ekstrakta) bile su niže u odnosu na one dobivene koristeći SPE. Machmudah i sur. (2018) uočili su da se uz dodatak nekog polarnog kootapala, poput etanola, mogu dobiti veće koncentracije ekstrahiranih karotenoida, ali tada se promijenila i sama selektivnost metode. Gamlieli-Bonshhtein i sur. (2002) uspjeli su pomoću ESCO<sub>2</sub> odvojiti *cis*- i *trans*-izomere β-karotena pri uvjetima tlaka od 440 bar i temperature ekstrakcije 40 °C. Međutim, naglasili su da je prilikom ekstrakcije vrlo bitno usitnjavanje uzorka budući da o tome ovisi prijenos željenih komponenti iz materijala u otapalo te da se usitnjavanjem povećava površina uzorka i samim time se postižu veća iskorištenja. Također, Mendes i sur. (1995) utvrdili su da je veće iskorištenje karotenoida dobiveno iz usitnjene alge, za razliku od iskorištenja dobivenog kada je korištena cjelovita alga pri uvjetima od 40-55 °C i tlakom od 350 bar. Nadalje, Messyasz i sur. (2018) uočili su da su veće koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida bile prisutne u CO<sub>2</sub> ekstraktu prilikom usporedbe s ekstraktima dobivenim Soxhlet ekstrakcijom iz crvene makroalge *Polysiphonia fucooides*. Također, utvrdili su da je CO<sub>2</sub> ekstrakt dobiven pri tlaku 500 bar i temperaturi 40 °C imao optimalan sastav za primjenu u kozmetičkim proizvodima. Dostupna su i istraživanja koja navode biološki aktivna svojstva CO<sub>2</sub> ekstrakata različitih algi. Ekstrakti dobiveni iz crvene makroalge *Gracilaria mammillaris* pokazali su antioksidacijska djelovanja i spriječili oksidaciju jestivog ulja (Ospina i sur., 2017). Nadalje, Michalak i sur. (2016) pokazali su da su ekstrakti crvene makroalge *Polysiphonia fucooides* imali povoljno djelovanje na rast pšenice te na povećanje klorofila i karotenoida u pšenici prilikom njenog rasta.

U **Tablici 29** prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih koncentracija klorofila i karotenoida u CO<sub>2</sub> ekstraktu. Može se primijetiti da su koncentracije klorofila *a* i *b* vrlo niske (0,44 mg/g suhog ekstrakta za klorofil *a*, 0,01 mg/g suhog ekstrakta za klorofil *b*), dok je koncentracija karotenoida bila veća te je iznosila 2,22 mg/g suhog ekstrakta. Istraživanje provedeno od strane Vimala i Poonghuzhali (2013) pokazalo je da su ekstrakti crvene makroalge *Amphiroa* sp. u 80 % acetonu sadržavali najniže koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u usporedbi sa smeđim i zelenim makroalgama koje su korištene tijekom njihovog istraživanja.

## 5.3 KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ZELENE ALGE *Codium bursa*

### 5.3.1. Isparljivi spojevi vršnih para izolirani koristeći HS-SPME

Glavni spoj vršnih para svježeg uzorka *C. bursa* bio je 2-tiapropan (DMS) u udjelu od 36,22 % koristeći PDMS/DVB vlakno te 56,51 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno (**Tablica 30**). Poznato je da alge imaju značajnu ulogu u biogeokemijskom kruženju sumpora u prirodi. Ključni kemijski spojevi koji pokreću takve cikluse su većinom niskomolekularni i/ili isparljivi spojevi. Prilikom kruženja sumpora, glavni spoj je upravo DMS nastao iz dimetilsulfoniopropionata (DMSP) koji je prisutan u velikom broju vrsta zelenih makroalgi, dok je u smeđim i crvenim pronađen u vrlo niskim koncentracijama (Malin i Kirst, 1997). DMSP i DMS služe za smanjenje oksidacijskog stresa uklanjajući hidroksilne radikale i druge ROS (Sunda i sur., 2002). DMSP je prisutan i u drugim vrstama zelenih makroalgi, a posebno je istražena njegova raspostranjenost u algi *C. fragile* koja je prikupljena s različitih mjesta Nove Škotske u različitim vremenskim periodima (Lyons i sur., 2010). Nadalje, u vršnim parama svježeg uzorka *C. bursa* heptadekan je bio drugi spoj po zastupljenosti čiji je veći udio dobiven pomoću PDMS/DVB vlakna (32,51 %). Dostupna istraživanja isparljivih spojeva iz različitih makroalgi (Youngblood i sur., 1971; Youngblood i Blumer, 1973) potvrdila su da su zasićeni ugljikovodici pronađeni i u drugim vrstama morskih algi bentosa gdje je heptadekan bio dominantan u crvenim algama, ali je njegov udio bio visok i u *C. fragile*. Ranijim istraživanjem utvrđeno je da alifatski ugljikovodici nastaju procesima dekarboksilacije masnih kiselina što je istraženo posebno za stearinsku kiselinu iz koje je prilikom inkubacije direktnom dekarboksilacijom nastao heptadekan (Han i sur., 1969).

Alifatski aldehidi i alkoholi pronađeni u vršnim parama svježeg uzorka *C. bursa* nastali su razgradnjom PUFAs. Nonanal (3,51 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 2,51 % koristeći PDMS/DVB vlakno), oktanal (0,81 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 0,10 % koristeći PDMS/DVB vlakno) i dekanal (1,01 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 0,42 % koristeći PDMS/DVB vlakno), vjerojatno su nastali razgradnjom linolne kiseline. S druge strane, alifatski alkoholi poput okt-1-en-3-ola (1,12 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 9,71 % koristeći PDMS/DVB vlakno) i oktan-1-ola (0,62 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 0,20 % koristeći PDMS/DVB vlakno) nastali su iz arahidonske kiseline. Ranija istraživanja potvrdila su mehanizme razgradnje linolne kiseline u aldehide (Tanchotikul i Hsieh, 1989), dok se cijepanjem arahidonske kiseline uz prisustvo vode i lipoksigenaza stvaraju biosintetski putevi za vinilne alkohole (Barofsky i Pohnert, 2007). U vršnim parama svježeg uzorka *C. bursa* pronađeni su i aromatski spojevi, uključujući benzaldehid (5,21 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 4,73 % koristeći PDMS/DVB vlakno) i benzil-alkohol (9,31 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 0,20 % koristeći PDMS/DVB vlakno). Boatright i sur. (2004) utvrdili su da navedeni



spojevi nastaju skraćivanjem bočnog lanca fenilalanina pomoću oksidacijskih procesa, ali mogu nastati i neoksidacijskim putem.

Sastav vršnih para suhog uzorka *C. bursa* bio je znatno drugačiji od svježeg uzorka. Naime, glavni spoj vršnih para suhog uzorka bio je heptadekan u udjelu od 52,62 % (**Tablica 30**), vjerojatno uslijed gubitka DMS-a. DMS kao glavni spoj u svježem uzorku, u suhom uzorku je bio zastupljen sa postotkom do 3,72 % što može biti posljedica njegove visoke isparljivosti i niske molekulske mase. Osim DMS-a, još jedan razgradni produkt DMSP-a bio je prisutan u suhom uzorku, a to je dimetilsulfoksid u udjelima od 1,52 % prilikom korištenja DVB/CAR/PDMS vlakna i 2,63 % prilikom korištenja PDMS/DVB vlakna. Nadalje, pojavilo se i nekoliko zasićenih ugljikovodika u niskim udjelima, poput pentadekana, heksadekana, oktadekana i nonadekana, zajedno s dva nezasićena alkena, (*E*)-heptadec-8-en i nonadec-1-en. C<sub>13</sub>-norizoprenoidi uključujući (*E*)- $\alpha$ -jonon (6,40 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 3,02 % koristeći PDMS/DVB vlakno), (*E*)- $\beta$ -jonon (1,52 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 1,02 % koristeći PDMS/DVB vlakno) i 4-ketoizoforon (0,10 % koristeći DVB/CAR/PDMS vlakno; 0,10 % koristeći PDMS/DVB vlakno) upućuju na razgradnju karotenoida tijekom procesa sušenja. Ranijim istraživanjima je potvrđeno da norizoprenoidi mogu nastati enzimskim (Schmidt i sur., 2006) ili neenzimskim (Winterhalter i Rouseff, 2001) cijepanjem uz prisutnost svjetlosti, kisika i povišene temperature. Oksigenirani alifatski spojevi kao što su heksan-1-ol, oktan-2,3-dion, 6-metilhept-5-en-2-on, 2-etilhept-5-en-2-on i (*E*)-okt-2-enal također su pronađeni u vršnim parama suhog uzorka *C. bursa*.

### 5.3.2. Isparljivi spojevi izolirani koristeći HD

Hidrodestilat svježeg uzorka *C. bursa* sadržavao je zasićene alifatske ugljikovodike kao glavne spojeve među kojima su heptadekan u udjelu od 23,44 % i dokosan s udjelom od 13,90 % (**Tablica 31**). Dokosan je identificiran i ranije u zelenoj makroalgi *C. fragile* nakon destilacije vodenom parom dikolormetanskog ekstrakta (Erakin i Güven, 2008), a isto tako bio je prisutan u manjem udjelu (1,14 %) u eteričnom ulju *C. fragile* (Yilmaz Koz i sur., 2009). Yilmaz Koz i sur. (2009) utvrdili su prisutnost i drugih dominantnih ugljikovodika u liofiliziranim uzorcima *C. fragile* uključujući trikosan (11,88 %), 2,2,4-trimetil-1,3-dioksolan (8,53 %), heksadekan (4,07 %), eikosan (3,83 %) i tetrakosan (3,48 %). Nadalje, u hidrodestilatu svježeg uzorka *C. bursa* utvrđena je prisutnost diizooktil-ftalata (13,30 %) i dibutil-ftalata (9,80 %) koji su po zastupljenosti bili odmah poslije ugljikovodika (**Tablica 31**). Namikoshi i sur. (2006) utvrdili su različitim analizama da alge imaju sposobnost prirodnog sintetiziranja dialkil-ftalata. GC-MS analiza hidrodestilata svježeg uzorka *C. bursa* pokazala je prisutnost (*E*)-fitola u udjelu od 3,31 % zajedno s njegovim derivatom fitonom koji je bio prisutan u nižem udjelu (1,61 %). Prisutnost

linearnog diterpenskog alkohola *trans*-fitola i njegovih acetatnih derivata prethodno je potvrđena u ekstraktu zelene makroalge *C. fragile* (Yin i sur., 2005).

Nakon provedenog sušenja na zraku uzoraka *C. bursa*, uočen je značajno drugačiji sastav hidrodestilata. Udio (*E*)-fitola u hidrodestilatu suhog uzorka značajno je porastao u odnosu na hidrodestilat svježeg uzorka, a njegov udio iznosio je 58,42 %. Osim toga, povećao se i udio fitona te je njegov udio iznosio 5,91 %. Ranijim istraživanjem (Hörtensteiner, 1999) utvrđeno je da fitol nastaje razgradnjom klorofila, dok fiton nastaje oksidacijom fitolnog dijela klorofila čime nastaje dugolančani metilirani keton, heksahidrofarnezil aceton. U hidrodestilatu suhog uzorka došlo je do značajnog smanjenja udjela dibutil-ftalata na 1,03 %, dok je diizooktil-ftalat u potpunosti nestao (**Tablica 31**). Također, postotak benzil-alkohola smanjen je s 18,02 % u svježem uzorku na 0,10 % u suhom uzorku, što je vjerojatno posljedica njegove visoke isparljivosti.

### 5.3.3. Isparljivi spojevi ekstrahirani pomoću SC-CO<sub>2</sub>

GC-MS analizom CO<sub>2</sub> ekstrakta liofiliziranog uzorka *C. bursa* utvrđena je dominantnost (*E*)-fitola u udjelu od 42,30 % te strukturno sličnog neofitadiena u udjelu od 3,20 %. Drugi dominantni alifatski spojevi bili su palmitinska kiselina u udjelu od 17,51 %, heptadekan (7,20 %), heksadekan-1-ol (3,10 %) i oleinska kiselina (3,02 %). Sastav CO<sub>2</sub> ekstrakta bio je vrlo sličan hidrodestilatu suhog uzorka (**Tablica 31**; **Tablica 32**). Međutim, utvrđena je prisutnost monoterpena hidroksilaktona loliolida (3,51 %) koji nije bio prisutan u vršnim parama i hidrodestilatu *C. bursa*. Prethodno je pronađen i u etanolnom ekstraktu zelene makroalge *C. divaricatum* (He i sur., 2010), a utvrđena je njegova prisutnost i u CO<sub>2</sub> ekstraktima *F. virsoides* (**Tablica 16**) i *A. rigida* (**Tablica 24**) koje su analizirane tijekom ove doktorske disertacije. Unatoč jednostavnoj strukturi loliolida, istraživanjima su dokazane različite biološke aktivnosti loliloida poput inhibicije klijanja, antirepelentnog djelovanja, imunosupresivnog djelovanja, a isto tako i inhibicije rasta stanica karcinoma nazofarinksa kod ljudi i leukemije kod miševa (He i sur., 2010; Pettit i sur., 1980).

### 5.3.4. Sastav masnih kiselina

Ekstrakt ukupnih lipida dobiven iz liofiliziranog uzorka *C. bursa* analiziran je pomoću GC-FID analize, a rezultati su navedeni u **Tablici 33**. Identificirano je ukupno 11 masnih kiselina pri čemu je palmitinska bila dominantna s postotkom od 27,38 %, zatim slijedi zbroj izomera oleinske kiseline (24,73 %) te arahidska kiselina (14,49 %). Udio zasićenih masnih kiselina bio je veći u odnosu na nezasićene masne kiseline (58,25 %). Mononezasićene masne kiseline činile su 27,16 %, dok su polinezasićene iznosile 14,59 % među kojima su ω-6 masne kiseline bile više zastupljene (12,25 %) u odnosu na ω-3 (2,34 %). Općenito, za zelene makroalge karakteristična je dominantnost nezasićenih masnih kiselina u odnosu na zasićene (Yazici i

sur., 2007), što nije pronađeno u ovom istraživanju. Razlike u sadržaju masnih kiselina ovise o različitim čimbenicima poput uvjeta okoliša u kojima alge rastu te stadiju sazrijevanja (Dembitsky i sur., 2003). Nadalje, palmitinska je bila dominantna zasićena masna kiselina u *C. bursa* analiziranoj tijekom ove doktorske disertacije, što je u skladu s prethodnim istraživanjima na različitim vrstama algi roda *Codium* (Aliya i Shameel, 1993; Xu i sur., 1998). Tijekom ovog istraživanja, oleinska kiselina bila je dominantna mononezasićena masna kiselina u udjelu od 24,73 %, dok je *cis*-linolna kiselina bila dominantna PUFA s udjelom od 7,42 %. Goecke i sur. (2010) i Banaimoon (1992) isto su potvrdili da je linolna kiselina bila glavna PUFA u vrstama roda *Codium*. Iako se na temelju prethodnih istraživanja (Schmid i sur., 2014; Goecke i sur., 2010; Xu i sur., 1998) smatralo da je heksadekatrienska kiselina kemotaksonomski marker vrsta roda *Codium*, tijekom istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije nije potvrđena njena prisutnost u algi *C. bursa*. Također, Yazici i sur. (2007) nisu ju potvrdili ni u *C. fragile*. U obzir se treba uzeti da profil masnih kiselina može varirati između vrsta istog roda, ali i unutar iste vrste koja je prikupljena s različitih lokacija tijekom istog godišnjeg doba (Dembitsky i sur., 2003). Nadalje, Xu i sur. (1998) utvrdili su da postupak sušenja algi može imati utjecaj na sadržaj PUFAs budući da su one izrazito osjetljive na oksidacijske procese.

### 5.3.5. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SPE

Za analizu pigmenata makroalge *C. bursa* korištene su frakcije F3 i F4 dobivene pomoću SPE. Tijekom HPLC analize frakcije F3 utvrđena je prisutnost fukoksantina u koncentraciji do 1,91 mg/g suhe frakcije te astaksantina u koncentraciji 3,29 mg/g suhe frakcije. Međutim, ta dva pigmenta nisu detektirana u frakciji F4, nego je jedino klorofil *b* bio prisutan u koncentraciji od 7,21 mg/g suhe frakcije (**Tablica 34**). Za sifonalne makroalge, kojima pripada i *C. bursa*, karakteristična je prisutnost  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotena što je ranije utvrđeno od strane Anderson i sur. (1985), no oni nisu detektirani u frakcijama dobivenim pomoću SPE tijekom ovog istraživanja.  $\beta$ -karoten nije detektiran ni u *C. fragile* u istraživanju Benson i sur. (1981) što može upućivati na različite puteve biosinteze karotenoida u algama, s obzirom da vrste roda *Codium* imaju sposobnost sinteze ksantofila koji sadrže  $\beta$ -jononski prsten, poput sifonaksantina i sifoneina. S druge strane, dostupna literaturna istraživanja (Hegazi i sur., 2002; Mansour i sur., 2018) ukazuju da je klorofil *b* prisutan u većim koncentracijama od klorofila *a* u makroalgama roda *Codium*, što je potvrđeno rezultatima HPLC analize tijekom ovog istraživanja. Anderson i sur. (1983) utvrdili su da veće koncentracije klorofila *b* omogućuju apsorpciju svjetlosti u zelenom području te da zelene alge imaju veće koncentracije navedenog pigmenta od nekih kopnenih biljaka. Mansour i sur. (2018) uočili su da se koncentracija klorofila *a* nije promijenila kod *Codium* vrsta prikupljenih s dva različita područja, dok je koncentracija klorofila *b* i karotenoida

bila drugačija. Zaključili su da salinitet i temperatura mora imaju značajnu ulogu u sintezi različitih komponenti u algama.

Spektrofotometrijskim određivanjem ukupnih koncentracija pigmenata utvrđena je dominantnost klorofila *b* u odnosu na klorofil *a* u obje frakcije, F3 i F4 (**Tablica 36**). U frakciji F4 pronađene su veće koncentracije klorofila u odnosu na F3, a iznosile su za klorofil *a* 1,25 mg/g suhe frakcije te za klorofil *b* 2,66 mg/g suhe frakcije. Koncentracija ukupnih karotenoida iznosila je 0,56 mg/g suhe frakcije za F3 i 0,39 mg/g suhe frakcije za F4. Veće koncentracije klorofila *b* mogu se objasniti činjenicom da makroalge roda *Codium* više sintetiziraju navedeni pigment budući da žive u dubokim i zamućenim vodama što je potvrđeno istraživanjem od strane Marques i sur. (2021).

### 5.3.6. Sastav pigmenata ekstrahiranih pomoću SC-CO<sub>2</sub>

U CO<sub>2</sub> ekstraktu liofiliziranog uzorka *C. bursa* utvrđena je prisutnost ksantofila koji su pronađeni i u SPE frakcijama. Astaksantin je bio prisutan u koncentraciji od 1,18 mg/g suhog ekstrakta, dok je fukoksantin bio prisutan u nižoj koncentraciji (0,34 mg/g suhog ekstrakta) (**Tablica 35**). Klorofil *b* nije detektiran zbog selektivnosti CO<sub>2</sub> prema karotenoidima, što je potvrđeno i za preostale dvije makroalge korištene u ovoj doktorskoj disertaciji. Iako je spektrofotometrijskom metodom utvrđena vrlo niska koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* (**Tablica 37**), rezultati se ne mogu smatrati reprezentativnim budući da se tijekom same analize mogu dogoditi različite interferencije (Connan, 2015). Ranijim istraživanjem (Ritchie, 2008) utvrđeno je da se korištenjem otapala acetona dobiju najbolji apsorpcijski pikovi klorofila, ali postoji mogućnost nastanka njihovih derivata koji onda utječu na rezultat. Zbog toga, u navedenom istraživanju metanol i etanol pokazali su se kao učinkovita otapala koja sprječavaju nastanak derivata klorofila poput feofitina i alomerizacijskih produkata, a koji mogu ometati očitavanje stvarnih koncentracija prisutnih klorofila. Tijekom spektrofotometrijskih analiza u ovoj disertaciji korišten je metanol kao otapalo za određivanje ukupnih klorofila i karotenoida. Iako su Ritchie i sur. (2008) utvrdili nastajanje pojedinih derivata klorofila i tijekom korištenja metanola kao otapala, to je bilo u znatno manjoj mjeri nego u slučaju korištenja acetona. Prema rezultatima dobivenim za *C. fragile* od strane Lee i sur. (2008), korištenjem metanola dobivene su najveće koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida u usporedbi s acetonom i etanolom, ali su isto tako dobivene i veće koncentracije derivata klorofila, poput feofitina *a* i feofitina *b*. Postoje suprotna istraživanja gdje pojedini znanstvenici tvrde kako su karotenoidi najviše zastupljeni u zelenim makroalgama, u odnosu na crvene i smeđe makroalge (Yokoya i sur., 2007), dok drugi tvrde da je najveći udio karotenoida u smeđim makroalgama, a najniži u zelenim (Kumar i sur., 2009). Tijekom ove doktorske disertacije, spektrofotometrijskom metodom utvrđeno je da je smeđa makroalga *F. virsoides* sadržavala najveći udio karotenoida

(6,74 mg/g suhog ekstrakta; **Tablica 21**), zatim crvena makroalga *A. rigida* s koncentracijom od 2,22 mg/g suhog ekstrakta (**Tablica 29**) te na kraju zelena makroalga *C. bursa* (1,43 mg/g suhog ekstrakta; **Tablica 37**). Ovi su rezultati u skladu s onima dobivenim od strane Kumar i sur. (2009), dok su Collins i sur. (2016) pretpostavili da do većeg udjela karotenoida u zelenim makroalgama dolazi zbog prisutnosti sifonaksantina koji je karakterističan za alge roda *Codium* i čini oko 60 % od ukupnih karotenoida (Benson i sur., 1981).

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih na **smeđoj makroalgi *Fucus virsoides*** u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Tijekom HS-SPME dobiveno je da je pentadekan bio najzastupljeniji spoj u svježim i suhim uzorcima, dok se kemijski profil hidrodestilata svježih i suhих uzoraka *F. virsoides* značajno razlikovao. U svježem uzorku utvrđena je dominantnost pentadec-1-ena, a u suhom uzorku tridekanala. Za razliku od hidrodestilata u kojem su masne kiseline pronađene u manjim udjelima, one su bile glavni spojevi u CO<sub>2</sub> ekstraktu, a najveći udio zauzimala je oleinska kiselina.

2. GC-FID analizom ekstrakta ukupnih lipida liofiliziranog uzorka *F. virsoides* utvrđeno je da je dominantna masna kiselina bila oleinska kiselina. Također, utvrđene su vrlo važne ω-3 i ω-6 masne kiseline poput eikosapentaenske i arahidonske masne kiseline. ω-6 masne kiseline bile su više zastupljene od ω-3 masnih kiselina čime *F. virsoides* ima potencijal za primjenu u preparatima za poboljšanje ljudskog zdravlja.

3. HPLC analizom frakcija dobivenih pomoću SPE iz liofiliziranog uzorka *F. virsoides* utvrđena je dominantnost fukoksantina u frakciji F3. S druge strane, prisutnost fukoksantina utvrđena je i u CO<sub>2</sub> ekstraktu liofiliziranog uzorka *F. virsoides*, no bio je prisutan u nižoj koncentraciji.

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih na **crvenoj makroalgi *Amphiroa rigida*** u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Heptadekan bio je dominantan spoj vršnih para svježeg i suhog uzorka *A. rigida*, dok su u hidrodestilatu utvrđene znatno manje količine. U hidrodestilatu svježeg i suhog uzorka bio je najzastupljeniji (*E*)-fitol, no u znatno većem udjelu u svježem uzorku. Hidrodestilat suhog uzorka pokazao je porast udjela razgradnog produkta fitona, što upućuje na degradaciju fitola tijekom postupka sušenja. U CO<sub>2</sub> ekstraktu liofiliziranog uzorka *A. rigida* utvrđena je dominantnost palmitinske kiseline. (*E*)-Fitol bio je prisutan u nižem udjelu u usporedbi s hidrodestilatom, a to može upućivati na smanjenu degradaciju klorofila a tijekom ESCO<sub>2</sub>.

2. GC-FID analizom ekstrakta ukupnih lipida liofiliziranog uzorka *A. rigida* utvrđeno je da je palmitinska kiselina bila dominantna. Zbog visokog udjela eikosapentaenske kiseline, ova se alga može smatrati izvorom te esencijalne ω-3 masne kiseline.

3. HPLC analizom frakcija dobivenih pomoću SPE iz liofiliziranog uzorka *A. rigida* utvrđena je prisutnost luteina i fukoksantina u frakciji F3 te klorofila a i β-karotena u frakciji F4. U CO<sub>2</sub> ekstraktu liofiliziranog uzorka *A. rigida* primijećeni su jedino karotenoidi; fukoksantin, lutein te β-karoten.

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih na **zelenoj makroalgi *Codium bursa*** u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. GC-MS analizom vršnih para svježeg uzorka *C. bursa* utvrđeno je da je DMS bio dominantan spoj, dok je u suhom uzorku njegov udio značajno smanjen, a uslijed toga povećao se udio heptadekana. Hidrodestilat svježeg i suhog uzorka značajno se razlikovao, pri čemu je heptadekan bio najzastupljeniji u svježem uzorku, dok je (*E*)-fitol bio dominantan u suhom uzorku zbog degradacijskih promjena tijekom postupka sušenja. (*E*)-Fitol bio je dominantan i u CO<sub>2</sub> ekstraktu liofiliziranog uzorka *C.bursa*. Sastav CO<sub>2</sub> ekstrakta bio je vrlo sličan hidrodestilatu suhog uzorka, ali je u ekstraktu utvrđena prisutnost loliolida koji nije pronađen ni u vršnim parama ni u hidrodestilatu.

2. GC-FID analizom ekstrakta ukupnih lipida liofiliziranog uzorka *C. bursa* utvrđena je dominantnost palmitinske kiseline. Dok je oleinska bila dominantna mononezasićena masna kiselina, *cis*-linolna bila je dominantna PUFA.

3. HPLC analizom frakcija dobivenih pomoću SPE iz liofiliziranog uzorka *C. bursa* utvrđena je prisutnost fukoksantina te astaksantina u frakciji F3. Klorofil *b* bio je prisutan u frakciji F4. Nadalje, rezultati HPLC analize CO<sub>2</sub> ekstrakta dobivenog iz liofiliziranog uzorka *C. bursa* utvrdili su prisutnost ksantofila, fukoksantina i astaksantina.

Sukladno svim dobivenim rezultatima za sve 3 alge može se zaključiti da se makroalge koje pripadaju različitim skupinama značajno razlikuju u dobivenim kemijskim profilima ispitivanih spojeva. Međutim, mogu se izvući pojedini zajednički zaključci koji se mogu primijeniti za sve 3 vrste makroalgi koje su ispitane tijekom ovog istraživanja:

1. Primjenom HS-SPME, HD i ESCO<sub>2</sub> bilo je moguće dobiti ukupni kemijski profil isparljivih spojeva za sve 3 vrste makroalgi. Također, utvrđeni su degradacijski procesi masnih kiselina i pigmenata tijekom sušenja uzoraka na zraku iz kojih su dobiveni različiti isparljivi spojevi.

2. Prema rezultatima dobivenim za profile masnih kiselina, može se zaključiti da se makroalge korištene u ovom istraživanju mogu smatrati izvorima ω-3 i ω-6 masnih kiselina.

3. Upotrebom ESCO<sub>2</sub> utvrđena je njezina selektivnost prema karotenoidima s obzirom da klorofili nisu detektirani ni u jednom ekstraktu makroalgi. Također, zbog primijenjene niže temperature ekstrakcije (40 °C) i visokog tlaka (300 bar), degradacija pigmenata bila je smanjena.



## **7. LITERATURA**

- Aburai N, Ohkubo S, Miyashita H, Abe K: Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research* 2:237–243, 2013.
- Agatonovic-Kustrin S, Morton DW: Cosmeceuticals derived from bioactive substances found in marine algae. *Journal of Oceanography and Marine Research* 1:106-117, 2013.
- Ahn GN, Kim KN, Cha SH, Song CB, Lee J, Heo MS, Yeo IK, Lee NH, Jee YH, Kim JS, Heu MS, Jeon YJ: Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated DNA damage. *European Food Research and Technology* 226:71-79, 2007.
- Akakabe Y, Matsui K, Kajiwara T: 2,4-Decadienals are produced via (R)-11-HPITE from arachidonic acid in marine green alga *Ulva conglobata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11:3607-3609, 2003.
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis sativa* L.) ulja superkričnim CO<sub>2</sub> iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Al-Bader T, Byrne A, Gillbro J, Mitarotonda A, Metois A, Vial F, Rawlings AV, Laloef A: Effect of cosmetic ingredients as anticellulite agents: synergistic action of actives with *in vitro* and *in vivo* efficacy. *Journal of Cosmetic Dermatology* 11:17-26, 2012.
- Aliya R, Shameel M: Phycochemical examination of three species of *Codium* (Bryopsidophyceae). *Botanica Marina* 36:371–376, 1993.
- Anderson, JM: Chlorophyll-protein complexes of a *Codium* species, including a light-harvesting siphonaxanthin-chlorophyll a b-protein complex, an evolutionary relic of some Chlorophyta. *Biochimica et Biophysica Acta* 724:370-380, 1983.
- Anderson, JM: Chlorophyll-protein complexes of a marine green alga, *Codium* species (Siphonales). *Biochimica et Biophysica Acta* 806:145-153, 1985.
- Ariede MB, Candido TM, Jacome ALM, Velasco MV, de Carvalho JC, Baby AR: Cosmetic attributes of algae – A review. *Algal Research* 25:483-487, 2017.
- Arterburn LM, Oken HA, Hoffman JP, Bailey-Hall E, Chung G, Rom D, Hamersley J, McCarthy D: Bioequivalence of docosahexaenoic acid from different algal oils in capsules and in a DHA-fortified food. *Lipids* 42:1011–1024, 2007.

- Azarbad MH, Jelen H: Determination of hexanal-an indicator of lipid oxidation by static headspace gas chromatography (SHS-GC) in fat-rich food matrices. *Food Analytical Methods* 8:1727–1733, 2015.
- Banaimoon SA: Fatty acids in marine macroalgae from Southern Yemen (Hadramout) including occurrence of eicosatetraenoic (20:4) and eicosapentaenoic (20:5) acids. *Botanica Marina* 35:165–168, 1992.
- Barbosa M, Lopes G, Valentao P, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Pereira DM, Andrade PB: Edible seaweeds phlorotannins in allergy: A natural multi-target approach. *Food Chemistry* 265:233-241, 2018.
- Barofsky A, Pohnert G: Biosynthesis of polyunsaturated short chain aldehydes in the diatom *Thalassiosira rotula*. *Organic Letters* 9:1017–1020, 2007.
- Beauchene D, Grua-Priol J, Lamer T, Demaimay M, Quemeneur F: Concentration by pervaporation of aroma compounds from *Fucus serratus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75:451-458, 2000.
- Bedoux G, Hardouin K, Burlot AS, Bourgoignon N: Bioactive components from seaweeds: cosmetic applications and future development. U *Advances in Botanical Research*, str. 345-378. Elsevier, Amsterdam, 2014.
- Benson EE, Cobb AH: The separation, identification and quantitative determination of photopigments from the Siphonaceous marine alga *Codium fragile*. *New Phytologist* 88:627-632, 1981.
- Berneira L, da Silva C, Poletti T, Ritter M, dos Santos M, Colepicolo P, de Pereira CMP: Evaluation of the volatile composition and fatty acid profile of seven Antarctic macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 32:3319–3329, 2020.
- Bianchi TS, Kautsky L, Argyrou M: Dominant chlorophylls and carotenoids in macroalgae of the Baltic Sea (Baltic proper): Their use as potential biomarkers. *Sarsia North Atlantic Marine Science* 82:55–62, 1997.
- Bjørnland T, Aguilar-Martinez M: Carotenoids in red algae. *Phytochemistry* 15:291-296, 1976.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR: Marine natural products. *Natural Product Reports* 20:1–48, 2003.
- Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N: Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiology* 135:1993–2011, 2004.

- Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Rodenas S, Sanchez-Muniz F: Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food* 12:236–258, 2009.
- Boonprab K, Matsui K, Akakabe Y, Yoshida M, Yotsukura N, Chirapart A, Kajiwara T: Formation of aldehyde flavour (*n*-hexanal, 3*Z*-nonenal and 2*E*-nonenal) in the brown alga, *Laminaria angustata*. *Journal of Applied Phycology* 18:1573-1576, 2006.
- Boonprab K, Matsu K, Akakabe Y, Yotsukurab N, Kajiwara T: Hydroperoxy-arachidonic acid mediated *n*-hexanal and (*Z*)-3- and (*E*)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata*. *Phytochemistry* 63:669–678, 2003.
- Boonprab K, Matsui K, Yoshida M, Akakabe Y, Chirapart A, Kajiwara T: C6-Aldehyde formation by fatty acid hydroperoxide lyase in the brown alga *Laminaria angustata*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 58:207–214, 2014.
- Bravo-Linares CM, Mudge SM, Loyola-Sepulveda RH: Production of volatile organic compounds (VOCs) by temperate macroalgae. The use of Solid Phase Microextraction (SPME) coupled to GC-MS as method of analysis. *Journal of the Chilean Chemical Society* 55:227–232, 2010.
- Bueno AM, Marcílio Candido T, Morocho-Jácome AL, Rolim Baby A, Robles Velasco MV, de Carvalho JC: Cosmetic attributes of algae—A review. *Algal Research* 25:483–487, 2017.
- Castro-Puyana M, Perez-Sanchez A, Valdes A, Ibrahim OHM, Suarez-Alvarez S, Ferragut JA, Micol V, Cifuentes A, Ibanez E, Garcia-Canas V: Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International* 99:1048–1055, 2017.
- Catarino MD, Silva AMS, Cardoso SM: Phytochemical Constituents and Biological Activities of *Fucus* spp. *Marine Drugs* 16:249, 2018.
- Celikler S, Vatan O, Yildiz G, Bilaloglu R: Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 47: 796–801, 2009.
- Ceron MC, Garcia-Malea MC, Rivas J, Acien FG, Fernandez JM, Del Rio E, Guerrero MG, Molina E: Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:1112–1119, 2007.

- Chan YY, Kim KH, Cheah SH: Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* 137:1183-1188, 2011.
- Chan JCC, Cheung PCK, Ang P: Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:3056–3059, 1997.
- Chang DW, Hsieh ML, Chen YM, Lin TF, Chang JS: Kinetics of cell lysis for *Microcystis aeruginosa* and *Nitzschia palea* in the exposure to  $\beta$ -cyclocitral. *Journal of Hazardous Materials* 185:1214–1220, 2011.
- Chee CP, Djordjevic D, Faraji H, Decker EA, Hollender R, McClements DJ, Peterson DG, Roberts RF, Coupland JN: Sensory properties of vanilla and strawberry flavored ice cream supplemented with omega-3 fatty acids. *Milchwissenschaft* 62:66-69, 2007.
- Cheung PCK: Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry* 65:399–403, 1999.
- Chiheb I, Riadi H, Martinez-Lopez J, Dominguez Seglar JF, Gomez Vidal JA, Bouziane H, Kadiri M: Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology* 8:1258–1262, 2009.
- Cho ML, Lee BY, You SG: Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their *in vitro* anticancer activity. *Molecules* 16:291-297, 2011.
- Cho S, Yang H, Jeon YJ, Lee CJ, Jin YH, Baek NI, Kim D, Kang SM, Yoon M, Yong H, Shimizu M, Han D: Phlorotannins of the edible brown seaweed *Ecklonia cava* Kjellman induce sleep via positive allosteric modulation of gamma-aminobutyric acid type A-benzodiazepine receptor: A novel neurological activity of seaweed polyphenols. *Food Chemistry* 132:1133-1142, 2012.
- Choi DS, Lee IK: On surface structures of *Amphiroa* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Korean Journal of Phycology* 3:111–117, 1988.
- Chung TW, Choi HJ, Lee JY, Jeong HS, Kim CH, Joo M, Choi JY, Han CW, Kim SY, Choi JS, Ha KT: Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 439:580–585, 2013.
- Circuncisão AR, Catarino MD, Cardoso SM, Silva AMS: Minerals from macroalgae origin: health benefits and risks for consumers. *Marine Drugs* 16:400, 2018.

- Clark RCJr, Blumer M: Distribution of n-paraffins in marine organisms and sediment. *Limnology and Oceanography* 12:79–87, 1967.
- Cofrades S, Benedi J, Garcimartin A, Sanchez-Muniz FJ, Jimenez-Colmenero F: A comprehensive approach to formulation of seaweed-enriched meat products: From technological development to assessment of healthy properties. *Food Research International* 99:1084-1904, 2016.
- Cofrades S, Lopez-Lopez I, Jimenez-Colmenero F: Applications of Seaweed in Meat-Based Functional Foods. U *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, str. 491-499. John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, SAD, 2012.
- Collén J, Davison I: Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 35:62-69, 1999.
- Collins KG, Fitzgerald GF, Stanton C; Ross RP: Looking beyond the terrestrial: The potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. *Marine Drugs* 14:60, 2016.
- Colombo ML, Risè P, Giavarini F, De Angelis L, Galli C, Bolis CL: Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. *Plant Foods for Human Nutrition* 61:67-72, 2006.
- Conde FR, Churio MS, Previtali CM: The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56:139-144, 2000.
- Connan, S: Spectrophotometric assays of major compounds extracted from algae. *Methods in Molecular Biology* 1308:75–101, 2015.
- Cook AH, Elvidge JA, Heilbron I: Fertilization, including chemotactic phenomena in the Fucaceae. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 135:293-301, 1948.
- Cotas J, Leandro A, Pacheco D, Gonçalves AMM, Pereira L: A Comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). *Life* 10:19, 2020.
- Crampon C, Boutin O, Badens E: Supercritical carbon dioxide extraction of molecules of interest from microalgae and seaweeds. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 50:8941–8953, 2011.

- Cruz S, Calado R, Serôdio J, Jesus B, Cartaxana P: Pigment profile in the photosynthetic sea slug *Elysia viridis* (Montagu, 1804). *Journal of Molluscan Studies* 80:475-481, 2014.
- Harvey D: *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2000.
- Da Costa E, Melo T, Moreira ASP, Alves E, Domingues P, Calado R, Abreu MH, Domingues, MR: Decoding bioactive polar lipid profile of the macroalgae *Codium tomentosum* from a sustainable IMTA system using a lipidomic approach. *Algal Research* 12:388–397, 2015.
- Dasgupta CN: Algae as a source of phycocyanin and other industrially important pigments. U: *Algae Biorefinery: An Integrated Approach*, str. 253-276. Springer, Cham, Švicarska, 2015.
- Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G: Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry* 103:891–899, 2007.
- De Souza NJ, Nes WR: The presence of phytol in brown and blue-green algae and its relationship to evolution. *Phytochemistry* 8:819–822, 1969.
- del Pilar Sanchez Camargo A, Ibanez E, Cifuentes A, Herrero, M: Bioactives obtained from plants, seaweeds, microalgae and food by-products using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry* 76:1–24, 2017.
- Dembitsky VM, Srebnik M: Use of serially coupled capillary columns with different polarity of stationary phases for the separation of the natural complex volatile mixture of the marine red alga *Corallina elongata*. *Biochemistry (Moscow)* 67:1068–1074, 2002.
- Dembitsky VM, Rezankova H, Rezanka T, Hanus LO: Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus *Codium*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:1125–1145, 2003.
- Dembitsky VM, Rozentsvet OA, Pechenkina EE: Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry* 29:3417–3421, 1990.
- De-Paula JC, Bueno LB, Cavalcanti DN, Yoneshigue-Valentin Y, Teixeira VL: Diterpenes from the brown alga *Dictyota crenulata*. *Molecules* 13:1253–1262, 2008.
- Dureja H, Kaushik D, Gupta M, Kumar V, Lather V: Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian Journal of Pharmacology* 37:155-159, 2005.
- Economou-Amilli A, Bitis I, Paschou M: Morphological Variability in *Amphiroa*, *Corallina* and *Jania* (Rhodophyta — Corallinaceae) from Greece. *Botanica Marina* 33:261-271, 1990.

- Edirisinghe E, Abeysinghe R: Fatty Acid Composition of Several Seaweeds of Sri Lanka. U *International Research Symposium Rajarata*, str. 214-221. University of Sri Lanka, 2015.
- Erakin S, Güven KC: The volatile petroleum hydrocarbons in marine algae around Turkish Coasts. *Acta Pharmaceutica Scientia* 50: 167–182, 2008.
- EZ, Komisija Europskih zajednica: Uredba KOMISIJE (EZ) br. 796/2002, 2002.
- Fabrowska J, Ibanez E, Leska B, Herrero M: Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae. *Algal Research* 19:237–245, 2016.
- Faulkner DJ: Marine Natural Products. *Natural Product Reports* 18:1–49, 2001.
- Ferreres F, Lopes G, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Sousa C, Mouga T, Valentao P: Phlorotannin extracts from Fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MS: approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Marine Drugs* 10:2766-2781, 2012.
- Ferreri C, Chatgialloglu C: Geometrical trans lipid isomers: a new target for lipidomics. *ChemBioChem* 6:1722–1734, 2005.
- Figuerola FL, Escassi L, Perez-Rodriguez E, Korbee N, Giles AD, Johnsen G: Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 69:21-30, 2003.
- Fleury BG, Figueiredo L, Marconi MI, Teixeira VL, Ferreira ABB, Pinto AC: Fatty acids as chemotaxonomic markers of marine macrophytes from Rio de Janeiro State, Brazil. *Natural Product Communications* 6:667–672, 2011.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497–509, 1957.
- Foo SC, Yusoff FM, Ismail M, Basri M, Yau SK, Khong NMH, Chan KW, Ebrahimi M: Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *Journal of Biotechnology* 241:175–183, 2017.
- Fors S: Sensory Properties of Volatile Maillard Reaction Products and Related Compounds. U: *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*, str. 185–286. Washington DC, SAD, 1983.
- Francisco J, Horta A, Pedrosa R, Afonso C, Cardoso C, Bandarra NM, Gil MM: Bioaccessibility of antioxidants and fatty acids from *Fucus spiralis*. *Foods* 9:440, 2020.



- Frikha F, Kammoun M, Hammami N, Mchirgui RA, Belbahri L, Gargouri Y, Miled N, Ben-Rebah F: Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas* 37:113–124, 2011.
- Fujimura T, Tsukahara K, Moriwaki S, Kitahara T, Sano T, Takema Y: Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. *Journal of Cosmetic Science* 53:1-9, 2001.
- Galloway AWE, Britton-Simmons KH, Duggins DO, Gabrielson PW, Brett MT: Fatty acid signatures differentiate marine macrophytes at ordinal and family ranks. *Journal of Phycology* 48:956–965, 2012.
- Gamlieli-Bonshtein I, Korin E, Cohen S: Selective separation of cis trans geometrical isomers of  $\beta$ -carotene via CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction. *Biotechnology and Bioengineering* 80:169 – 174, 2002.
- Ganesan A, Tiwari U, Rajauria G: Seaweed nutraceuticals and their role in disease prevention. *Food Science and Human Wellness* 8:252–263, 2019.
- Garbary DJ, Johansen HW: Morphogenesis and Evolution in the *Amphiroideae* (*Rhodophyta*, *Corallinaceae*). *British Phycological Journal* 22:1–10, 1987.
- Geertz-Hansen O, Enriquez S, Duarte CM, Agusti S, Vaque D, Vidondo B: Functional implications of the form of *Codium bursa*, a balloon-like Mediterranean macroalga. *Marine Ecology Progress Series* 108:153–160, 1994.
- Global Biodiversity Information Facility: *Free and open access to biodiversity data. Species search*. Danska, 2021. <https://www.gbif.org/> [19.07.2021.]
- Goecke F, Hernandez V, Bittner M, Gonzalez M, Becerra J, Silva M: Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Revista de biologia marina y oceanografia* 45:325–330, 2010.
- Gonçalves AMM, Marques JC, Gonçalves F: Fatty acids profiles of aquatic organisms: Revealing the impacts of environmental and anthropogenic stressors. U *Fatty Acids*, str. 89-118. IntechOpen, London, 2017.
- Gopu M, Selvam K: Polysaccharides from marine red algae *Amphiroa rigida* and their biomedical potential: An *in-vitro* study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 29:101769, 2020.

- Gosch BJ, Magnusson M, Paul NA, De Nys R: Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy* 4:919-930, 2012.
- Graeve M, Kattner G, Wiencke C, Karsten U: Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: Indicator of phylogenetic and trophic relationships. *Marine Ecology Progress Series* 231:67–74, 2002.
- Grozdanic N, Djuricic I, Kosanic M, Zdunic G, Savikin K, Etahiri S, Assobhei O, Benba J, Petovic S, Matic IZ, Stanojkovic TP: *Fucus spiralis* extract and fractions: Anticancer and pharmacological potentials. *Journal of Balkan Union of Oncology* 25:1219–1229, 2020.
- Grozdanic N, Zdunic G, Šavikin K, Đuričić I, Kosanić M, Mačić V, Matic IZ, Stanojković TP: Seasonal variation in biopharmaceutical activity and fatty acid content of endemic *Fucus virsoides* algae from Adriatic Sea. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research* 76:833–844, 2019.
- Gu SQ, Wang XC, Tao NP, Wu N: Characterization of volatile compounds in different edible parts of steamed Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Research International* 54:81–92, 2013.
- Guarda A, Rosell CM, Benedito C, Gaotto MJ: Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. *Food Hydrocolloids* 18:241-247, 2004.
- Guiry MD, Guiry GM: *AlgaeBase. World-wide electronic publication*. National University of Ireland, Galway, 2021. <http://www.algaebase.org> [23.7.2021.]
- Güven K, Sezik E, Kaleağasioğlu F, Erduğan H, Coban B, Karakaş E: Volatile oils from marine macroalgae. U *Handbook of Natural Products - Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, str. 2883-2912. Springer, New York, 2013.
- Han J, Chan HWS, Calvin M: Biosynthesis of alkanes in *Nostoc muscorum*. *Journal of the American Chemical Society* 91:5156–5159, 1969.
- Hanson CE, Hyndes GA, Wang SF: Differentiation of benthic marine primary producers using stable isotopes and fatty acids: Implications to food web studies. *Aquatic Botany* 93:114-122, 2010.
- Haryatfrehni R, Dewi SC, Meilianda A, Rahmawati S, Ratna Sari IZ: Preliminary study the potency of macroalgae in Yogyakarta: extraction and analysis of algal pigments from common Gunungkidul seaweeds. *Procedia Chemistry* 14:373-380, 2015.

- Hattab M, Culioli G, Piovetti L, Chitour SE, Valls R: Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from brown alga *Dictyopterus membranacea*. *Journal of Chromatography A* 1143:1–7, 2007.
- Haugan JA, Liaaen-Jensen S: Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 22:31–41, 1994.
- Haugan JA, Liaaen-Jensen S: Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry* 28:2797–2798, 1989.
- He Z, Zhang A, Ding L, Lei X, Sun J, Zhan J: Chemical composition of the green alga *Codium divaricatum* Holmes. *Fitoterapia* 81:1125–1128, 2010.
- Heffernan N, Smyth T, Fitzgerald R, Vila-Soler A, Mendiola J, Ibáñez E, Brunton N: Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 37:221-228, 2016.
- Hegazi MMI: Separation, identification and quantification of photosynthetic pigments from three Red Sea seaweeds using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Egyptian Journal of Biology* 4:1-6, 2002.
- Heiba HI: Fatty acid composition of eleven algae from coastal zones of Qatar. *Plant Foods for Human Nutrition* 39:401-405, 1989.
- Henriques M, Silva A, Rocha J: Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: A simple and reproducible method. U *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, str. 586-593. Formatex, Badajoz, 2007.
- Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P: Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules* 25:3152, 2020.
- Heo SJ, Jeon YJ: Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 95:101-107, 2009.
- Heo SJ, Ko SC, Cha SH, Kang DH, Park HS, Choi YU, Kim D, Jung WK, Jeon YJ: Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in Vitro* 23:1123-1130, 2009.

- Heo SJ, Ko SC, Kang SM, Kang HS, Kim JP, Kim SH, Lee KW, Cho MG, Jeon YJ: Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage. *European Food Research and Technology* 228:145–151, 2008.
- Herbreteau F, Coiffard LJM, Derrien A, De Roeck-Holtzhauer Y: The fatty acid composition of five species of macroalgae. *Botanica Marina* 40:25–28, 1997.
- Hidalgo FJ, Zamora R: Formation of phenylacetic acid and benzaldehyde by degradation of phenylalanine in the presence of lipid hydroperoxides: New routes in the amino acid degradation pathways initiated by lipid oxidation products. *Food Chemistry* 2:100037, 2019.
- Holdt SL, Kraan S: Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23:543–597, 2011.
- Hombeck M, Boland W: Biosynthesis of the algal pheromone fucoserratene by the fresh-water diatom *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae). *Tetrahedron* 54:11033–11042, 1998.
- Hörtensteiner S: Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:330–347, 1999.
- Ikawa M, Sasner JJ, Haney JF: Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia* 443:19–22, 2001.
- Imbs TI, Ermakova SP, Fedoreyev SA, Anastyuk SD, Zvyagintseva TN: Isolation of fucoxanthin and highly unsaturated monogalactosyldiacylglycerol from brown alga *Fucus evanescens* C. Agardh and *in vitro* investigation of their antitumor activity. *Marine Biotechnology* 15:606–612, 2013.
- Ishida BK, Bartley GE: Carotenoids: chemistry, sources, and physiology. U *Encyclopedia of human nutrition*, str. 330–338. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, 2005.
- Iwai K: Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *Plant foods for human nutrition* 63:163–169, 2008.
- Jayasree NB, Aneesh TP, Prabhakar V, Anandan R: GC-MS, HPLC and AAS analysis of fatty acids, amino acids and minerals in red algae *Amphiroa anceps*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4:187–190, 2012.

- Jeffrey S: Pigment composition of siphonales algae in the brain coral favia. *Biological Bulletin* 135:141–148, 1968.
- Jensen CL, Voigt RG, Prager TC, Zou YLL, Fraley JK, Rozelle JC, Turcich MR, Llorente AM, Anderson RE, Heird WC: Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *The American journal of clinical nutrition* 82:125–132, 2005.
- Jerković I, Kranjac M, Marijanović Z, Šarkanj B, Cikoš A-M, Aladić K, Pedisić S, Jokić S: Chemical diversity of *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh headspace compounds, volatiles, fatty acids and insight into its antifungal activity. *Molecules* 24:842, 2019.
- Jerković I, Marijanović Z, Roje M, Kuš PM, Jokić S, Čož-Rakovac R: Phytochemical study of the headspace volatile organic compounds of fresh algae and seagrass from the Adriatic Sea (single point collection). *PLoS ONE* 13:e0196462, 2018.
- Jones AL, Harwood JL: Lipid composition of the brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 31:3397–3403, 1992.
- Jüttner F: Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae. *Water Science and Technology* 31:69–78, 1995.
- Kamenarska Z, Ivanova A, Stancheva R, Stoyneva M, Stefanov K, Dimitrova-Konaklieva S, Popov S: Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application. *Botanica marina* 49:47-56, 2006.
- Kamenarska ZG, Dimitrova-Konaklieva S, Nikolova C, Kujumdjiev A, Stefanov KL, Popov S: Volatile components of the freshwater algae *Spirogyra* and *Mougeotia*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 55:495–499, 2000.
- Kanias GD, Skaltsa H, Tsitsa E, Loukis A, Bitis J: Study of the correlation between trace elements, sterols and fatty acids in brown algae from the Saronikos Gulf of Greece. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 344:334–339, 1992.
- Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G, Horzum Z: Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytotherapy research* 21:153–156, 2007.
- Karpinski TM, Adamczak A: Fucoxanthin—an antibacterial carotenoid. *Antioxidants* 8:239, 2019.
- Katayama T: Chemical studies on the volatile constituents of seaweed. *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University* 2:67-76, 1958.

- Kavalappa YP, Rudresh DU, Gopal SS, Shivarudrappa AH, Stephen NM, Rangiah K, Ponesakki G:  $\beta$ -carotene isolated from the marine red alga, *Gracillaria* sp. potently attenuates the growth of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells by modulating multiple molecular pathways. *Journal of Functional Foods* 52:165–176, 2019.
- Khan MN, Cho JY, Lee MC, Kang JY, Park NG, Fujii H, Hong YK: Isolation of two anti-inflammatory and one pro-inflammatory polyunsaturated fatty acids from the brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:6984–6988, 2007.
- Khan SB, Kong CS, Kim JA, Kim SK: Protective effect of *Amphiroa dilatata* on ROS induced oxidative damage and MMP expressions in HT1080 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15:191–198, 2010.
- Khotimchenko SV: Fatty acids of species in the genus *Codium*. *Botanica Marina* 46:56–460, 2003.
- Khotimchenko SV: Fatty acids of brown algae from the Russian Far East. *Phytochemistry* 49:2363–2369, 1998.
- Khotimchenko SV, Vaskovsky VE, Titlyanova TV: Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California. *Botanica Marina* 45:17–22, 2002.
- Kim YC, An RB, Yoon NY, Nam TJ, Choi JS: Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Archives of Pharmacal Research* 28:1376–1380, 2005.
- Kim AD, Lee Y, Kang S-H, Kim GY, Kim HS, Hyun JW: Cytotoxic effect of clerosterol isolated from *Codium fragile* on A2058 human melanoma cells. *Marine Drugs* 11:418–430, 2013.
- Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn G, Yi TH, Jeon YJ: Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology* 649:369–375, 2010.
- Kim M-K, Dubacq J-P, Thomas J-C, Giraud G: Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 43:49–55, 1996.
- Kim S: Morphogenesis in *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta): Taxonomic implications. *The Journal of Phycology* 26:4, 1990.

- Kladi M, Vagias C, Roussis, V: Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry Reviews* 3:337-366, 2004.
- Ko S-C, Lee M, Lee J-H, Lee S-H, Lim Y, Jeon Y-J: Dieckol, a phlorotannin isolated from a brown seaweed, *Ecklonia cava*, inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36:1253-1260, 2013.
- Kong C-S, Kim J-A, Yoon N-Y, Kim S-K: Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Ecklonia cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 47:1653-1658, 2009.
- Kucera H, Saunders GW: Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Botany* 86:1065-1079, 2008.
- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K: Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs* 13:5847-5881, 2015.
- Kumar JIN, Kumar RN, Bora A, Kaur Amb M, Chakraborty S: An evaluation of the pigment composition of eighteen marine macroalgae collected from Okha Coast, Gulf of Kutch, India. *Our Nature* 7:48–55, 2009.
- Kumari P, Bijo AJ, Mantri VA, Reddy CR, Jha B: Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry* 86:44-56, 2013.
- Kundal P, Mude SN: *Amphiroa*, a geniculate coralline alga from neogen-quaternary sediments of Porbandar area, Gujarat. *Journal of the Palaeontological Society of India* 55:71-78, 2010.
- La Barre S, Potin P, Leblanc C, Delage L: The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs* 8:988-1010, 2010.
- Lalegerie F, Gager L, Stiger-Pouvreau V, Connan S: The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. U: *Advances in Botanical Research—Seaweeds around the World: State of Art and Perspectives*, str. 247-287. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2020.

- Lalić LM, Berković K: The influence of algae addition on physicochemical properties of cottage cheese. *Milchwissenschaft* 60:151-154, 2005.
- Le Pape MA, Grua-Priol J, Prost C, Demaimay M: Optimization of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Palmaria palmata* and identification of the volatile components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:550-556, 2004.
- Lee IS, Lee HY, Kim HL, Ko KH, Chang HC, Kim IC: Effect of metal ions on stabilization of *Codium fragile* pigments. *Korean Journal of Food Preservation* 15:352-360, 2008.
- Lee G-H, Suriyaphan O, Cadwallader KR: Aroma components of cooked tail meat of American lobster (*Homarus americanus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4324–4332, 2001.
- Li Y, Lee SH, Le QT, Kim MM, Kim SK: Anti-allergic effects of phlorotannins on histamine release via binding inhibition between IgE and FcεRI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:12073-12080, 2008.
- Li X, Fan X, Han L, Lou Q: Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry*, 59:157-161, 2002.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C: Chlorophylls and carotenoids – Measurement and characterisation by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1:F4.3.1-F4.3.8, 2001.
- Lopez-Perez O, Picon A, Nunez M: Volatile compounds and odour characteristics of seven species of dehydrated edible seaweeds. *Food Research International* 99:1002-1010, 2016.
- Lorenzo JM, Agregán R, Munekata PES, Franco D, Carballo J, Sahin S, Lacombe R, Barba FJ: Proximate Composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Marine Drugs* 15:360, 2017.
- Lu S, Li L: Carotenoid metabolism: Biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 50:778-785, 2008.
- Ly BM, Buu NQ, Nhut ND, Thinh PD, Thanh Van TT: Studies on fucoidan and its production from Vietnamese brown seaweeds. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development* 22:371-380, 2005.
- Lyons DA, Scheibling RE, Van Alstyne KL: Spatial and temporal variation in DMSP content in the invasive seaweed *Codium fragile* ssp. *fragile*: Effects of temperature, light and grazing. *Marine Ecology Progress Series* 417:51-61, 2010.



- Machmudah S, Diono W, Kanda H, Goto M: Supercritical fluids extraction of valuable compounds from algae: future perspectives and challenges. *Engineering Journal* 22:13-30, 2018.
- Macías-Sánchez MD, Mantell C, Rodríguez M, Martínez de la Ossa E, Lubián LM, Montero O: Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll *a* from *Synechococcus* sp. *Journal of Supercritical Fluids* 39:323-329, 2007.
- Maeda H, Fukuda S, Izumi H, Saga N: Anti-oxidant and fucoxanthin contents of brown alga ishimozuku (*Sphaerotrichia divaricata*) from the west coast of Aomori, Japan. *Marine Drugs* 16:255, 2018.
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Miyashita K: Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:7701-7706, 2007.
- Mahadevan K: Seaweeds: A sustainable food source. U: *Seaweed Sustainability*, str. 347-364. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2015.
- Malin G, Kirst GO: Algal production of dimethyl sulfide and its atmospheric role. *Journal of Phycology* 33:889–896, 1997.
- Mansour H, Emam MM, Mostafa NH: Influence of different habitats on the chemical constituents of *Codium tomentosum*. *Egyptian Journal of Botany* 58:275-285, 2018.
- Marques R, Cruz S, Calado R, Lillebo A, Abreu H, Pereira R, Pitarma B, da Silva JM, Cartaxana P: Effects of photoperiod and light spectra on growth and pigment composition of the green macroalga *Codium tomentosum*. *Journal of Applied Phycology* 33:471-480, 2021.
- Matishov GG, Makarov MV: Changes in the pigment composition of *Fucus vesiculosus* L. and *Fucus serratus* L. from the Barents sea during prolonged exposure to the dark. *Doklady Biological Sciences* 397:338-339, 2004.
- Matsuno T: Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Science* 67:771-783, 2001.
- McInnes AG, Walter JA, Wright JLC: Biosynthesis of hydrocarbons by algae: Decarboxylation of stearic acid to n-heptadecane in *Anacystis nidulans* determined by <sup>13</sup>C- and <sup>2</sup>H-labeling and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Lipids* 15:609-615, 1980.

- Mendes RL, Fernandes HL, Coelho JP, Reis EC, Cabral JMS, Novais JM, Palavra AF: Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry* 53:99-103, 1995.
- Menon VV: Seaweed polysaccharides – food applications. U: *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology*, str. 541-556. John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, SAD, 2012.
- Méresse S, Fodil M, Fleury F, Chénais B: Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: promising bioactive compound for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 21:9273, 2020.
- Messyasz B, Michalak I, Łęska B, Schroeder G, Gorka B, Korzeniowska K, Lipok J, Wieczorek P, Roj E, Wilk R, Dobrzynska-Inger A, Gorecki H, Chojnacka K: Valuable natural products from marine and freshwater macroalgae obtained from supercritical fluid extracts. *Journal of Applied Phycology* 30:591-603, 2018.
- Michalak I, Chojnacka K: Chapter 1 – Introduction: toward algae-based products. U: *Algae biomass: characteristics and applications*, str. 1-6. Springer, Švicarska, 2018.
- Michalak I, Dmytryk A, Wieczorek PP, Rój E, Łęska B, Górkka B, Messyasz B, Lipok J, Mikulewicz M, Wilk R, Schroeder G, Chojnacka K: Supercritical algal extracts: a source of biologically active compounds from nature. *Journal of Chemistry* 2015:1-14, 2015.
- Michalak I, Gorka B, Wieczorek PP, Roj E, Lipok J, Leska B, Messyasz B, Wilk R, Schroeder G, Dobrzynska-Inger A, Chojnacka K: Supercritical fluid extraction of algae enhances levels of biologically active compounds promoting plant growth. *European Journal of Phycology* 51:1-10, 2016.
- Mirzayeva A, Castro R, G Barroso C, Durán-Guerrero E: Characterization and differentiation of seaweeds on the basis of their volatile composition. *Food Chemistry* 336:127725, 2021.
- Miyashita K, Mikami N, Hosokawa, M: Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: a review. *Journal of Functional Foods* 5:1507-1517, 2013.
- Moubayed NMS, Al Hourri, HJ, Al Khulaifi MM, Al Farraj DA: Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). *Saudi Journal of Biological Sciences* 24:162-169, 2017.

- Mouritsen OG, Duelund L, Petersen MA, Hartmann AL, Bom Frost M: Umami taste, free amino acid composition, and volatile compounds of brown seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 113:1213-1232, 2019.
- Mujić I, Jokić S: Ekstrakcija i ekstraktori biljnih sirovina. Izdavač: Studio HS internet, Osijek, 2018.
- Munda IM: Observations on variation in form and chemical composition of *Fucus ceranoides* L. *Nova Hedwigia* 8:403-14, 1964.
- Murray M, Dordevic AL, Ryan L, Bonham MP: Phlorotannins and macroalgal polyphenols: potential as functional food ingredients and role in health promotion. U: *Functional food and human health*, str. 27-58. Springer, Singapur, 2018.
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T: Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50:889-893, 2002.
- Najdek M, Iveša LJ, Paliaga P, Blažina M, Čelig A: Changes in the fatty acid composition of *Fucus virsoides* J. Agardh in response to the type of substratum. *Acta Adriatica* 55:19-30, 2014.
- Namikoshi M, Fujiwara T, Nishikawa T, Ukai K: Natural abundance <sup>14</sup>C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. *Marine Drugs* 4:290-297, 2006.
- Newman KA, Gschwend PM: A method for quantitative determination of volatile organic compounds in marine macroalgae. *Limnology and Oceanography* 32:702-708, 1987.
- Niemczyk E, Zyska-Haberecht B, Drzyzga D, Lenartowicz M, Lipok J.: Algae in biotechnological processes. U: *Algae biomass: characteristics and applications*, str. 33-48. Springer, Švicarska, 2018.
- Nunes N, Leça JM, Pereira AC, Pereira V, Ferraz S, Barreto MC, Marques JC, Pinheiro de Carvalho MAA: Evaluation of fucoxanthin contents in seaweed biomass by vortex-assisted solid-liquid microextraction using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Algal Research* 42:101603, 2019.
- Ortiz J, Uquiche E, Robert P, Romero N, Quitral V, Lianten C: Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111:320-327, 2009.

- Oshihiro T, Nakano S, Takahashi Y, Suzuki M, Izumi Y: Occurrence of bromoperoxidase in the marine macroalga *Ulva lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme. *Phytochemistry* 52:1211-1215, 1999.
- Osório C, Machado S, Peixoto J, Bessada S, Pimentel FB, C. Alves R, Oliveira MBPP: Pigments content (chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. *Separations* 7:33, 2020.
- Ospina M, Casto-Vargas HI, Parada-Alfonso F: Antioxidant capacity of Colombian seaweeds: Extracts obtained from *Gracilaria mammillaris* by means of supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 128:314-322, 2017.
- Ozaki K, Ohta A, Iwata C, Horikawa A, Tsuji K, Ito E, Ikai Y, Harad, K: Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds. *Chemosphere* 71:1531-1538, 2008.
- Ozdemir G, Horzum Z, Sukatar A, Karabay-Yavasoglu NU: Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictopteris membranaceae* and *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey. *Pharmaceutical Biology* 44:183-188, 2006.
- Paiva L, Lima E, Patarra RF, Neto AI, Baptista J. Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chemistry* 164:128-135, 2014.
- Parapurath SN, Bernard HE, Subramaniamc DM, Ramamurthy R: A dimensional investigation on seaweeds: their biomedical and industrial applications. U: *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology*, str. 532-540. John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, SAD, 2012.
- Patarra RF, Paiva L, Neto AI, Lima E, Baptista J: Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 23:205-208, 2011.
- Peinado I, Girón J, Koutsidis G, Ames J: Chemical composition, antioxidant activity and sensory evaluation of five different species of brown edible seaweeds. *Food Research International* 66:36-44, 2014.
- Pennarun AL, Prost C, Demaimay M: Identification and origin of the character-impact compounds of raw oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:1652-1660, 2002.
- Pereira H, Barreira L, Figueiredo F, Custodio L, Vizetto-Duarte C, Polo C, Rešek E, Engelen A, Varela J: Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs* 10:1920–1935, 2012a.
- Pereira L: *Edible Seaweeds of the World*. CRC Press: Boca Raton, Florida, SAD, 2016.

- Pereira LCC, da Silva NIS, da Costa RM, Asp NE, da Costa KG, Vila-Concejo A: Seasonal changes in oceanographic processes at an equatorial macrotidal beach in northern Brazil. *Continental Shelf Research* 43:95-106, 2012b.
- Pettit GR, Herald CL, Ode RH, Brown P, Gust DJ, Michael C: The isolation of loliolide from an Indian Ocean Opisthobranch mollusc. *Journal of Natural Products* 43:752-755, 1980.
- Pham TN, Um Y, Yoon HH: Pretreatment of macroalgae for volatile fatty acid production. *Botanica Marina* 51:485–492, 2008.
- Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E: In the search of new functional food ingredients from algae. *Food Science and Technology* 19:31-39, 2008.
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Garcia-Blairsy Reina G, Herrero M, Senorans FJ, Ibanez E: Screening of bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51:450-455, 2010.
- Pohnert G: Diatom/copepod interactions in plankton: The indirect chemical defense of unicellular algae biogenesis of volatile compounds via oxylipins in edible seaweeds. *ChemBiochem* 6:946–959, 2005.
- Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS: Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* 1163:2–24, 2007.
- Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N, Hirose A, Stephen N, Gowda LR, Hosokawa M, Miyashita K: Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry* 115:501–508, 2009a.
- Prabhasankar P, Ganesan P, Bhaskar N: Influence of Indian brown seaweed (*Sargassum marginatum*) as an ingredient on quality, biofunctional and microstructure characteristics of pasta. *Food Science and Technology International* 15:471-479, 2009b.
- Quitain AT, Kai T, Sasaki M, Goto M: Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:5792–5797, 2013.
- Ramus J, Lemons F, Zimmerman C: Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology* 42:293–303, 1977.

- Ren B, Chen C, Li C, Fu X, You L, Liu RH: Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities. *Carbohydrate Polymers* 173:192–201, 2017.
- Rey F, Cartaxana P, Melo T, Calado R, Pereira R, Abreu H, Domingues P, Cruz S, Domingues MR: Domesticated populations of *Codium tomentosum* display lipid extracts with lower seasonal shifts than conspecifics from the wild-relevance for biotechnological applications of this green seaweed. *Marine Drugs* 31:188, 2020.
- Riguera R, Casteolo L, Quintela JM, Vilalta R: Acids, esters and hydrocarbons of algae of the Galician coast. *Acta Cientifica Compostelana* 21:13–26, 1984.
- Riosmena-Rodríguez R, Siquelros-Beltrones D: Taxonomy of the genus *Amphiroa* (Corallinales, Rhodophyta) in the southern Baja California Peninsula, Mexico. *Phycologia* 35:135–147, 1996.
- Ritchie RJ: Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46:115–126, 2008.
- Rodrigues D, Freitas AC, Pereira L, Rocha-Santos TAP, Vasconcelos MW, Roriz M, Rodriguez-Alcala LM, Gomes AMP, Duarte AC: Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry* 183:197-207, 2015.
- Roh MK, Salim Uddin MD, Chun BS: Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13:724-729, 2008.
- Rontani JF, Volkman JK: Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Organic Geochemistry* 34:1–35, 2003.
- Rontani JF, Giral PP, Baillet G, Raphel D: 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one: A useful marker for photodegradation of chlorophylls with a phytol ester group in seawater. *Organic Geochemistry* 18:139–142, 1992.
- Roohinejad S, Koubaa M, Barba FJ, Saljoughan S, Amid M, Greiner R: Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial products. *Food Research International* 99:1066-1083, 2016.

- Roy S: Screening and partial characterization of natural antioxidants from seaweeds collected from, Rameshwaram Southeast Coast of India. *Journal of Marine Science Research and Oceanography* 3:1–12, 2020.
- Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K: Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8516–8522, 2007.
- Sakan T, Isoe S, Hyeon SB: The structure of actinidiolide, dihydroactinidiolide and actinidol. *Tetrahedron Letters* 4:1623–1627, 1967.
- Samaraweera AM, Vidanarachchi JK, Kurukulasuriya MS: Industrial Applications of Macroalgae. U: *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, str. 500-521. John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, SAD, 2012.
- Sangeetha RK, Bhaskar N, Baskaran V: Comparative effects of  $\beta$ -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 331:59–67, 2009.
- Santos Leite Neta MT, Narain N: Volatile Components in Seaweeds. *Examines Marine Biology and Oceanography* 2:195–201, 2018.
- Santos SA, Vilela C, Freire CS, Abreu MH, Rocha SM, Silvestre AJ: Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: a source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183:122-128, 2015.
- Santoyo S, Plaza M, Jaime L, Ibanez E, Reglero G, Senorans J: Pressurized liquids as an alternative green process to extract antiviral agents from the edible seaweed *Himantalia elongata*. *Journal of Applied Phycology* 23:909–917, 2011.
- Saravana PS, Tilahun A, Cho YJ, Choi JH, Park YB, Woo HC, Chin BS: Influence of co-solvents on fucoxanthin and phlorotannin recovery from brown seaweed using supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids* 120:295–303, 2017.
- Sartal CG, Alonso MC, Barrera PB: Application of Seaweeds in the Food Industry. U: *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, str. 522-531. John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, SAD, 2012.
- Schmid M, Guiheneuf F, Stengel DB: Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. *Journal of Applied Phycology* 26:451–463, 2014.

- Schmidt H, Kurtzer R, Eisenreich W, Schwab W: The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 281:9845–9851, 2006.
- Schubert N, Garcia-Mendoza E, Pacheco-Ruiz I: Carotenoid composition of marine red algae. *Journal of Phycology* 42:1208–1216, 2006.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E: Biosynthesis of plant derived flavour compounds. *The Plant Journal* 54:712–732, 2008.
- Shan X, Liu X, Hao J, Cai C, Fan F, Dun Y, Zhao X, Liu X, Li C, Yu G: *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *International Journal of Biological Macromolecules* 82:249-255, 2016.
- Shannon E, Abu-Ghannam N: Enzymatic extraction of fucoxanthin from brown seaweeds. *International Journal of Food Science and Technology* 53:2195-2204, 2018.
- Shannon E, Abu-Ghannam N: Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology. *Journal of Applied Phycology* 29:1027–1036, 2017.
- Silva AFR, Abreu H, Silva AMS, Cardoso SM: Effect of oven-drying on the recovery of valuable compounds from *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp. and *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs* 17:90, 2019.
- Silva Ferreira AC, Monteiro J, Oliveira C, Guedes de Pinho P: Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation. *Food Chemistry* 110:83–87, 2008.
- Silva J, Martins A, Alves C, Pinteus S, Gaspar H, Alfonso A, Pedrosa R: Natural approaches for neurological disorders - the neuroprotective potential of *Codium tomentosum*. *Molecules* 25:5478, 2020.
- Silva G, Pereira RB, Valentão P, Andrade PB, Sousa C: Distinct fatty acid profile of ten brown macroalgae. *Revista Brasileira De Farmacia* 23:608–613, 2013.
- Sivagnanam SP, Yin S, Choi JH, Park YB, Woo HC, Chun BS: Biological properties of fucoxanthin in oil recovered from two brown seaweeds using supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Marine Drugs* 13:3422–3442, 2015.
- Stengel DB, Connan S: Marine Algae: a Source of Biomass for Biotechnological Applications. U: *Natural Products From Marine Algae. Methods and Protocols*, str. 1-37. Human Press, New York, SAD, 2015.



- Stirk WA, Reinecke DL, van Staden J: Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 19:271–276, 2007.
- Sugisawa H, Nakamura K, Tamura, H: The aroma profile of the volatiles in marine green algae *Ulva pertusa*. *Food Reviews International* 6:573–589, 1990.
- Sukenik A, Carmeli Y, Berner T: Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology* 25:686-92, 1989.
- Sun Y, Chavan M: Cosmetic Compositions Comprising Marine Plants. United States patent US 9,603,790 B2. Inventors: Basf Corporation, 2017.
- Sun SM, Chung GH, Shin TS: Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*. *Journal of Applied Phycology* 24:1003–1013, 2012.
- Sunda W, Kieber DJ, Kiene RP, Huntsman S: An antioxidant function of DMSP and DMS in marine algae. *Nature* 48:317–320, 2002.
- Surget G, Roberto VP, Le Lann K, Mira S, Guerard F, Laize V, Poupart N, Leonor Cancela M, Stiger-Pouvreau V: Marine green macroalgae: A source of natural compounds with mineralogenic and antioxidant activities. *Journal of Applied Phycology* 29:575–584, 2017.
- Takahashi H, Sumitani H, Inada Y, Mori D: Identification of volatile compounds of Kombu (*Laminaria* spp.) and their odor description. *Nippon Kagaku Kaishi* 49:228–237, 2002.
- Takaichi S: Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* 9:1101–1118, 2011.
- Tanchotikul U, Hsieh TC-Y: Volatile flavor components in crayfish waste. *Journal of Food Science* 54:1515-1520, 1989.
- Terasaki M, Narayan B, Kamogawa H, Nomura M, Mol Stephen N, Kawagoe C, Hosokawa M, Miyashita K: Carotenoid profile of edible Japanese seaweeds: an improved HPLC method for separation of major carotenoids. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 21:5, 468-479, 2012.
- Terasaki M, Hirose A, Narayan B, Baba Y, Kawagoe C, Yasui H, Saga N, Hosokawa M, Miyashita K: Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. *Journal of Phycology* 45:974–980, 2009.

- Thiyagarasaiyar K, Goh B-H, Jeon Y-J, Yow Y-Y: Algae metabolites in cosmeceutical: an overview of current applications and challenges. *Marine Drugs* 18:323, 2020.
- Thomas NV, Kim SK: Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32:325-335, 2011.
- Turquois T, Gloria H: Determination of the absolute molecular weight averages and molecular weight distributions of alginates used as ice cream stabilizers by using multiangle laser light scattering measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5455-545, 2000.
- Uragami C, Galzerano D, Gall A, Shigematsu Y, Meisterhans M, Oka N, Iha M, Fujii R, Robert B, Hashimoto H: Light-dependent conformational change of neoxanthin in a siphonous green alga, *Codium intricatum*, revealed by Raman spectroscopy. *Photosynthesis Research* 121:69-77, 2014.
- Valentão P, Trindade P, Gomes D, Guedes de Pinho P, Mouga T, Andrade PB: *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry* 119:1359–1368, 2010.
- Van Ginneken VJ, Helsper JP, De Visser W, Van Keulen H, Brandenburg WA: Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease* 10:104–108, 2011.
- Vaque D, Agusti S, Duarte CM, Enriquez S, Geertz-Hansen O: Microbial heterotrophs within *Codium bursa*: A naturally isolated microbial food web. *Marine Ecology Progress Series* 109:275–282, 1994.
- Vaskovsky VE, Khotimchenko SV, Xia B, Hefang L: Polar lipids and fatty acids of some marine macrophytes from the Yellow Sea. *Phytochemistry* 42:1347–1356, 1996.
- Venkatesalu V, Sundaramoorthy P, Anantharaj M, Chandrasekaran M, Senthilkumar A: Seasonal variation on fatty acid composition of some marine macroalgae from Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, Southeast cost of India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 41:442-450, 2012.
- Vidondo B, Duarte CM: Seasonal growth of *Codium bursa*, a slow-growing Mediterranean macroalga: In situ experimental evidence of nutrient limitation. *Marine Ecology Progress Series* 123:185–191, 1995.
- Vimala T, Poonghuzhali TV: Estimation of pigments from seaweeds by using acetone and DMSO. *International Journal of Science and Research* 4:1850-1854, 2013.

- Wang HD, Chen CC, Huynh P, Chang JS: Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology* 184:355-362, 2015.
- Wang J, Jin W, Niu X, Zhang H, Zhang Q: Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae. *International Journal of Biological Macromolecules* 57:26-29, 2013.
- Wijesekara I, Senevirathne M, Li YX, Kim SK: Functional ingredients from marine alga as potential antioxidants in the food industry. U: *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, str. 398-402. John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, SAD, 2012.
- Winterhalter P, Rouseff R: Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. U: *Carotenoid-derived aroma compounds*, str. 1–17. American Chemical Society, Washington DC, SAD, 2001.
- Woo MN, Jeon SM, Kim HJ, Lee MK, Shin SK, Shin YC, Park YB, Choi MS: Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice. *Chemico-Biological Interactions* 186:316–322, 2010.
- Xu XQ, Tran VH, Kraft G, Beardall J: Fatty acids of six *Codium* species from southeast Australia. *Phytochemistry* 48:1335–1339, 1998.
- Yalçın S, Karakaş Ö, Okudan EŞ, Başkan KS, Çekiç SD, Apak R: HPLC detection and antioxidant capacity determination of brown, red and green algal pigments in seaweed extracts. *Journal of Chromatographic Science* 59:325-33, 2020.
- Yang F, Wei Z, Long L: Transcriptomic and physiological responses of the tropical reef calcified macroalga *Amphiroa fragilissima* to elevated temperature. *Journal of Phycology* 57:1254-1265, 2021.
- Yazici Z, Aysel V, Öksüz E, Köse A, Cumali S, Güven KC: Fatty acid composition of marine macroalgae from the Black Sea and Dardanelles. *Toxicological and Environmental Chemistry* 89:371–379, 2007.
- Yilmaz Koz FF, Karabay Yavasoglu NU, Demirel Z, Sukatar A, Ozdemir G: Antioxidant and antimicrobial activities of *Codium fragile* (Suringar) Hariot (Chlorophyta) essential oil and extracts. *Asian Journal of Chemistry* 21:1197–1209, 2009.
- Yin SW, Wang CY, Li XM, Wang BG: A new clerosterol derivative, trans-phytol, and related metabolites from marine green alga *Codium fragile* (Codiaceae) and their

- chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 33:1288–1292, 2005.
- Yokoya NS, Necchi Jr O, Martins AP, Gonzalez SF, Plastino EM: Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrindeficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 19:197–205, 2007.
- Youngblood WW, Blumer M: Alkanes and alkenes in marine benthic algae. *Marine Biology* 21:163–172, 1973.
- Youngblood WW, Blumer M, Guillard RL, Fiore F: Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Marine Biology* 8:190–201, 1971.
- Zaragozá MC, López D, Sáiz MP, Poquet M, Pérez J, Puig-Parellada P, Marmol F, Simonetti P, Gardana C, Lerat Y, Burtin P, Inisan C, Rousseau I, Besnard M, Mitjavila MT: Toxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of two *Fucus vesiculosus* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:7773–7780, 2008.
- Zeneveld JS: The utilization of marine algae in tropical South and East Asia. *Economic Botany* 13:89-131, 1959.
- Zhang R, Yuen AKL, de Nys R, Masters AF, Maschmeyer T: Step by step extraction of bioactives from the brown seaweeds, *Carpophyllum flexuosum*, *Carpophyllum plumosum*, *Ecklonia radiata* and *Undaria pinnatifida*. *Algal Research* 52:102092, 2020.
- Zhang L, Wang H, Fan Y, Gao Y, Li X, Hu Z, Ding K, Wang Y, Wang X: Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. *Scientific Reports* 7:1–15, 2017.

## **8. PRILOZI**

## Prilog 1 Znanstveni radovi objavljeni iz teme doktorske disertacije



Article

## Bioprospecting of Less-Polar Constituents from Endemic Brown Macroalga *Fucus virsoides* J. Agardh from the Adriatic Sea and Targeted Antioxidant Effects In Vitro and In Vivo (Zebrafish Model)

Igor Jerković <sup>1,\*</sup>, Ana-Marija Cikoš <sup>2</sup>, Sanja Babić <sup>3</sup>, Lara Čizmek <sup>3</sup>, Krunoslav Bojanić <sup>3</sup>, Krunoslav Aladić <sup>2</sup>, Nikolay V. Ul'yanovskii <sup>4</sup>, Dmitry S. Kosyakov <sup>4</sup>, Albert T. Lebedev <sup>5</sup>, Rozelindra Čož-Rakovac <sup>3</sup>, Polonca Trebše <sup>6</sup> and Stela Jokić <sup>2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia
  - <sup>2</sup> Department of Process Engineering, Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia; acikos@ptfos.hr (A.-M.C.); kaladic@ptfos.hr (K.A.)
  - <sup>3</sup> Laboratory for Aquaculture Biotechnology, Division of Materials Chemistry, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Croatia; sanja.babic@irb.hr (S.B.); lara.cizmek@irb.hr (L.Č.); krunoslav.bojanic@irb.hr (K.B.); rozelindra.coz-rakovac@irb.hr (R.C.-R.)
  - <sup>4</sup> Laboratory of Environmental Analytical Chemistry, Core Facility Center "Arktika", Northern (Arctic) Federal University, Naberezhnaya Severnoy Dviny 17, 163002 Arkhangelsk, Russia; n.ulyanovskiy@narfu.ru (N.V.U.); d.kosyakov@narfu.ru (D.S.K.)
  - <sup>5</sup> Department of Organic Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; mocehops@ya.ru
  - <sup>6</sup> Faculty of Health Sciences, University of Ljubljana, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenia; polonca.trebse@zlu.uni-lj.si
- \* Correspondence: igor@ktf-split.hr (I.J.); sjokic@ptfos.hr (S.J.); Tel: +385-21-329-461 (I.J.); +385-31-224-333 (S.J.)



**Citation:** Jerković, I.; Cikoš, A.-M.; Babić, S.; Čizmek, L.; Bojanić, K.; Aladić, K.; Ul'yanovskii, N.V.; Kosyakov, D.S.; Lebedev, A.T.; Čož-Rakovac, R.; et al. Bioprospecting of Less-Polar Constituents from Endemic Brown Macroalga *Fucus virsoides* J. Agardh from the Adriatic Sea and Targeted Antioxidant Effects In Vitro and In Vivo (Zebrafish Model). *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 235. <https://doi.org/10.3390/md19050235>

Academic Editor: Sylvia Urban

Received: 3 April 2021  
Accepted: 20 April 2021  
Published: 22 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The endemic brown macroalga *Fucus virsoides* J. Agardh from the Adriatic Sea was in the focus of the present research. The volatiles of fresh (FrFv) and air-dried (DrFv) samples of *F. virsoides* obtained by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and hydrodistillation (HD) were analyzed by gas chromatography equipped with flame ionization detector and mass spectrometry (GC-FID/MS). The major HS-FrFv compound was pentadecane (61.90–71.55%) followed by pentadec-1-ene (11.00–7.98%). In HS-DrFv, pentadec-1-ene was not present, and few lower aliphatic compounds appeared, as well as benzaldehyde and benzyl alcohol. In HD-FrFv, particularly abundant were alkenes (such as pentadec-1-ene (19.32%), or (*E*)-pentadec-7-ene (8.35%)). In HD-DrFv, more oxidation products were present (e.g., carbonyl compounds such as tridecanal (18.51%)). The fatty acids profile of freeze-dried sample (FdFv) after conversion to methyl esters was determined by GC-FID, and oleic acid was dominant (42.28%), followed by arachidonic acid (15.00%). High-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization (HPLC-ESI-HRMS) was used for the screening of less polar fractions (F3 and F4) of *F. virsoides*. Mono- and diglycerides of stearic, palmitic, oleic, and arachidonic acids were found. Terpenoids and steroids comprised the compounds C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>(O<sub>2</sub>) and C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>(2)</sub>. Among carotenoids, fucoxanthin was identified. Chlorophyll derivatives were also found (C<sub>55</sub>H<sub>74</sub>(O<sub>5,7</sub>)), dominated by pheophytin *a*. The antioxidant activity of the fractions was investigated by in vitro assays (oxygen radical absorbance capacity (ORAC), reduction of radical cation (ABTS•<sup>+</sup>), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate (DPPH) assay, and ferric reducing antioxidant power (FRAP)) and by in vivo zebrafish model (along with fish embryotoxicity). In vitro experiments proved good radical scavenging abilities of F3 and F4 fractions, which were additionally supported by the protective effect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in zebrafish embryos.

**Keywords:** brown algae; volatiles; fatty acids; pigments; bioassays; embryotoxicity; reactive oxygen species

## Article

# Bioprospecting of Coralline Red Alga *Amphiroa rigida* J.V. Lamouroux: Volatiles, Fatty Acids and Pigments

Ana-Marija Cikoš <sup>1</sup>, Ivana Flanjak <sup>2</sup>, Krunoslav Bojanić <sup>3</sup>, Sanja Babić <sup>3</sup>, Lara Čizmek <sup>3</sup>, Rozelindra Čož-Rakovac <sup>3</sup>, Stela Jokić <sup>1,\*</sup> and Igor Jerković <sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Process Engineering, Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia; acikos@ptfos.hr

<sup>2</sup> Department of Food and Nutrition Research, Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia; ivana.flanjak@ptfos.hr

<sup>3</sup> Laboratory for Biotechnology in Aquaculture, Division of Materials Chemistry, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Croatia; Krunoslav.Bojanic@irb.hr (K.B.); Sanja.Babic@irb.hr (S.B.); Lara.Cizmek@irb.hr (L.Č.); Rozelindra.Coz-Rakovac@irb.hr (R.C.-R.)

<sup>4</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđer Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

\* Correspondence: sjoki@ptfos.hr (S.J.); igor@ktf-split.hr (I.J.); Tel: +385-31-224-333 (S.J.); +385-21-329-461 (I.J.)

**Abstract:** Due to the lack of phytochemical composition data, the major goals of the present study on *Amphiroa rigida* J.V. Lamouroux were to: (a) investigate and compare volatiles profiles of fresh and air-dried samples obtained by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and hydrodistillation (HD) followed by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) analysis; (b) determine fatty acids profile by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID); (c) obtain the pigment profiles of semipurified extracts by high performance liquid chromatography (HPLC) and (d) evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of its less polar fractions. The comparison of headspace of fresh (FrAr) and air-dried (DrAr) samples revealed many similarities regarding the presence and abundance of the major (heptadecane and pentadecane) and minor compounds. The hydrodistillate (HD) of DrAr profile was quite different in comparison to HD-FrAr. The predominant compound in HD-FrAr was (*E*)-phytol. In HD-DrAr, its percentage was approximately one-half reduced, but the abundance of its degradation product phytone and of unsaturated and oxygenated compounds increased indicating more intense fatty acid decomposition and oxidation during drying. The fatty acid determination revealed that the most dominant was palmitic acid (42.86%) followed by eicosapentaenoic acid (19.14%) and stearic acid (11.65%). Among the pigments, *A. rigida* contained fucoxanthin (0.63 mg g<sup>-1</sup> of dry fraction), lutein (5.83 mg g<sup>-1</sup>), β-carotene (6.18 mg g<sup>-1</sup>) and chlorophyll *a* (13.65 mg g<sup>-1</sup>). The analyzed less polar fractions of *A. rigida* exhibited antioxidant scavenging activity with diammonium salt of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-yl) sulfonic acid (ABTS) assay up to 3.87 mg g<sup>-1</sup> trolox equivalents (TE), and with the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay up to 825.63 μmol g<sup>-1</sup> TE (with carotenoids as the major contributors).

**Keywords:** red algae; extraction; volatile compounds; fatty acids; pigments; antioxidant activity



**Citation:** Cikoš, A.-M.; Flanjak, I.; Bojanić, K.; Babić, S.; Čizmek, L.; Čož-Rakovac, R.; Jokić, S.; Jerković, I. Bioprospecting of Coralline Red Alga *Amphiroa rigida* J.V. Lamouroux: Volatiles, Fatty Acids and Pigments. *Molecules* **2021**, *26*, 520. <https://doi.org/10.3390/molecules26030520>

Academic Editor: Henryk H. Jelen

Received: 22 December 2020

Accepted: 18 January 2021

Published: 20 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

In marine ecosystems, algae can release a wide spectrum of volatile organic compounds (VOCs) with ecological functions to increase the tolerance to abiotic stresses, transfer stress information to induce defense, play allelopathic roles or protect against the predators [1]. Macroalgae are known for their content of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as omega-3 fatty acids that are associated with the several biological activities and health benefits including antioxidant [2], antibacterial, antitumor and anti-inflammatory effects [3]. Red algae, especially species belonging to the order Corallinales, are rich in eicosapentaenoic acid (EPA) that is known as omega-3 essential fatty acid [4].



Article

## Chemical Diversity of *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh Headspace Compounds, Volatiles, Fatty Acids and Insight into Its Antifungal Activity

Igor Jerković <sup>1,\*</sup>, Marina Kranjac <sup>1</sup>, Zvonimir Marijanović <sup>1</sup>, Bojan Šarkanj <sup>2</sup>, Ana-Marija Cikoš <sup>3</sup>, Krunoslav Aladić <sup>4</sup>, Sandra Pedisić <sup>5</sup> and Stela Jokić <sup>3</sup>

- <sup>1</sup> Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, 21000 Split, Croatia; mkranjac@ktf-split.hr (M.K.); z.marijanovic@ktf-split.hr (Z.M.)  
<sup>2</sup> Department of Food Technology, University Center Koprivnica, University North, Trg dr. Žarka Dolinara 1, 48000 Koprivnica, Croatia; bsarkanj@unin.hr  
<sup>3</sup> Faculty of Food Technology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, 31000 Osijek, Croatia; acikos@ptfos.hr (A.-M.C.); stela.jokic@ptfos.hr (S.J.)  
<sup>4</sup> Croatian Veterinary Institute, Branch-Veterinary Institute Vinkovci, Josipa Kozarca 24, 32100 Vinkovci, Croatia; k2aladic@gmail.com  
<sup>5</sup> Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia; spedisić@pbf.hr  
 \* Correspondence: igor@ktf-split.hr; Tel: +385-21-329-461

Academic Editors: Jordi Molgó, Olivier P. Thomas and Denis Servent

Received: 16 January 2019; Accepted: 22 February 2019; Published: 27 February 2019



**Abstract:** The focus of present study is on *Codium bursa* collected from the Adriatic Sea. *C. bursa* volatiles were identified by gas chromatography and mass spectrometry (GC-FID; GC-MS) after headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), hydrodistillation (HD), and supercritical CO<sub>2</sub> extraction (SC-CO<sub>2</sub>). The headspace composition of dried (HS-D) and fresh (HS-F) *C. bursa* was remarkably different. Dimethyl sulfide, the major HS-F compound was present in HS-D only as a minor constituent and heptadecane percentage was raised in HS-D. The distillate of fresh *C. bursa* contained heptadecane and docosane among the major compounds. After air-drying, a significantly different composition of the volatile oil was obtained with (*E*)-phytol as the predominant compound. It was also found in SC-CO<sub>2</sub> extract of freeze-dried *C. bursa* (FD-CB) as the major constituent. Loliolide (3.51%) was only identified in SC-CO<sub>2</sub> extract. Fatty acids were determined from FD-CB after derivatisation as methyl esters by GC-FID. The most dominant acids were palmitic (25.4%), oleic (36.5%), linoleic (11.6%), and stearic (9.0%). FD-CB H<sub>2</sub>O extract exhibited better antifungal effects against *Fusarium* spp., while dimethyl sulfoxide (DMSO) extract was better for the inhibition of *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, and *Rhizopus* spp. The extracts showed relatively good antifungal activity, especially against *P. expansum* (for DMSO extract MIC<sub>50</sub> was at 50 µg/mL).

**Keywords:** headspace solid-phase microextraction (HS-SPME); distillation; supercritical CO<sub>2</sub> extraction; gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS)

### 1. Introduction

Due to their biological and chemical variations, algae have drawn attention as a source of bioactive compounds whose concentration depends on the season, growth conditions, location, and environmental changes [1]. The algae are more frequently represented by three groups (green (*Chlorophyta*), brown (*Phaeophyta*), and red (*Rhodophyta*)). They contain specific bioactive compounds (e.g., brown algae contain specific polyphenols called phlorotannins [2], red algae have





Review

# Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae

Ana-Marija Cikoš<sup>1</sup>, Stela Jokić<sup>1</sup>, Drago Šubarić<sup>1</sup> and Igor Jerković<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia; acikos@ptfos.hr (A.-M.C.); stela.jokic@ptfos.hr (S.J.); dsubaric@ptfos.hr (D.Š.)

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, R. Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

\* Correspondence: igor@ktf-split.hr; Tel.: +385-21-329-461

Received: 27 August 2018; Accepted: 20 September 2018; Published: 23 September 2018



**Abstract:** Marine macroalgae represent a rich source of bioactive compounds that can be implemented in various food, cosmetic, and pharmaceutical products for health improvement. It has been proven that these bioactive compounds, such as polyphenols, polysaccharides, carotenoids, and  $\omega$ -3 fatty acids possess bioactivity. For the extraction of these compounds, modern methods (Supercritical Fluid Extraction (SFE), Subcritical Water Extraction (SWE), Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), and Microwave-Assisted Extraction (MAE)) have been used due to their advantages over the conventional methods. The process parameters of each method must be optimized for obtaining the extracts with the targeted bioactive compounds. In distinction from the existing reviews, the present review provides novelty with respect to: (a) presenting systematically the selected process parameters of SFE (temperature, time, pressure, use of co-solvents), SWE (temperature, time, pressure, solid-solvent ratio), UAE (temperature, time, frequency, power, solid-solvent ratio), and MAE (temperature, time, frequency, power, solvent type) applied for the extractions of marine macroalgae; (b) reporting the major groups or individual compounds extracted with their biological activities (if determined); and, (c) updating available references.

**Keywords:** marine macroalgae; supercritical CO<sub>2</sub> extraction; subcritical water extraction; ultrasound-assisted extraction; microwave-assisted extraction; bioactive compounds; biological activity

## 1. Introduction

There is growing interest for new products with various bioactive compounds with potential for health improvement. It has been noticed that marine algae, except for consumption, can be used for functional products due to their bioactive compounds [1]. Our ancestors used marine algae for therapeutical purposes [2], and today they are the part of everyday diet in Asian culture. Marine algae, also called seaweeds, are divided into three classes depending on their chemical structure and pigment distribution. These classes are brown algae (*Phaeophyta*), red algae (*Rhodophyta*), and green algae (*Chlorophyta*) [3]. Red algae are the largest producers of bioactive compounds [4], which can be applied for the cosmetic, pharmaceutical, and food industry [5].

Due to the presence of biocompounds in macroalgae, they possess a wide range of bioactivities, such as anti-aging, antioxidant, antimicrobial, antiproliferative, anti-inflammatory, antidiabetic, and neuroprotective activity [5–7]. Since macroalgae live in extreme conditions, they must develop mechanisms of defense and learn how to adapt to these fluctuations in the environment. Because of that, macroalgae produce secondary metabolites that possess bioactivity [3].



Review

## Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis, and Bioactivity

Ana-Marija Cikoš<sup>1</sup>, Mladenka Jurin<sup>2</sup>, Rozelindra Čož-Rakovac<sup>2</sup>, Stela Jokić<sup>1</sup> and Igor Jerković<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Food Technology Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, 31000 Osijek, Croatia; acikos@ptfos.hr (A.-M.C.); sjokic@ptfos.hr (S.J.)

<sup>2</sup> Ruder Bošković Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia; mladenka.jurin@irb.hr (M.J.); rozelindra.coz-rakovac@irb.hr (M.Č.-R.)

<sup>3</sup> Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, R. Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

\* Correspondence: igor@ktf-split.hr; Tel.: +385-21-329-461

Received: 22 August 2019; Accepted: 13 September 2019; Published: 16 September 2019



**Abstract:** Macroalgae produce a wide range of monoterpenes as secondary metabolites of mevalonate (MVA) and/or methylerythritol phosphate (MEP) pathway (often including haloperoxidase action). Great biodiversity of macroalgal monoterpenes was reported including acyclic, monocyclic, and bicyclic structures. Halogenated monoterpenes exhibited significant biological activity (e.g., anticancer, antiplasmodial, and insecticidal) that is influenced by the number of present halogens (higher halogen content is preferable, especially bromine) and their position within the monoterpene skeleton. In distinction from the existing reviews, the present review provides novelty with respect to: (a) exclusively monoterpenes from red macroalgae are targeted; (b) biosynthesis, isolation, and analysis, as well as bioactivity of monoterpenes are represented; (c) the methods of their isolation, analysis, and structure elucidation are summarized; (d) the bioactivity of macroalgal monoterpenes is systematically presented with emphasis on anticancer activity; (e) the literature references were updated.

**Keywords:** macroalgae; monoterpenes; biosynthesis; isolation; bioactivity

### 1. Introduction

Natural organic compounds exhibited a significant role in the development of new drugs [1] and often serve as a model for making new semi-synthetic and synthetic compounds with improved biological activity [2]. The search for new drugs has led to the testing of naturally occurring compounds from marine environment [3]. Marine macroalgae produce a number of structurally different compounds that exhibit various pharmacological properties [4–6], including antiviral, antibacterial, antifungal, cytotoxic [7], insecticidal, antihelminthic, antifeedant, antioxidant, anti-inflammatory [5,7], and antitumor properties [8]. The algae are also source of nutrients [9], containing carbohydrates, amino acids, fatty acids, fibers, vitamins (A, C, B1, B2, B6, and niacin), and minerals (iodine, potassium, magnesium, and calcium). In addition to primary metabolites, algae also produce a large variety of natural organic compounds, which do not play a prominent role in primary metabolism [10]. Such substances are called secondary (specialized) metabolites and are produced in specialized cells. Terpenes (monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes) are algal and plants specialized metabolites [10,11]. They are a large and structurally diverse group of compounds (isoprenoids) of the general formula (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> containing isoprene unit (2-methylbuta-1,3-diene) that are found in the volatile oils from land plants and seaweeds [11]. Marine monoterpenes remained undiscovered until 1955 when seven monoterpenes of green alga *Ulva pertusa* Kjellman were reported [12]. The first unusual



## Update on sesquiterpenes from red macroalgae of the *Laurencia* genus and their biological activities (2015–2020)

Ana-Marija Cikoš<sup>a</sup>, Mladenka Jurin<sup>b</sup>, Rozelindra Čož-Rakovac<sup>b</sup>, Dajana Gašo-Sokač<sup>a</sup>, Stela Jokić<sup>a</sup>, Igor Jerković<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Food Technology Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

<sup>b</sup> Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>c</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

### ARTICLE INFO

#### Keywords

*Laurencia* genus

Macroalgae

Marine natural products (different sesquiterpene skeletons)

Bioactive compounds (cytotoxic, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antidiabetic, anthelmintic, others)

### ABSTRACT

*Laurencia* genus has been the most promising source of sesquiterpenes (among all macroalgae) including those with high degree of halogenation, especially bromination. Related published reviews do not report novel researches included in this study and are not focused exclusively on this genus or sesquiterpenes. The present review reports novel structures of *Laurencia* derived sesquiterpenes exclusively in the period of 2015–2020, with emphasis on their structural diversity and different skeleton types including chemical biomarkers along with the methods for their structural analysis. Their cytotoxic, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antidiabetic, anthelmintic activities and others are summarised indicating determined structure – activity relationships along with ecological role of targeted sesquiterpenes. Furthermore, possible stages of sesquiterpene biosynthesis are presented for better understanding of their chemodiversity.

### 1. Introduction

The genus *Laurencia* (Rhodophyta, Ceramiales, and Rhodomelaceae) comprise around 140 species distributed throughout the warm sea waters, particularly from temperate to tropical shores [1]. It has been rich source of unique specialised metabolites with high degree of halogenation, especially bromination, and wide range of the skeleton types [2]. Within more than 60 species investigated, 700 compounds with unique structures have been isolated from this genus [3] with sesquiterpenes as the most abundant terpenes along with diterpenes, triterpenes, steroids, alkaloids and C<sub>15</sub> acetogenins [4]. The comprehensive review of Harisani et al. [5] presents the chemical diversity and the bioactivity of the secondary metabolites isolated from species of the genus *Laurencia* including more than 500 sesquiterpenes, about 100 diterpenes (pargueranes, isopargueranes, and related diterpenes; labdanes, pimaranes, and related diterpenes; irieanes and neoirieanes; dactyloimelanes; obtusanes, 15,14-friedoobtusanes, and related diterpenes; prevezanes and neorgiolanes; miscellaneous diterpenes), about 50 triterpenes (triterpenes possessing 2,7-dioxabicyclo[4.4.0]decane ring system and related metabolites; triterpenes possessing 2,8-dioxabicyclo[5.4.0]undecane ring system; triterpenes possessing symmetry element;

miscellaneous triterpenes), around 240 C<sub>15</sub> acetogenins (acetogenins containing tetrahydrofuran ring and tetrahydropyran ring; acetogenins containing oxepane ring; acetogenins containing oxocane ring; acetogenins containing nine- or ten-membered cyclic ether ring; acetogenins containing twelve-membered cyclic ether ring; linear acetogenins), around 30 indole, 5 aromatic compounds, 15 steroids, and 35 miscellaneous metabolites. Among them, biologically active metabolites have been isolated with anticancer [6,7,8], antidiabetic [9], antibacterial [10], antimalarial [11], anthelmintic [12] and other biological activities. Harisani et al. [5] reported their cytotoxic activity, antibacterial and antifungal activity, antiviral activity, activity against parasites and their vectors, anti-inflammatory activity, miscellaneous biological activities, ecological functions, antifeedant activity and toxicity to marine organisms, brine shrimp toxicity, and antifouling activity. The production of specialized metabolites observed in this genus can be explained in general as an ecological adaptive response to the environmental changes and oscillations. The specific metabolites are produced only by certain *Laurencia* species indicating them as chemical markers. Several reviews provide information about sesquiterpenes found in different macroalgae [13,14,15]. Phytochemical and biological properties of sesquiterpenes isolated from *Laurencia* genus were presented by

\* Corresponding author.

E-mail address: [igor@kft-split.hr](mailto:igor@kft-split.hr) (I. Jerković).

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102330>

Received 6 February 2021; Received in revised form 21 April 2021; Accepted 24 April 2021


Available online 12 May 2021

2211-9264/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## REVIEW



## New trends for macroalgal natural products applications

Ana-Marija Cikoš<sup>a</sup> , Igor Jerković<sup>b</sup>, Maja Molnar<sup>a</sup>, Drago Šubarić<sup>a</sup> and Stela Jokić<sup>a</sup><sup>a</sup>Faculty of Food Technology Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Osijek, Croatia;<sup>b</sup>Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Split, Croatia

## ABSTRACT

There is a significant interest in the usage of algae in everyday diet because of their positive influence on the gastrointestinal system due to the presence of high amounts of dietary fibres, while the presence of  $\omega$ -3 fatty acids contributes to the protection of cardiovascular system. Algal derived polysaccharides are found in the food products as stabilisers, thickening agents and emulsifiers. In the cosmetic industry, algae are used in sunscreen, anti-age, anti-cellulite, moisturising and skin whitening products. These products can be used for the development of cosmeceuticals which contain algal derived bioactive compounds and they can exert a pharmaceutical therapeutic benefit. However, these compounds also have potential for being isolated and used for development of novel drugs against diseases, such as cancer, neurodegenerative disorders, and diabetes. Present review provides information about algal compounds incorporated into various food, cosmetic or medicinal products, as well as their potential for health improvement was evaluated.

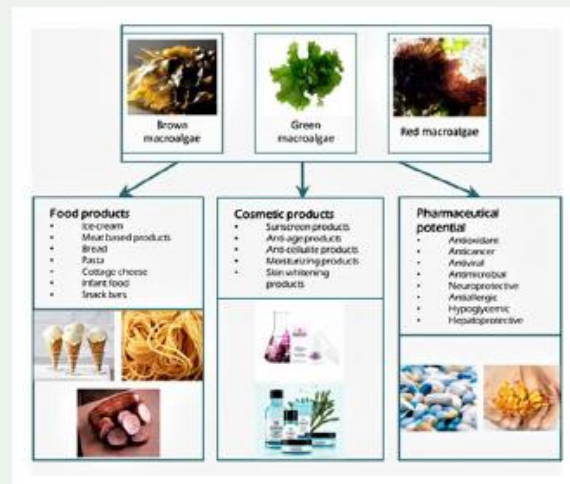
## ARTICLE HISTORY

Received 19 April 2019

Accepted 13 July 2019

## KEYWORDS

Macroalgae; bioactive compounds; polysaccharides; emulsifiers; polyphenols; skin care; drugs

CONTACT Ana-Marija Cikoš  acikos@ptfos.hr
 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1644629>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor &amp; Francis Group