

# Primjena ekstrakcije na čvrstoj fazi u izolaciji pigmenata iz smeđe makroalge *Cystoseira corniculata*

---

Grgić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

*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:109:779561>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-29**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**Kristina Grgić**

**PRIMJENA EKSTRAKCIJE NA ČVRSTOJ FAZI U IZOLACIJI PIGMENATA  
IZ SMEĐE MAKROALGE *Cystoseira corniculata***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje  
**Tema rada** je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022., održanoj 31. ožujka 2022. godine.  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić*  
**Komentor:** doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Ana-Marija Cikoš*

**Primjena ekstrakcije na čvrstoj fazi u izolaciji pigmenta iz smeđe makroalge *Cystoseira corniculata***  
*Kristina Grgić, 0113143046*

#### Sažetak:

Provedena je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) na liofiliziranom uzorku smeđe makroalge *Cystoseira corniculata*. Ekstrakcijom su dobivene četiri frakcije; frakcija 1 (F1) i frakcija 2 (F2) služile su za pročišćavanje analita od interesa – pigmenta, koji su prikupljeni u frakciji 3 (F3) i 4 (F4). Dobivene frakcije F3 i F4 podvrgnute su tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) kako bi se izvršila identifikacija i kvantifikacija pigmenta te su spektrofotometrijski određene koncentracije ukupnih pigmenta. Radi usporedbe rezultata, navedeno je provedeno i na dodatne dvije vrste iz istog roda; *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata*. Kod sve tri vrste makroalgi zabilježen je fukoksantin kao glavni pigment u frakciji F3, a klorofil *a* kao glavni u frakciji F4. Od ukupnih karotenoida, najveću koncentraciju imala je *C. corniculata*, a iznosila je 0,67 mg/g suhog ekstrakta. *G. barbata* je sadržavala najviše klorofila *a*, u koncentraciji od 0,80 mg/g suhog ekstrakta, kao i klorofila *b*: 0,75 mg/g suhog ekstrakta. Za vrstu *C. corniculata* provedena je i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) metoda te je dokazano antioksidacijsko djelovanje s postotkom inhibicije DPPH radikala od 80,18 % u frakciji F3.

**Ključne riječi:** *Cystoseira corniculata*, ekstrakcija na čvrstoj fazi, fukoksantin, ukupni karotenoidi, klorofili

**Rad sadrži:** 43 stranica  
12 slika  
8 tablica  
69 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i>	predsjednik
2. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	član-mentor
3. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>	član-komentor
4. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 7. lipnja 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Food Engineering**  
**Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Course title:** Technological Design

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VI held on March 31, 2022.

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

**Co-mentor:** *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** *Ana-Marija Cikoš*, PhD

### **Application of Solid Phase Extraction in the Isolation of Pigments from Brown Macroalga *Cystoseira corniculata***

*Kristina Grgić, 0113143046*

#### **Summary:**

Solid phase extraction (SPE) was performed on a lyophilized sample of the brown macroalga *Cystoseira corniculata*. Four fractions were obtained by extraction; fraction 1 (F1) and fraction 2 (F2) were used to purify the analytes of interest - pigments, which were collected in fractions 3 (F3) and 4 (F4). The obtained fractions F3 and F4 were subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) in order to identify and quantify the pigments, and the concentrations of total pigments were determined spectrophotometrically. In order to compare the results, the above was also carried out on two additional species from the same genus; *Ericaria crinita* and *Gongolaria barbata*. In all three types of macroalgae, fucoxanthin was recorded as the main pigment in the fraction F3, and chlorophyll *a* as the main pigment in the fraction F4. Of the total carotenoids, *C. corniculata* had the highest concentration, amounting to 0.67 mg/g of dry extract. *G. barbata* contained the most chlorophyll *a*, in a concentration of 0.80 mg/g dry extract, as well as chlorophyll *b*: 0.75 mg/g dry extract. For the species *C. corniculata*, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method was also carried out, and the antioxidant activity was proven with a DPPH radical inhibition percentage of 80.18% in the fraction F3.

**Key words:** *Cystoseira corniculata*, solid phase extraction, fucoxanthin, total carotenoids, chlorophylls

**Thesis contains:** 43 pages  
12 figures  
8 tables  
69 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof.           | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.           | supervisor   |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | co-mentor    |
| 4. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof.    | stand-in     |

**Defense date:** June 7, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić koja mi je svojim znanjem, ukazanim povjerenjem i sugestijama pomogla pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala Vam na empatiji, pristupačnosti i neizmjernim idejama koje su ostavile utjecaj na mene.*

*Također, veliko hvala dr. sc. Ana-Mariji Cikoš na trudu, strpljenju, savjetima i ugodnoj atmosferi tijekom eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno hvala divnim ljudima, prijateljima i kolegama bez kojih studiranje ne bi bilo isto. Hvala vam na podršci i na svim divnim uspomnama.*

*Od srca hvala Borni na pruženoj bezuvjetnoj podršci, pomoći i vjeri u mene.*

*Neizmjernu zahvalnost uvijek ću dugovati svojoj obitelji, braći i sestrama te roditeljima, mami Ružici i tati Stjepanu, koji su mi uvijek bili svaki oblik potpore i nesebično mi omogućili školovanje.*



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

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. MAKROALGE</b> .....	<b>5</b>
2.1.1. Smeđe makroalge .....	6
2.1.2. Crvene makroalge.....	7
2.1.3. Zelene makroalge .....	7
<b>2.2. MAKROALGE RODA <i>CYTOSEIRA</i></b> .....	<b>8</b>
2.2.1. <i>Cystoseira corniculata</i> .....	9
2.2.2. <i>Ericaria crinita</i> .....	10
2.2.3. <i>Gongolaria barbata</i> .....	10
<b>2.3. PIGMENTI U SMEĐIM MAKROALGAMA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4. EKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI (SPE)</b> .....	<b>13</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. MATERIJALI</b> .....	<b>17</b>
3.2.1. Uzorci morskih makroalgi.....	17
3.2.2. Kemikalije.....	18
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>19</b>
3.3.1. Priprema uzorka .....	19
3.3.2. Ekstrakcija pigmenata iz odabranih vrsta makroalgi pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) .....	20
3.3.3. Identifikacija i kvantifikacija pigmenata u dobivenim ekstraktima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	21
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupne koncentracije klorofila a, klorofila b i karotenoida.....	23
3.3.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti.....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1. SASTAV PIGMENATA ODREĐEN POMOĆU HPLC ANALIZE</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2. SASTAV PIGMENATA ODREĐEN SPREKTROFOTOMETRIJSKOM METODOM</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3. ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI</b> .....	<b>32</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>37</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

C.	Cystoseira
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (engl. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> )
E.	Ericaria
GC	plinska kromatografija (engl. <i>gas chromatography</i> )
GC-MS	plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> )
G.	Gongolaria
HD	hidrodestilacija (engl. <i>hydrodistillation</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HPLC-	
ESI-HRMS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa elektrosprej ionizacijskom masenom spektroskopijom visoke rezolucije (engl. <i>high performance liquid chromatography-electrospray ionization-high resolution mass spectrometry</i> )
HS-SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>headspace solid-phase microextraction</i> )
PTFE	politetrafluoroetilen (engl. <i>polytetrafluoroethylene</i> )
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
S	Sargassum
SD	standardna devijacija (engl. <i>standard deviation</i> )
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid-phase extraction</i> )
UV / VIS	ultraljubičasto/vidljivo (engl. <i>ultraviolet-visible</i> )
v/v	volumni udio (engl. <i>volume per volume</i> )
Q-TOF-MS	spektrometrija masa s analizatorom vremena preleta (engl. <i>quadropole time of flight mass spectrometry</i> )



# 1. UVOD

Makroalge su višestanični, vodeni fotosintetski organizmi koji su poznati po raznim biološkim učincima zahvaljujući bogatom sadržaju bioaktivnih spojeva (Barbosa i sur., 2014; Dobrinčić i sur., 2020). Ovi biološki spojevi daju makroalgama širok spektar svojstava kao što su antivirusna, antitumorska, protuupalna i mnoga druga, što daje znanstvenicima sve veću pozornost u istraživanju (Pal i sur., 2014). Makroalge se dijele prema kemijskoj strukturi i prisutnosti specifičnih pigmenata u tri skupine; smeđe (Phaeophyceae), crvene (Rhodophyceae) i zelene (Chlorophyceae) (Dobrinčić i sur., 2020). Svoje bioaktivne spojeve, tzv. sekundarne metabolite, proizvode kao prilagodbu na ekstremne uvijete u kojima često obitavaju. Neki od sekundarnih metabolita koje makroalge proizvode su; pigmenti, vitamini, minerali, fenolni spojevi, polisaharidi, polinezasićene masne kiseline (PUFA), steroli i mnogi drugi spojevi. Zbog navedenih bioaktivnih tvari makroalge imaju potencijalnu primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Barbosa i sur., 2014; Leandro i sur., 2019; Mahadevan, 2015).

Jedni od najvažnijih sekundarnih metabolita koje makroalge proizvode su pigmenti. Osim fotosintetskih i pigmentacijskih učinaka, pokazalo se da imaju brojna biološka svojstva kao što su antioksidativno, neuroprotektivno, citotoksično, antikancerogeno, protuupalno te mnoga druga. Karotenoidi, klorofili i fikobiliproteini glavni su pigmenti koji se nalaze u makroalgama. Crvene makroalge karakterizira najveći sadržaj fikobiliproteina, zelene sadrže najviše koncentracije klorofila, dok su smeđe makroalge poznate po najvećim koncentracijama karotenoida (Cikoš i sur., 2022).

Smeđe makroalge druga su najzastupljenija skupina koju čine oko 2 000 vrsta (Khan i sur., 2009), a za koje je dokazano da posjeduju razna biološka svojstva (Dobrinčić i sur., 2020). Jedan od rodova smeđih makroalgi je i rod *Cystoseira*. Boja ovih makroalgi pripisuje se prisutnosti velike količine karotenoida fukoksantina koji posjeduje različita biološka svojstva, te sve više postaje tema znanstvenih istraživanja (Barbosa i sur., 2014; Cikoš i sur., 2022; Lee, 2008). Osim karotenoida kao pomoćnih pigmenata, smeđe makroalge sadrže i klorofile koji su osjetljivi na svjetlo što može dovesti do nastanka njihovih derivata. Jedan od najzastupljenijih derivata klorofila *a* je feofitin *a*, za kojeg je poznato da je odgovoran za antioksidacijska svojstva makroalgi (Kuczynska i sur., 2015).

Kako bi se prilikom ekstrakcije dobila najveća moguća koncentracija analita od interesa razvijena je metoda ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE). Ova se metoda obično koristi za

koncentraciju i pročišćavanje uzorka prije korištenja neke od kromatografske ili druge metode za kvantificiranje količine analita u uzorku. Opći postupak je propuštanje uzorka kroz kolonu u kojoj se nalazi čvrsti sorbent na kojeg se vežu analiti od interesa. Kasnije se oni uklanjaju s kolone ispiranjem odgovarajućim otapalom te se prikupljaju u epruvetu u obliku frakcija (Mavumengwana-Khanyile i sur., 2019; Zwir-Ferenc i Biziuk, 2006).

Cilj ovog istraživanja bio je izolirati pigmente iz liofiliziranog uzorka smeđe vrste makroalge *Cystoseira corniculata* koristeći ekstrakciju na čvrstoj fazi. Radi usporedbe rezultata, ekstrakcija je provedena na dodatne dvije vrste iz istog roda; *Cystoseira amentacea* i *Cystoseira barbata*. Međutim, prema najnovijim istraživanjima, nazivi ovih vrsta danas su taksonomski prihvaćeni kao *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata* (Radman i sur., 2022a) te će se kao takvi koristiti. U dobivenim ekstraktima, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), provedena je identifikacija i kvantifikacija pigmenata. Spektrofotometrijski su određene koncentracije ukupnih karotenoida, klorofila *a*, i klorofila *b*, a za vrstu *C. corniculata* provedeno je i određivanje antiradikalne aktivnosti.

## 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. MAKROALGE

Makroalge su višestanični makroskopski organizmi. To su eukarioti koji pripadaju carstvima *Plantae* i *Chromista*, a hrane se na autotrofan način (Dobrinčić i sur., 2020; Leandro i sur., 2019). Tijelo makroalga jednostavne je građe. Svrstavaju se u steljnjake (talofite) pa tako sadrže steljku bez jasno razlučenih tkiva i organa, odnosno bez korijena, stabljike i listova (Lee, 2008). Procjenjuje se da postoji preko 10 000 vrsta makroalgi (Mahadevan, 2015). Gotovo su sveprisutne; mogu se pronaći u svakom vlažnom okruženju na kopnu, u slatkoj vodi ili u oceanima (Leandro i sur., 2019). Makroalge su, dakle, vodeni fotosintetski organizmi koji imaju klorofil *a* kao primarni fotosintetski pigment (Dobrinčić i sur., 2020; Lee, 2008). Igraju bitnu ulogu kao proizvođači kisika; dominiraju svjetskim oceanima koja se smatraju "plućima Zemlje" te su tako odgovorni za proizvodnju i do 80 % atmosferskog kisika neophodnog za metabolizam potrošačkih organizama (Cavalier-Smith, 2007; Leandro i sur., 2019; Lee, 2008).

Međutim, makroalge se mogu pronaći i u gotovo svakom drugom okolišu na zemlji, pa tako često nastanjuju promjenjiva ekstremna područja i uvjete, kao što su promjene temperature, salinitet, zagađivači okoliša ili ultraljubičasto zračenje. To je dovelo do toga da većina njih proizvodi različite organske spojeve koji imaju zaštitno djelovanje: tzv. sekundarne metabolite, kao oblik prilagodbe na ekstremne uvjete (Leandro i sur., 2019; Lee, 2008; Stengel i Connan, 2015). U sekundarne metabolite koje makroalge proizvode ubrajaju se; pigmenti, vitamini, minerali, fenolni spojevi, polisaharidi, polinezasićene masne kiseline (PUFA), steroli i drugi spojevi (Leandro i sur., 2019; Mahadevan, 2015).

Brojna istraživanja su pokazala da ti spojevi pokazuju različita biološka djelovanja kao što su antivirusno, antibakterijsko, antikancerogeno, antiupalno djelovanje te mnoga druga (Barbosa i sur., 2014; Leandro i sur., 2019; Torres i sur., 2014). S obzirom na to da sadrže ugljikohidrate, aminokiseline, PUFA, vlakna, polifenole, vitamine te minerale, makroalge također imaju nutritivnu vrijednost, a čija koncentracija ovisi o geografskom položaju, godišnjem dobu, stadiju rasta i dijelu ubrane makroalge (Leandro i sur., 2019; Torres i sur., 2014). Na temelju kemijske strukture i prisutnosti specifičnih pigmenata, makroalge se mogu podijeliti u tri grupe; smeđe (*Phaeophyceae*), crvene (*Rhodophyceae*) i zelene (*Chlorophyceae*) (Dobrinčić i sur., 2020).

### 2.1.1. Smeđe makroalge

Smeđe makroalge druga su najzastupljenija skupina koju čine oko 2 000 vrsta, a najčešće žive na morskim stjenovitim obalama umjerenih zona (Khan i sur., 2009). Smeđe makroalge čine oko 59 % uzgoja ukupnih makroalgi u svijetu i najvažnije su za primjenu u industriji (Wang i sur., 2015). Njihova boja pripisuje se velikoj količini karotenoida fukoksantina, a osim njih, smeđe makroalge sadrže i klorofil *a* i klorofil *c* (Barbosa i sur., 2014; Lee, 2008). Osim pigmenata, smeđe alge bogat su izvor mnogih drugih bioaktivnih molekula, a samo neki od njih su; proteini, aminokiseline, polisaharidi, PUFA, vitamini, minerali, prehrambena vlakna, steroli i polifenoli. Radi širokog spektra bioloških aktivnosti koje posjeduju ovi spojevi (antivirusno, antibakterijsko, antikancerogeno, protuupalno i dr.), ekstrakti smeđih makroalgi daju veliki potencijal za primjenu u liječenju mnogih bolesti (Dobrinčić i sur., 2020).

Polisaharidi smeđih makroalgi predstavljaju značajan biološki potencijal u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, a koji uključuju laminarine, alginat i fukoidane (Dobrinčić i sur., 2020). Najzastupljeniji karotenoid u smeđim makroalgama je fukoksantin. Ovaj karotenoid je pokazao brojne farmakološke učinke poput antioksidativnih, antitumorskih, protuupalnih i drugih (Barbosa i sur., 2014). Od polifenola, najistaknutiji su florotanini, čija koncentracija u ovim makroalgama ovisi o veličini alge, starosti, salinitetu, sezoni, razini hranjivih tvari, intenzitetu svjetlosti i temperaturi vode. Kao i drugi polifenolni spojevi, florotanini pokazuju brojna bioaktivna svojstva (Barbosa i sur., 2014; Leandro i sur., 2019).

Andrade i sur. (2013) analizirali su etanolne ekstrakte 18 vrsta makroalgi; 3 vrste zelenih, 5 vrsta crvenih i 10 vrsta smeđih makroalgi. Koristili su plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom (GC–MS) i dobili najveći sadržaj biološki aktivnih spojeva kod smeđih vrsta, te zaključili da su ove vrste najperspektivnija skupina makroalgi.

Najviše proučavane vrste ovih makroalgi su *Laminaria*, *Ecklonia*, *Undaria*, *Himanthalia* i *Dictyota*, dok najvažnije, ekološki zaštićene vrste Jadranskog mora pripadaju rodu *Cystoseira* (Bruno de Sousa i sur., 2019; Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

### 2.1.2. Crvene makroalge

Ova skupina makroalgi pripada jednoj od najstarijih skupina eukariotskih algi (Lee, 2008). Žive na dubinama od oko 200 m, a njihova veličina ovisi o geografskoj regiji u kojoj se nalaze. Veće vrste crvenih makroalgi nastanjuju se u hladnim i umjerenim područjima, a one manje u tropskim morima (Lee, 2008). Glavni pigmenti u crvenim makroalgama su fikoeritrin i fikocijanin koji prikrivaju ostale pigmente poput klorofila i  $\beta$ -karotena, dajući ovim algama karakterističnu crvenkastu boju (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

U crvenim makroalgama identificirano je više od 1 500 sekundarnih metabolita, te se smatraju najvažnijim izvorom različitih bioaktivnih tvari, u usporedbi s drugim vrstama makroalgi (Kranjac i sur., 2020). Dva najvažnija polisaharida iz crvenih makroalgi su agar i karagenan (Lee, 2008). Agar se dobiva od vrsta *Gelidium* i *Pterocladia* kao i od raznih drugih; *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia* i *Gracilaria*. Agar se sastoji od dva polisaharida; agaroze i agaropektina. Najčešće se koristi u prehrambenoj industriji za želiranje i zgušnjavanje. Također se koristi u farmaceutskoj industriji u vidu laksativa, nosača za ljekovite proizvode ili stabilizatora emulzija, a koristi se i u kozmetičkoj industriji u preparatima za njegu kože. Karagenan ima sličnu uporabu kao agar. Češće se upotrebljava u kozmetici i u farmaceutskim pripravcima, a utvrđeno je i da inhibira replikaciju virusa humane imunodeficijencije (Leandro i sur., 2019; Lee, 2008). Također, ovu skupinu algi karakterizira visok udio proteina (Mahadevan, 2015).

### 2.1.3. Zelene makroalge

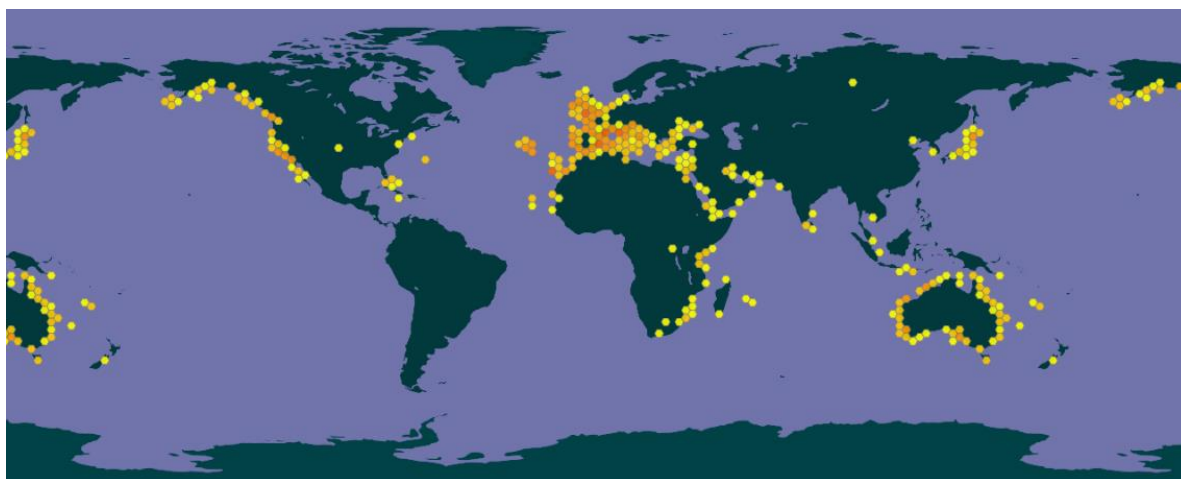
Boja ovih makroalgi posljedica je prisutnosti klorofila *a* i *b*, koji se nalaze u istim omjerima kao kod kopnenih viših biljaka (Barbosa i sur., 2014; Gupta i Abu-Ghannam, 2011). Usprkos svojoj sličnosti s kopnenim biljkama najslabije su istražena skupina algi, te imaju najmanju industrijsku primjenu. Samo oko 10 % zelenih makroalgi su morske, dok je 90 % slatkovodnih (Lee, 2008). Za razliku od smeđih i crvenih makroalgi koje žive u dubljim vodama, zelene alge žive u plićim, u blizini obale, te mogu apsorbirati veću količinu svjetlosne energije (Botić, 2018; Wang i sur., 2015).

Pereira (2018) u svom radu navodi kako ova vrsta ima antioksidativno, antibakterijsko, antitumorsko, protuupalno, antifungalno, antivirusno i antialgalno djelovanje. Zelene makroalge, kao i crvene, sadrže visok sadržaj proteina (Holdt i Kraan, 2011). Najpoznatije

zelene makroalge koje se primjenjuju u prehrambenoj industriji su *Ulva sp.*, *Enteromorpha sp.*, *Monostroma sp.*, *Caulerpa sp.* i *Codium sp.* (Botić, 2018).

## 2.2. MAKROALGE RODA *Cystoseira*

Rod *Cystoseira* pripada porodici Cystoseiraceae, redu Fucales i razredu Phaeophyceae i rasprostranjen je diljem svijeta, a 80 % vrsta rasprostranjeno je duž Mediterana i susjednih obala Atlantika (**Slika 1**) (Amico, 1995).



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

Ovaj smeđi rod makroalgi živi na stjenovitim podlogama obalnog područja, od plitkih voda pa do 100 m dubine, gdje tvori složene zajednice te ima bitnu ulogu u pružanju staništa, hrane i skloništa za razne druge morske organizme. *Cystoseira* (**Slika 2**) je karakterizirana visoko diferenciranim regijama a posjeduje i zračne mjehuriće koje održavaju algu u vertikalnom položaju kada je potopljena. Iako je taksonomija ovog roda još uvijek slabo razjašnjena, zna se da rod *Cystoseira* trenutno obuhvaća približno 40 vrsta. Ekološki je najvažnija vrsta u Sredozemnom i Jadranskom moru. Međutim, tijekom posljednja tri desetljeća došlo je do velike promjene u flori Sredozemnog i Jadranskog mora. Zbog prirodnih i antropogenih poremećaja ekološkog sustava, došlo je do povećanja eutrofikacije i onečišćenja, što je dovelo do smanjenja vrsta roda *Cystoseira*. Tako su neke vrste ovog roda uvrštene među morske obalne indikatore kvalitete okoliša, a većina vrsta Jadranskog mora je endemična, dok su mediteranske vrste ovog roda zaštićene Barcelonskom konvencijom (Amico, 1995; Bruno de Sousa i sur., 2019; Falace i sur., 2005; Rožić i sur., 2012; Tuney-Kizilkaya i Sukatar, 2018).



Istraživanja su pokazala kako vrste ovog roda sadrže brojne bioaktivne tvari kao što su terpenoidi, PUFA, triacilgliceroli, steroidi, florotanini i polisaharidi. Iz tog su razloga vrste ovog roda posjeduju razna bioaktivna djelovanja, a neka od njih su; antioksidativno, antimikrobno, protuupalno, antiproliferativno, antifungalno, antivirusno i antibakterijsko (Bruno de Sousa i sur. 2019; Oucif i sur. 2018). Također, Tuney-Kizilkaya i Sukatar (2018) navode važnost ovih vrsta u farmaceutskoj industriji zbog posjedovanja antifungalnih i antibakterijskih učinaka bioaktivnih spojeva.



Slika 2 Smeđa makroalga *Cystoseira sp.* (WEB 1)

### **2.2.1. *Cystoseira corniculata***

*Cystoseira corniculata* (Turner) Zanardini nastanjuje područja do 70 m dubine a može se pronaći i u obalnim lagunama. Talus joj je smeđe-maslinaste do zeleno-maslinaste boje. Primarne grane su okomite i valjkaste, dok su sekundarne cilindrične ili spljoštene. Ovo je puzava vrsta kod koje su zračni mjehurići odsutni, a grane svih redova su više ili manje gusto prekrivene bodljama (UNEP, 2009).

Rezultati analize koje su proveli Polat i Ozogul (2009) pokazuju da ova vrsta ima visoku nutritivnu vrijednost u smislu proteina, masnih kiselina, te makro- i mikro- elemenata. Sastav masnih kiselina analiziran je pomoću plinske kromatografije (GC), a glavne kiseline koje su pronađene bile su; palmitinska, oleinska, miristoleinska, arahidonska i linolna kiselina. Kao

takva, ova vrsta može se koristiti za poboljšanje nutritivne vrijednosti ljudske ili životinjske hrane. Iz ove vrste također su izolirani razni drugi spojevi kao što su; manitol, alginska kiselina, hlapljiva ulja, vitamini, fenolni spojevi, slobodne aminokiseline i proteini (Güven i Hakyemez, 1976).

### **2.2.2. *Ericaria crinita***

Puni naziv ove vrste koji je, prema najnovijim istraživanjima, taksonomski prihvaćen umjesto *Cystoseira crinita* (Duby) 1830 je; *Ericaria crinita* (Duby) Molinari & Guiry 2020 (Radman i sur., 2022a).

Talus *E. crinita* je velik i bogato razgranat, a tamnosmeđe je boje. Žbunast je, savitljiv i gladak, naraste do 120 cm visine te su prisutni zračni mjehurići. Nastanjuje se na kamenju ili stijenama otvorenih obala, do 10 m dubine, a ponekad i do 30 m (Milchakova, 2011).

Ekstrakti *E. crinita* imaju brojna biološka djelovanja, a neka od njih su antimikrobno, antitumorsko, antivirusno i citotoksično djelovanje (Milchakova, 2011; Pereira, 2018). Glavni bioaktivni spojevi koje su identificirali Radman i sur. (2022a) u svom istraživanju manje molarnih komponenata ove vrste bili su: amidi viših alifatskih kiselina, viši terpeni, steroli i hlapljive tvari, masne kiseline i dr. Za ekstrakciju su koristili ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE), a sastav frakcija liofiliziranog uzorka analiziran je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti – masenom spektrometrijom visoke rezolucije s ionizacijom elektrosprejom.

### **2.2.3. *Gongolaria barbata***

Kao i kod *E. crinita*, talus *G. barbata* je velik, bogato razgranat i tamnosmeđe do svjetlomaslinaste boje. Površina joj je glatka i blago vijugava, a nastanjuje se na kamenju, stijenama ili na velikim školjkama do 20 m dubine, a naraste do 170 cm. Tijekom zime i proljeća, prisutni su i zračni mjehurići koji održavaju algu u vertikalnom položaju kada je potopljena (Milchakova, 2011; Pereira, 2018).

Istraživanja su pokazala da je makroalga *G. barbata* izvor antimikrobnih, antivirusnih, antibakterijskih i antitumorskih biološki aktivnih tvari; sadrži soli alginske kiseline, aminokiseline koje sadrže jod, PUFA, mikro- i makro- elemente (jod, brom, kalij, kalcij, magnezij i dr.). Koristi se kao dodatak prehrani u liječenju onkoloških bolesnika u Ukrajini i Bugarskoj, a primjenu ima i u kozmetičkoj industriji te kao stočna hrana (Milchakova, 2011;

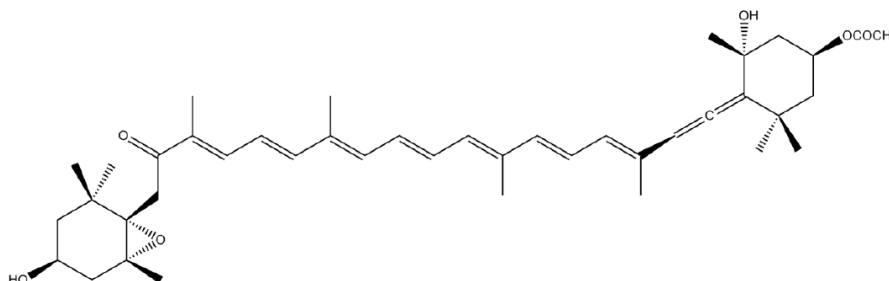
Pereira, 2018). Prema drugoj studiji, metanolni ekstrakti *G. barbata*, pokazali su se učinkoviti u inhibiciji rasta patogenih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Leandro i sur., 2019). Rezultati analize pomoću superkritične vodene ekstrakcije koje su dobili Plaza i sur. (2010) pokazuju antimikrobnu aktivnost polifenola iz *Cystoseira abies-marina*, što ima potencijalnu primjenu u farmaceutskoj industriji.

Nadalje, Radman i sur. (2022b) proveli su istraživanje kemijske raznolikosti i sastava hlapljivih spojeva iz *G. barbata* i *E. crinita*, prikupljenih iz Jadranskog mora. Koristili su dvije metode; mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (HS-SPME) i hidrodestilaciju (HD), nakon čega su uzorci analizirani GC–MS metodom. U istraživanju su koristili svježije, kao i na zraku sušene uzorke ovih makroalgi, o čemu su ovisili rezultati. Osim toga, sastav isparljivih spojeva varirao je i ovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije. Pa tako, primjenom HS-SPME svježeg uzorka *G. barbata*, zabilježeni su seskviterpeni kao glavni spojevi, dok su primjenom HD zabilježeni seskviterpeni kadinanskog tipa. Kod osušenih uzoraka *G. barbata* sadržaj istih spojeva nalazio se u manjim koncentracijama. S druge strane, koristeći HS-SPME svježeg uzorka *E. crinita*, Radman i sur. (2022b) zabilježili su diktiopteren D kao glavni spoj, a primjenom HD (E)-fitol. Kod osušenih uzoraka *E. crinite* koncentracija istih spojeva također se smanjila. Osim toga, glavne zasićene masne kiseline u *G. barbata*, kao i u *E. crinita* bile su; palmitinska, stearinska i miristinska kiselina. Od nezasićenih masnih kiselina, kod obje vrste, pronađeni su izomeri oleinske kiseline te značajne količine arahidonske kiseline, s tim da je *E. crinita* imala veći sadržaj istih.

### **2.3. PIGMENTI U SMEĐIM MAKROALGAMA**

Pigmenti su jedni od najvažnijih sekundarnih metabolita koje makroalge proizvode kako bi se zaštitile od ekstremnih i stresnih uvjeta okoliša. Pigmenti posjeduju različita bioaktivna svojstva; antioksidativno, neuroprotektivno, citotoksično, antikancerogeno, protuupalno te mnoga druga. Osim toga, služe kao fotosintetski i pigmentacijski metaboliti. Zbog navedenog, makroalge imaju široki potencijal za primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Glavni pigmenti u makroalgama su karotenoidi, klorofili i fikobiliproteini. Najveće koncentracije karotenoida nalaze se u smeđim makroalgama, klorofili su najviše zastupljeni u zelenim makroalgama, dok su fikobiliproteini najzastupljeniji u crvenim makroalgama (Cikoš i sur., 2022).

Karotenoidi uključuju dvije skupine; karotene i ksantofile. Fukoksantin je ksantofil s jedinstvenom kemijskom strukturom koja je prikazana na **Slici 3**. Fukoksantin je glavni pigment u smeđim algama, a zbog različitih bioloških svojstva koje posjeduje, smeđe makroalge sve su više tema znanstvenih istraživanja (Cikoš i sur., 2022; Barbosa i sur., 2014).



**Slika 3** Kemijska struktura fukoksantina (Barbosa i sur., 2014)

Ikeda i sur. (2003) pokazali su da je fukoksantin, kojeg su izolirali iz smeđe alge *Undaria pinnatifida*, ublažio oštećenje neuronskih stanica te su tako dokazali neuroprotektivni učinak fukoksantina. Također, Holdt i Kraan (2011) navode prisutnost fukoksantina u smeđoj makroalgi istog roda, koji je pokazao antikarcinogeno i antitumorsko djelovanje. Osim toga, postoje i brojna druga istraživanja koja su dokazala da fukoksantin ima značajne biološke i farmakološke učinke te obećavajuću primjenu za ljudsko zdravlje. Samo neki od njih su; antioksidativni, protuupalni, antiangiogeni, antihipertenzivni učinci, te zaštitni učinci na jetru, krvne žile mozga, kosti, kožu i oči. Također, fukoksantin u prehrani pokazao je antidijabetički učinak kao i učinak sprječavanja pretilosti u vidu inhibicije nakupljanja lipida u citoplazmi (Cikoš i sur., 2022; Barbosa i sur., 2014; Peng i sur., 2011).

Osim fukoksantina, u smeđim makroalgama prisutan je  $\beta$ -karoten. Za ovu vrstu karotenoida, smatra se da funkcioniraju kao vitamini koji imaju različite biokemijske funkcije u tijelu, poput hormona, antioksidansa i regulatora rasta stanica i tkiva. Studije su pokazale da  $\beta$ -karoten može spriječiti pojavu raka, smanjiti rizik od kardiovaskularnih i oftalmoloških bolesti (Holdt i Kraan, 2011, Pal i sur., 2014).

Nadalje, smeđe makroalge sadrže i klorofil *a* i klorofil *c*. Klorofil *a* primarni je pigment odgovoran za fotosintezu, dok klorofil *c* spada pod pomoćne pigmente čija je uloga apsorpcija sunčeve energije te prijenos iste do primarnog klorofila *a*. Spomenuti karotenoidi također imaju ulogu pomoćnih pigmenta, a svi zajedno imaju važnu ulogu u regulaciji fotosinteze, prikupljanju svjetla i zaštiti tijekom jake izloženosti svjetlu (Cikoš i sur., 2022;

Radman i sur., 2022b). Klorofili, osim što su osjetljivi na prejake uvjete svjetlosti, osjetljivi su i na ekstremne pH vrijednosti, kao i na temperaturne promjene, što je dovelo do mogućnosti stvaranja nekoliko derivata, a jedan od njih je feofitin *a*. Zabilježen je antitumageni učinak ovog spoja, te uloga istog u prevenciji raka (Holdt i Kraan., 2011; Ikeda i sur., 2003). **Tablica 1** prikazuje pigmente ekstrahirane iz različitih vrsta smeđih makroalgi te njihovu bioaktivnost.

**Tablica 1** Pregled odabranih znanstvenih istraživanja ekstrakcije pigmenta iz smeđih makroalgi.

Vrsta makroalge	Detektirani pigmenti	Tehnika ekstrakcije	Uvjeti ekstrakcije	Analitička metoda	Bioaktivnost	Literaturna referenca
<i>Sargassum angustifolium</i> , <i>Cystoseira indica</i>	fukoksantin	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	metanol, aceton, metanol/acetone; 1,5, 10 i 15min	UV-Vis spektroskopija, HPLC	Antimikrobna	Oliyaee i Moosavi-Nasab (2021)
<i>Fucus virsoides</i>	fukoksantin, feofitin <i>a</i>	Ekstrakcija na čvrstoj fazi	metanol, MeOH:D CM	HPLC-ESI-HRMS	Antioksidativna, embriotoksična	Jerković i sur. (2021)
<i>Sargassum fusiformis</i>	fukoksantin, feofitin <i>a</i> , klorofil <i>a</i> , $\beta$ -karoten	Ekstrakcija kruto-tekuće	80% metanol, 24h	HPLC, Q-TOF-MS	Antiupalna	Dai i sur. (2021)
<i>Dictyota indica</i> , <i>Padina tenuis</i> , <i>Colpomenia sinuosa</i> , <i>Iyengaria stellata</i>	fukoksantin	Ekstrakcija kruto-tekuće	metanol, 24h, 25°C	HPLC	Antibakterijska, antioksidacijska	Karkhaneh i sur. (2020)
<i>Undaria pinnatifida</i>	fukoksantin	Inkubacija	metanol, 48h	HPLC	Antikancerogena	Wang i sur. (2019)

Ukupan sadržaj pigmenta u makroalgama može varirati u ovisnosti o brojnim čimbenicima. To mogu biti čimbenici okoliša kao što su lokacija ili sezonske promjene, temperatura morske vode, salinitet, kao i vrsta ili faza rasta makroalge. Budući da su različiti pigmenti različite kemijske stabilnosti, topljivosti i polarnosti, bitno je izabrati najučinkovitiju metodu ekstrakcije i odgovarajuće procesne parametre kako bi se dobili što selektivniji ekstrakti pigmenta, sa što većom čistoćom (Cikoš i sur., 2022; Radman i sur., 2022b).

## 2.4. EKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI (SPE)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) metoda je ekstrakcije koja koristi čvrstu i tekuću fazu za izolaciju analita od interesa. Ekstrakcija je brza, lako se izvodi i može se automatizirati, a

postiže se interakcijom sorbenta, analita i otapala. Ova se metoda obično koristi za koncentriranje i pročišćavanje uzorka prije neke kromatografske ili druge metode za kvantificiranje količine analita u uzorku. Princip metode je vezanje analita od interesa na čvrsti sorbent koji se nalazi u koloni kroz koju se propušta uzorak. Analiti od interesa se potom ispiru odgovarajućim otapalom te se tako uklanjaju s kolone i prikupljaju u epruvetu u obliku frakcija (Poole, 2003; Zwir-Ferenc i Biziuk, 2006).

Za SPE se najčešće upotrebljavaju kolone koje mogu biti različitih veličina, s volumenima od 1 mL do 50 mL. Mogu biti plastične ili staklene, a unutar njih se nalazi stacionarna faza - sorpcijski materijal različitog sastava. Postoji niz vrsta stacionarnih faza, a većina ih se temelji na silicijevom dioksidu. Drugi najčešći tip su diskovi promjera 47 mm. Oni se sastoje od membrane debljine 0,5 mm, a sorbent je imobiliziran u mrežu mikrofibrila. Membrane mogu biti od staklene vune ili od politetrafluoroetilena (PTFE) (Poole, 2003; Zwir-Ferenc i Biziuk, 2006).

Postoji širok raspon sorbenata koji se mogu koristiti u SPE. Sorbenti su vrlo porozni, kruti, trodimenzionalni polimerni materijali s velikom površinom. Odabir odgovarajućeg sorbenta ovisi o prirodi analita te o njegovoj interakciji sa sorbentom. Pa tako, prema materijalima adsorbensa koji se nalaze u kolonama, razlikujemo ekstrakciju normalne faze, reverzne faze, i ekstrakciju ionskom izmjenom. Adsorbenti koji se koriste u normalnoj fazi polarne su prirode, dok je mobilna faza nepolarne ili hidrofilne prirode. Tako se ova vrsta koristi za ekstrahiranje polarnih analita jer se polarni uzorci zadržavaju na polarnoj površini adsorbensa. Takvi polarni adsorbensi su npr. vezani silikagel, glinica, silika-srebro, Florisil (sintetski magnezijev silikat) i dr. Kod ekstrakcije reverzne faze koriste se adsorbensi nepolarne ili slabo polarne prirode, kao što su C8, C18, fenilna kolona, itd. Ovdje je mobilna faza polarna tekućina (npr. smjesa vode i metanola, acetonitril), a analit od interesa je nepolaran odnosno hidrofoban, a što je on nepolarniji, to će se duže zadržavati na nepolarnoj površini adsorbensa. Zadnja vrsta ekstrakcije koristi stacionarni sloj koji je suprotnog naboja od iona uzorka. Što je jači naboj na uzorku, jače će biti privučen ionskom površinom i tako se dulje zadržati. Primjer takvog adsorbensa je nabijena ionsko izmjenjivačka smola LC-NH<sub>2</sub> (sadrži silikagel vezan alifatskim kvarternim propilom). Općenito, najčešće korišteni adsorbensi su silicijev dioksid i vezani silicijev dioksid, materijali s aktivnim

ugljenom, te novi ekstrakcijski sorbenti poput različitih nanomaterijala (Mavumengwana-Khanyile i sur., 2019; Poole, 2003; Zwir-Ferenc i Biziuk, 2006).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO



### 3.1. ZADATAK

Osnovni zadatak provedenog istraživanja bio je:

- Ekstrahirati pigmente makroalge *Cystoseira corniculata* koristeći ultrazvučnu ekstrakciju kao predtretman prije SPE te usporediti dobivene rezultate na dodatne dvije vrste iz istog roda (*Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata*);
- Provesti SPE s ciljem odvajanja pigmenata u dvije frakcije;
- Analizirati dobivene frakcije pomoću HPLC metode s ciljem identifikacije i kvantifikacije prisutnih karotenoida i klorofila;
- Odrediti sadržaj ukupnih koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida pomoću spektrofotometrijske metode;
- U dobivenim ekstraktima uzorka *Cystoseira corniculata* odrediti antiradikalnu aktivnost DPPH metodom pomoću spektrofotometra;
- Na osnovi dobivenih podataka usporediti sličnosti i razlike u kemijskom sastavu različitih morskih makroalgi koje su korištene tijekom izrade rada.

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Uzorci morskih makroalgi

*Cystoseira corniculata* (Turner) Zanardini 1841 (**Slika 4**), izronjena je u uvali Luka, Dugi otok (43°58'54"N; 15°05'37"E) u srpnju 2021. godine na dubini od 8 m, temperaturi mora 24°C, temperaturi zraka 27°C;



**Slika 4** *Cystoseira corniculata* (WEB 2)

*Ericaria crinita* (ex. *Cystoseira amentacea*) (Duby) Molinari & Guiry 2020 (**Slika 5**), izronjena je u Novigradskom moru (44°12'02"N; 15°28'51"E) u studenom 2020. godine na dubini od 2 m, temperaturi mora 14°C, temperaturi zraka 18°C;



**Slika 5** *Ericaria crinita* (Izvor: ronilac Donat Petricioli)

*Gongolaria barbata* (ex. *Cystoseira barbata*) (Stackhouse) Kuntze 1891 (**Slika 6**), izronjena je kod Zadra (Šepurine, 44°12'42"N; 15°09'23"E) u ožujku 2021. godine na dubini od 4-6 m, temperaturi mora 13°C, temperaturi zraka 14°C.



**Slika 6** *Gongolaria barbata* (Izvor: ronilac Donat Petricioli)

### 3.2.2. Kemikalije

Za SPE korištena je ultračista voda te metanol i diklormetan HPLC čistoće (J. T. Baker, Milano, Italija). C18 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 pripremu uzoraka za HPLC analizu frakcija dobivenih pomoću SPE te kao mobilne faze tijekom HPLC analize korišteni su metanol, izopropanol HPLC čistoće (J. T. Baker, Milano, Italija) i ultračista voda.

HPLC standardi klorofil *a* (čistoće  $\geq 95$  %) i fukoksantin (čistoće  $\geq 97$  %) kupljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, SAD).

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih koncentracija pigmenata korišten je metanol HPLC čistoće (J. T. Baker, Milano, Italija).

Za određivanje antiradikalne aktivnosti korišten je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (TCI, Japan), metanol visoke čistoće (J.T. Baker, Poljska).

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Priprema uzorka**

U istraživačkom dijelu rada korišteni su uzorci tri vrste smeđih makroalgi koje su izronjene iz Jadranskog mora, te su potom, zajedno s morskom okolnom vodom, stavljene u nepropusne plastične vrećice i odmah transportirane u laboratorij.

Uzorci makroalgi prvo su isprani tri puta u demineraliziranoj vodi, zatim su izrezani na manje komadiće, te su nakon toga zamrznuti na  $-20$  °C tijekom 24 h. Makroalge su potom podvrgnute liofilizaciji kako bi njihov kemijski sastav ostao nenarušen. Postupak liofilizacije prethodno smrznutih uzoraka alge proveden je na laboratorijskom liofilizatoru (Martin Christ, Alpha 2–4 LSCplus, Osterode am Harz, Njemačka). Plitice sa zamrznutim uzorcima stavljene su u liofilizator te je postupak proveden tijekom 96 h pod visokim vakuumom (0,5–1,81 hPa). Primarna temperatura sušenja bila je  $-20$  °C, a sekundarna temperatura  $20$  °C. Liofilizirani uzorci su potom usitnjeni pomoću laboratorijskog mlina (MRC Sample mill C-SM/450-C, Holon, Izrael) i kao takvi korišteni za određivanje sadržaja pigmenata.

### 3.3.2. Ekstrakcija pigmenta iz odabranih vrsta makroalgi pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE)

Kao predtretman prije ekstrakcije na čvrstoj fazi, provedena je ekstrakcija na ultrazvučnoj kupelji (Elma, Elmasonic P 70 H, 37 kHz/50 W, Singen, Njemačka) na liofiliziranim uzorcima makroalgi. Ekstrakcija je provedena na temperaturi od 30 °C, 30 minuta, s omjerom tekuće:kruto 10 mL/g, a smjesa otapala koja je korištena bila je metanol:diklormetan (1:1, v/v). Nakon toga, svi uzorci su profiltrirani kroz filter papir (**Slika 7**) u tikvicu s okruglim dnom koja je podvrgnuta uparavanju na rotavaporu (Lab Tech E400vac) kako bi se uklonilo otapalo.

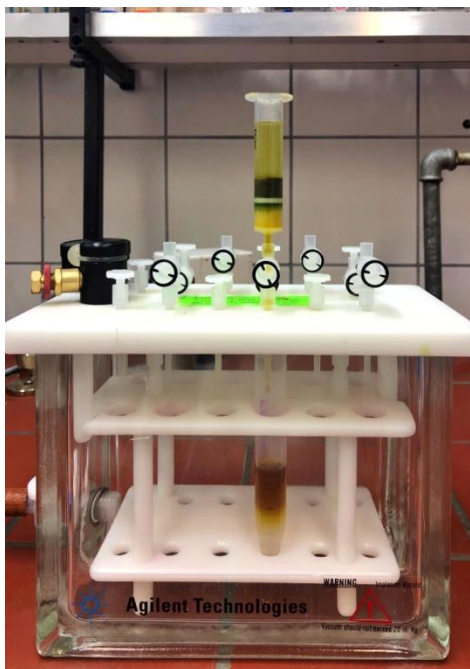


**Slika 7** Filtracija uzorka (Izvor: autor)

Zbog veće hlapivosti, prvo se uklonio diklormetan, a zatim metanol. Uzorci su potom premješteni u epruvete za uparavanje dušikom, prethodno pomiješani sa C18 prahom (Macherey-Nagel Polygoprep 60-50, C18, 40–63  $\mu\text{m}$ ), kako bi se u potpunosti uklonio zaostali metanol. Korištena SPE kolona (C18, 1 g, 6 mL, 40  $\mu\text{m}$ ; Agilent Bond Elut, Waldbronn, Njemačka) je prije ekstrakcije kondicionirana s 12 mL metanola i 12 mL vode, a nakon toga je suhi ekstrakt zajedno sa C18 prahom prenesen na kolonu. Uzorak je eluiran pomoću 12 mL otapala različite polarosti: 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 8**).

Dobivene su četiri frakcije od kojih su u F1 i F2 eluirani polarni spojevi, što je dovelo do boljeg pročišćavanja i dobivanja veće koncentracije spojeva od interesa, odnosno pigmenta. Otapalo iz F3 i F4 uklonjeno je pomoću SpeedVac-a (SPD1030, Thermo Scientific, Waltham,

MA, SAD) te su frakcije pohranjene na 4 °C do HPLC analize. Postupak je proveden u tri ponavljanja za svaku pojedinu makroalgu.



**Slika 8** Sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Izvor: autor)

### **3.3.3. Identifikacija i kvantifikacija pigmenta u dobivenim ekstraktima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)**

Za identifikaciju i kvantifikaciju klorofila i karotenoida dobivenih pomoću SPE korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Ovaj sustav opremljen je kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), uređajem za automatsko injektiranje (G7129A), detektorom s nizom dioda (PDA detektor, G7115A) i sakupljačem frakcija (G1364E) (**Slika 9**). Računalni program ChemStation služi za upravljanje ovim procesom kao i za obradu podataka.





**Slika 9** HPLC sustav korišten za identifikaciju i kvantifikaciju pigmentata u ekstraktima makroalgi (Izvor: autor)

Korištena metoda kromatografskog razdvajanja modifikacija je metode iz znanstvenog rada Castro-Puyana i sur. (2017). Za razdvajanje je korištena kolona YMC-C30 (YMC Europe, Schernbeck, Njemačka), duljine 250 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 5  $\mu\text{m}$ . Korištene su dvije faze; A mobilna faza - smjesa otapala metanol:izopropanol:voda (90:7:3, v/v/v), i B mobilna faza - smjesa metanol:izopropanol (10:90, v/v). Gradijent ovih faza bio je: 0 % B do 50 min, 100 % B do 60 min, postrun 0 % B 5 min. Protok je iznosio 0–50 min, 0,6 mL/min i 50–60 min, 0,8 mL/min, kao i postrun, volumen injektiranja bio je 30  $\mu\text{L}$ , a pigmenti su detektirani na 450 i 660 nm (pomoću PDA detektora snimljeni su spektri od 350 do 660 nm).

Provedena je identifikacija i kvantifikacija karotenoida i klorofila. Identifikacija je provedena usporedbom vremena zadržavanja i spektara dobivenih pikova sa standardima pigmentata, a kvantifikacija pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja. Standardne kalibracijske krivulje za klorofil *a* (linearnost  $R^2=0,99934$ ) i fukoksantin (linearnost  $R^2=0,99967$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$  s odgovarajućim razrjeđivanjem matične otopine. Potom su uzorci ekstrakata razrijeđeni u smjesi otapala

metanol:izopropanol:voda (90:7:3, v/v/v) do koncentracije 20 mg/mL, te su profiltrirani kroz 0,20  $\mu\text{m}$  PTFE filtere, nakon čega je slijedila HPLC analiza.

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

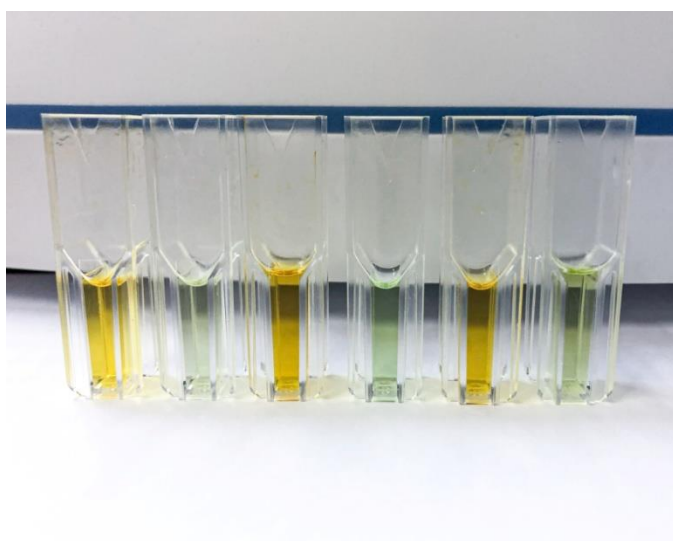
Spektrofotometrijska mjerenja provedena su na UV/VIS spektrofotometru Boeco S-220 (Hamburg, Njemačka). Dobivene SPE frakcije F3 i F4 uparene su na SpeedVac-u te razrijeđene u metanolu na koncentraciju 10 mg/mL. Razrijeđeni uzorci profiltrirani su direktno u kivetu za spektrofotometrijsko određivanje pigmentata (**Slika 10**), a korišteni su PTFE filteri s porama veličine 0,20  $\mu\text{m}$ .

Apsorbancije su izmjerene pri 665,2 nm; 652,4 nm i pri 470 nm jer te valne duljine predstavljaju maksimalnu apsorbanciju klorofila *a*; klorofila *b*, odnosno karotenoida. Svako mjerenje provedeno je u tri ponavljanja. Ukupna koncentracija klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida, izražena kao mg/g suhog ekstrakta, izračunata je prema sljedećim jednadžbama koje su preuzete iz rada Lichtenthaler i Buschmann (2001):

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

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

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



**Slika 10** SPE ekstrakti makroalge *C. corniculata* u kivetama za spektrofotometrijsko mjerenje (Izvor: autor)

### 3.3.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalna aktivnost dobivenih ekstrakata određena je DPPH metodom detaljno opisanoj u radu Jakobek i sur. (2007), a koja se temelji na sposobnosti antioksidativnih tvari u ekstraktu da hvataju slobodne radikale. Kao stabilni, slobodni radikal koristi se 2,2-difenil-1-pirkrilhidrazila koji je tamno ljubičaste boje. U 1,2 mL ekstrakta, koncentracije 50 mg/mL dodano je 0,5 mL svježije pripremljene otopine DPPH, koncentracije 0,2 mM. Nakon 30 minuta stajanja uzorka u mraku, izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm u tri ponavljanja. Određivanje je provedeno u tri ponavljanja za svaku makroalgu i izraženo je kao % aktivnosti vezanja (% DPPH). Moć hvatanja radikala izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH nakon dodatka otopine uzorka i apsorbancije otopine DPPH kojoj nije dodana otopina uzorka, prema jednadžbi (4):

$$\% DPPH = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (4)$$

gdje  $A_{DPPH}$  predstavlja kontrolu apsorbancije pripremljene otopine DPPH (umjesto uzorka dodan je metanol),  $A_b$  apsorbanciju slijepe probe (umjesto DPPH dodan je metanol), a  $A_s$  apsorbanciju uzorka pomiješanog s DPPH otopinom.

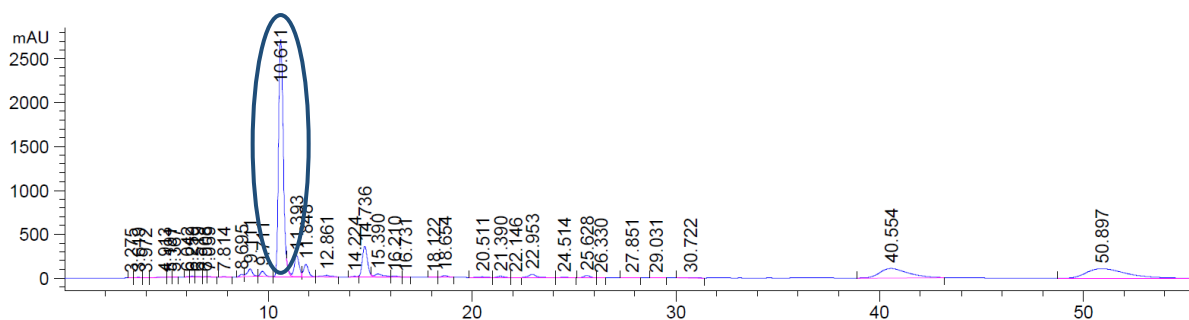


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

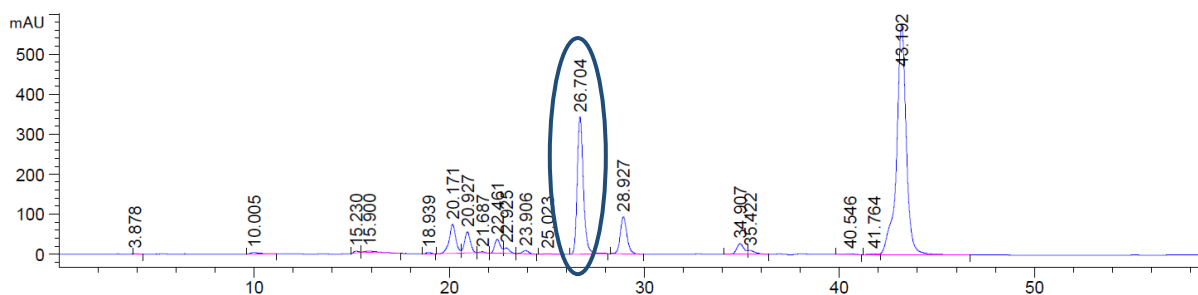
#### 4.1. SASTAV PIGMENATA ODREĐEN POMOĆU HPLC ANALIZE

Primjenom HPLC metode provedena je separacija, identifikacija i kvantifikacija pigmenata dobivenih pomoću SPE, na tri vrste makroalgi; *Cystoseira corniculata*, *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata*.

HPLC analiza prvo je uključivala identifikaciju pigmenata u F3 i F4. Na **Slici 11** vidljivi su dobiveni pikovi kromatograma u F3 alge *C. corniculata*. Broj koji piše na skoku pika je minuta u kojoj se pik pojavio, što znači da x-os prikazuje minute, a y-os označava jedinicu za apsorbanciju (mAU). Minuta u kojoj se pik pojavio, odnosno retencijsko vrijeme, karakteristično je za određenu komponentu (Džambić, 2019). Identifikacija je provedena usporedbom vremena zadržavanja i spektara dobivenih pikova sa standardima pigmenata. Identificirani spoj predstavlja fukoksantin. U F4 alge *C. corniculata*, istom metodom identificiran je klorofil *a*, što je prikazano na **Slici 12**.



**Slika 11** Kromatogram fukoksantina dobiven pomoću HPLC u frakciji F3 alge *C. corniculata*



**Slika 12** Kromatogram klorofila *a* dobiven pomoću HPLC u frakciji F4 alge *C. corniculata*

Također, istom je metodom identificiran fukoksantin u F3 i klorofil *a* u F4 kod *E. crinita* i *G. barbata*. Nakon što su spojevi identificirani, utvrđeno je koliko je pojedinog spoja prisutno u uzorku. Kvantifikacija za sve tri vrste makroalgi određena je pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 2, 3, i 4**.

Tablica 2 Koncentracija pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *C. corniculata*

UZORAK	FUKOKSANTIN (mg/g suhog ekstrakta) SV ± SD	KLOROFIL a (mg/g suhog ekstrakta) SV ± SD
FRAKCIJA 3	9,49 ± 2,58	n.d.
FRAKCIJA 4	n.d.	3,52 ± 1,41

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

Tablica 3 Koncentracija pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *E. crinita* (ex. *C. amentacea*)

UZORAK	FUKOKSANTIN (mg/g suhog ekstrakta) SV ± SD	KLOROFIL a (mg/g suhog ekstrakta) SV ± SD
FRAKCIJA 3	12,62 ± 1,14	n.d.
FRAKCIJA 4	n.d.	1,14 ± 0,18

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

Tablica 4 Koncentracija pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *G. barbata* (ex. *C. barbata*)

UZORAK	FUKOKSANTIN (mg/g suhog ekstrakta) SV ± SD	KLOROFIL a (mg/g suhog ekstrakta) SV ± SD
FRAKCIJA 3	4,08 ± 0,06	n.d.
FRAKCIJA 4	n.d.	0,83 ± 0,13

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

Kod *C. corniculata* u F3 određen je polarniji pigment fukoksantin u koncentraciji od 9,49 mg/g suhe frakcije, dok klorofil *a* nije detektiran. Međutim, klorofil *a* utvrđen je u F4 gdje je korištena manje polarna smjesa otapala metanol:diklormetan u koncentraciji od 3,52 mg/g suhe frakcije, najviše u usporedbi s druge dvije vrste. Između ova dva otapala, metanol se pokazao kao bolje otapalo za ekstrakciju fukoksantina. Istraživajući makroalgu istog roda, Oliyaei i sur. (2021) također su pokazali najbolju učinkovitost metanola za ekstrakciju fukoksantina u usporedbi s drugim otapalima. S obzirom na razlike u polarnosti pojedinih vrsta pigmenata, očekuje se da na njihov sadržaj utječe primijenjeno otapalo. U istraživanju koje su proveli Pardilhó i sur. (2021) u kojem su, koristeći šest različitih otapala, ekstrahirali pigmente iz biomase smeđe morske alge *Saccorhiza polyschides*, najboljim se otapalom pokazao aceton, a metanol je bio na drugom mjestu. Sartory i Grobbelaar (1984) su dobili suprotne rezultate; 95 %-tni etanol i metanol bili su učinkovitiji u usporedbi s 90 %-tnim

acetonom. S druge strane, Cvitković i sur. (2021) su za ekstrakciju klorofila dokazali bolju učinkovitost etil acetat:etanol (1:1, v/v) u usporedbi s heksanom.

Glavni pigment u F3 kod *E. crinita* i *G. barbata* također je bio fukoksantin, te u F4 klorofil *a*. Vidljivo je da sadržaj fukoksantina u F3 u uzorku *E. crinita* iznosi 12,62 mg/g suhe frakcije, ujedno najviše u usporedbi s druge dvije vrste. Zabilježeni sadržaj klorofila *a* u F4 iznosi 1,14 mg/g suhe frakcije. Kod *G. barbata* zabilježena je najmanja koncentracija fukoksantina u F3: 4,08 mg/g suhe frakcije, te najmanja koncentracija klorofila *a*: 0,83 mg/g suhe frakcije. Općenito, kod sve tri vrste makroalgi koncentracija fukoksantina dominira nad koncentracijom klorofila *a*. Takvi rezultati su očekivani s obzirom na činjenicu da je fukoksantin glavni pigment u smeđim algama odgovoran za njihovu boju (Barbosa i sur., 2014). Identifikacija klorofila *a* također je realna jer su Yalçın i sur. (2021) otkrili da je to glavni pigment nakon fukoksantina u većini ispitanih smeđih makroalgi. Ovi pigmenti također su zabilježeni i u drugim smeđim morskim algama (Peng i sur., 2011; Pardilhó i sur., 2021), a osim njih, Dai i sur. (2021) identificirali su feofitin *a* i  $\beta$ -karoten istražujući smeđu makroalgu *Sargassum fusiformis*. Usporedbom sadržaja fukoksantina uzoraka *C. corniculata*, *E. crinita* i *G. barbata* vidljivo je da *E. crinita* sadrži najveću koncentraciju fukoksantina, dok *C. corniculata* sadrži najveću koncentraciju klorofila *a*.

Vidljive su značajne razlike između dobivenih koncentracija i onima u dostupnoj literaturi. Oliyaei i sur. (2021) proveli su ekstrakciju fukoksantina uz pomoć ultrazvuka iz smeđih makroalgi *S. angustifolium* i *C. indica*. Među raznim otapalima, metanolni ekstrakt *C. indica* i metanol/acetonski ekstrakt *S. angustifolium* bili su najučinkovitiji u ekstrakciji fukoksantina, a dobiveni su sljedeći rezultati; 0,77 mg/g za *C. indica* i 0,70 mg/g za *S. angustifolium*. Lim i sur. (2018) su u metanolnom ekstraktu *S. siliquosum* i *S. polycystum* kvantificirali fukoksantin i dobili koncentracije od 0,71 mg/g i 0,52 mg/g. Terasaki i sur. (2009) su pak utvrdili koncentracije od 3,70 mg/g za *S. horneri* i 2,40 mg/g za *C. hakodatensis*. Susanto i sur. (2016) dobili su sličnu koncentraciju fukoksantina za *C. Hakodatensis*: 2.01 mg/g, dok su Ryabushko i sur. (2014) za *G. barbata* dobili rezultat najbliži ovom istraživanju: 3.00 mg/g. Općenito, sastav pigmenta u makroalgama može varirati ovisno o mnogobrojnim čimbenicima: vrsti alge, fazi rasta i čimbenicima okoliša kao što su lokacija, sezonske promjene, temperatura morske vode, salinitet i dr. (Lalegerie i sur., 2020).

Nadalje, ispravna prilagodba parametara kao što su organsko otapalo, omjer otapalo:krutina, temperatura, pH i vrijeme ekstrakcije, uvelike utječe na prinos i sastav karotenoida (Cheng i sur., 2020). U istraživanju provedenom od strane Lim i sur. (2018) primijećeno je da na sadržaj fukoksantina utjecaj imaju i procesni parametri ekstrakcije. Otkriveno je da duže vrijeme ekstrakcije i viša temperatura poboljšavaju ekstrakciju fukoksantina, dok veći omjer otapalo:krutina nema utjecaj na ekstrakciju. Kim (2014) je izvijestio da se viši sadržaj fukoksantina može ekstrahirati kada je temperatura ekstrakcije između 30 °C i 40 °C, što je u skladu s ovim istraživanjem. S druge strane, visoka temperatura može dovesti do degradacije fukoksantina stoga je potrebno primijeniti temperaturu ispod 70 °C (Kanda i sur., 2014). Osim parametara procesa, postoje mnogi drugi čimbenici koji utječu na sadržaj fukoksantina. Heffernan i sur. (2016) izvijestili su da su zimski i proljetni uzorci smeđe makroalge *Laminaria digitata* sadržavali veći sadržaj fukoksantina u usporedbi s ljetnim i jesenskim razdobljima. Li i sur. (2019) otkrili su da temperatura i salinitet imaju značajan utjecaj na sadržaj fukoksantina u *S. fusiforme*. U navedenom istraživanju, optimalni uvjeti za ekstrakciju 2,62 mg/g fukoksantina bili su uvjeti niske slanosti i temperatura morske vode od 10 °C do 15 °C.

#### 4.2. SASTAV PIGMENATA ODREĐEN SPEKTROFOTOMETRIJSKOM METODOM

Spektrofotometrijskom analizom uzoraka makroalgi *Cystoseira corniculata*, *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata* utvrđene su koncentracije ukupnih klorofila i karotenoida u frakcijama F3 i F4 (Tablica 5, 6 i 7).

Tablica 5 Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *C. corniculata*

	FRAKCIJA 3		FRAKCIJA 4	
	SV	SD	SV	SD
	mg/g suhog ekstrakta			
<b>Klorofil a</b>	0,05	0,01	0,28	0,09
<b>Klorofil b</b>	0,15	0,01	0,02	0,01
<b>Ukupni karotenoidi</b>	0,67	0,09	0,03	0,02

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

Tablica 6 Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *E. crinita* (ex. *C. amentacea*)

	FRAKCIJA 3		FRAKCIJA 4	
	SV	SD	SV	SD
	mg/g suhog ekstrakta			
<b>Klorofil a</b>	0,08	0,01	0,55	0,06
<b>Klorofil b</b>	0,27	0,04	0,75	0,24
<b>Ukupni karotenoidi</b>	0,34	0,09	0,18	0,06

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

Tablica 7 Koncentracija ukupnih pigmenata dobivenih u frakcijama F3 i F4 pomoću SPE iz makroalge *G. barbata* (ex. *C. barbata*)

	FRAKCIJA 3		FRAKCIJA 4	
	SV	SD	SV	SD
	mg/g suhog ekstrakta			
<b>Klorofil a</b>	0,04	0,01	0,80	0,26
<b>Klorofil b</b>	0,08	0,01	0,74	0,03
<b>Ukupni karotenoidi</b>	0,28	0,04	0,16	0,01

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

Općenito, kod svih uzoraka makroalgi, koncentracija ukupnih karotenoida u F3 dominira nad koncentracijom u F4. Takav rezultat se može povezati s koncentracijama fukoksantina koje su zabilježene tijekom određivanja sastava pigmenata pomoću HPLC analize, kada su u F3 zabilježene veće koncentracije fukoksantina u usporedbi s frakcijom F4.

Frakcija F3 uzorka *C. corniculata* sadržavala je 0,67 mg/g suhog ekstrakta ukupnih karotenoida, dok je frakcija F4 sadržavala svega 0,03 mg/g suhog ekstrakta. Frakcija F3 uzorka *E. crinita* sadržavala je 0,34 mg/g suhog ekstrakta ukupnih karotenoida, a frakcija F4 0,18 mg/g suhog ekstrakta. U frakciji F3 uzorka *G. barbata* zabilježeno je najmanje ukupnih karotenoida, shodno rezultatima HPLC analize: 0,28 mg/g suhog ekstrakta, a u frakciji F4 0,16 mg/g suhog ekstrakta. Za razliku od HPLC analize gdje je pronađeno najviše fukoksantina (u frakciji F3) kod *E. crinita*, u spektrofotometrijskoj analizi je najveća koncentracija ukupnih karotenoida zabilježena kod *C. corniculata*.

Nadalje, isti trend rezultata zabilježen je i s koncentracijom klorofila *a*; kod svih vrsta ona je iznosila više u F4 nego u F3. Kada se usporede rezultati sve tri vrste makroalgi, frakcija F4 uzorka *C. corniculata* sadržavala je najmanje klorofila *a* (0,28 mg/g suhe frakcije), a *G. barbata* najviše: 0,80 mg/g suhe frakcije, dok je *E. crinita* sadržavala 0,55 mg/g suhe frakcije. U frakciji F3 zabilježene su vrlo niske vrijednosti klorofila *a*: kod *C. corniculata* 0,05 mg/g

suhe frakcije, *E. crinita* 0,08 mg/g suhe frakcije i *G. barbata* 0,04 mg/g suhe frakcije. Klorofil *b* bio je prisutan u niskim koncentracijama; *C. corniculata*: 0,15 mg/g suhe frakcije za F3 i 0,02 mg/g suhe frakcije za F4; *E. crinita*: 0,27 mg/g suhe frakcije za F3 i 0,75 mg/g suhe frakcije za F4, *G. barbata*: 0,08 mg/g suhe frakcije za F3 i 0,74 mg/g suhe frakcije za F4.

Mogu se primijetiti razlike u rezultatima sadržaja pigmenata između ovog istraživanja i istraživanja koje su proveli Cvitković i sur. (2021). Koristeći tekuću ekstrakciju pod tlakom na 100 °C s otapalom etil acetat:etanol (1:1, v/v), iz etanolne frakcije spektrofotometrijski su odredili; srednju vrijednost koncentracije klorofila *a* od 0.299 mg/g; srednju vrijednost koncentracije klorofila *b* od 0.048 mg/g i srednju vrijednost koncentracije ukupnih karotenoida od 0.148 mg/g za *G. barbata*. Za *C. compressa* dobili su sljedeće srednje vrijednosti; 1.073 mg/g klorofila *a*, 0.133 mg/g klorofila *b* i 0.443 mg/g ukupnih karotenoida. Autori su zaključili da su ispitivane makroalge dobar izvor pigmenata te da predstavljaju veliki potencijal za proizvodnju različitih prehrambenih i farmaceutskih proizvoda, pogotovo smeđa makroalga *Fucus virsoides* koja je imala najveći udio klorofila *a*; 2.089 mg/g i 0.565 mg/g ukupnih karotenoida.

Ozgun i Turan (2015) su u svom istraživanju odredili sastav pigmenata osam smeđih vrsta makroalgi, između kojih su *G. barbata* i *C. corniculata* kao i *C. compressa*. Ekstrakcija pigmenata je provedena upotrebom metanola. Određeni sadržaj klorofila *a* bio je u rasponu od 0,839 mg/g do 4,09 mg/g dok je sadržaj karotenoida bio u rasponu od 0,111 mg/g do 0,610 mg/g. Jedino se za *G. barbata* mogu primijetiti relativne sličnosti u rezultatima budući da je sadržavala 1,056 mg/g klorofila *a* i 0,180 mg/g ukupnih karotenoida. Kod *C. corniculata* je udio klorofila *a* bio veći: 0,839 mg/g, dok je udio karotenoida bio manji: 0,154 mg/g. Kod *C. compressa* je udio klorofila *a* iznosio 1,297 mg/g a udio karotenoida 0,234 mg/g, slično koncentracijama za *G. Barbata* dobivenih u sklopu ovog istraživanja. Prema rezultatima dobivenim ovim istraživanjem, autori su zaključili da se ispitivane vrste makroalgi, pogotovo smeđa makroalga *Styopodium schimperii* za koju su dobili koncentraciju ukupnih klorofila *a* od čak 4,09 mg/g, mogu smatrati potencijalnim izvorom za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju.

Općenito, veće koncentracije klorofila *a* u odnosu na klorofil *b* mogu se objasniti time da smeđe makroalge sadrže klorofil *a* i njegove derivate, dok je klorofil *b* pomoćni fotosintetski pigment koji skuplja svjetlost i prenosi svjetlosnu energiju do klorofila *a* (Lee i sur., 2008). S

druge strane, slučajevi kada je veća koncentracija klorofila *b* u odnosu na klorofil *a*, mogu se objasniti time da zbog različitih čimbenika mogu nastati derivati klorofila *a* koji posljedično ometaju određivanje klorofila u uzorku. Jedan od čimbenika može biti kiselost metanola korišten u ekstrakciji, a čiji problem se može izbjeći neutralizacijom otapala (Cikoš i sur., 2022). Glavni derivat klorofila *a* koji je prisutan u značajnim količinama u makroalgama je feofitin *a* (Kuczynska i sur., 2015). Indrawati i sur. (2015) su primijetili da se stvaranjem feofitina *a* povećava antiradikalna aktivnost ekstrakata dobivenih iz smeđe alge roda *Sargassum*. Osim antiradikalnog djelovanja feofitina *a*, dokazana su i mnoga druga: antiupalna, embriotoksična, antimutagena, antikarcinogena (Dai i sur., 2021; Jerković i sur., 2021; Holdt i Kraan., 2011; Ikeda i sur., 2003).

### 4.3. ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI

Postotak inhibicije DPPH radikala frakcija F3 i F4 eksperimentalno je proveden samo na makroalgi *Cystoseira corniculata* (Tablica 8).

Tablica 8 Postotak inhibicije DPPH radikala frakcija F3 i F4 makroalge *C. corniculata*

UZORAK	% DPPH
FRAKCIJA 3	80,18 ± 14,31
FRAKCIJA 4	22,47 ± 9,86

Vidljivo je da je postotak inhibicije u frakciji F3 za *C. corniculata* vrlo visok, iznosi 80,18 %. U frakciji F4 zabilježen je manji postotak od 22,47 %. Ovi rezultati mogu se objasniti time što je u frakciji F3 ekstrahiran fukoksantin za kojeg je već dokazano da ima antioksidacijska svojstva, kao i mnoga druga. Ovi rezultati mogu se povezati s rezultatima istraživanja provedenog od strane autora Jerković i sur. (2021). Pomoću iste metode, ispitivao se antioksidativni potencijal smeđe makroalge *Fucus virsoides*. U odnosu na diklormetansku frakciju F4, veću antioksidativnu aktivnost također je pokazala metanolna frakcija F3 pripremljena na isti način kao i unutar ovog istraživanja. Kao jedan od mogućih razloga tome autori su istaknuli veću koncentracija fukoksantina u frakciji F3, te zaključili da je uglavnom on odgovoran za promatrana antioksidacijska svojstva. Nadalje, ovakav uzorak rezultata pronašli su i Radman i sur. (2022a), koji su koristeći istu metodu, zabilježili postotak inhibicije kod *Ericaria amentacea* u frakciji F3 od 70 %, dok je za F4 taj postotak bio 10 %.



U usporedbi s crvenim i zelenim algama, smeđe se alge odlikuju većim antioksidativnim potencijalom te dobivaju više pozornosti u znanstvenim istraživanjima zbog svog bogatstva fukoksantinom. Osim antioksidativnog svojstva fukoksantin posjeduje i mnoga druga snažna djelovanja; inhibitorno djelovanje na  $\alpha$ -amilazu, neuroprotektivno, antitumorsko, protuupalno, citotoksično i antihipertenzivno djelovanje (Barbosa i sur., 2014, Cikoš i sur., 2022, Ghaliaoui i sur., 2020). Antioksidacijsko djelovanje fukoksantina povezano je s njegovom molekularnom strukturom. Naime, prisutnost alenske veze, broj dvostrukih veza i prisutnost funkcionalnih skupina utječu na interakciju s različitim radikalima (Barbosa i sur., 2014; Peng i sur., 2011).

Prethodna istraživanja različitih vrsta makroalgi koje pripadaju rodu *Cystoseira* ukazuju na njihov potencijal kao izvora prirodnih antioksidansa. Međutim, antioksidativno djelovanje može biti povezano i s drugim aktivnim tvarima kao što su fenoli, eterična ulja i polisaharidi male molekulske mase (Kosanić i sur., 2015). Tako su Kosanić i sur. (2015) u istraživanju provedenom na tri smeđe makroalge (*E. amentacea*, *G. barbata* i *C. compressa*) dokazali sinergijski učinak različitih biološki aktivnih metabolita koji su doveli do izraženog antioksidativnog djelovanja ekstrakata algi. Snažnu inhibiciju stvaranja slobodnih radikala te sinergijski učinak fukoksantina i ostalih bioaktivnih spojeva pokazali su i ekstrakti *C. tamarisfolia*, *C. nodicaulis*, *C. usneoides* te *C. hakodatensis* (Airanthi i sur., 2011, Oucif i sur., 2018). Postotak inhibicije DPPH radikala od oko 80 % zabilježen je u polifenolnim ekstraktima *G. barbata* koji su dodani u želatinozne jestive filmove (Haddar i sur., 2012).

Kao što na prinos i sastav pigmenata utječu različiti čimbenici, oni isto tako utječu i na sposobnost inhibicije DPPH radikala. Povećanjem temperature (4-45 °C) i vremena (30-1440 min) ekstrakcije Lim i sur. (2018) otkrili su povećanje inhibicije DPPH radikala ekstrakta smeđe makroalge *S. polycystum* sa 13,61 % na 50,22 %. S druge strane, pri temperaturi većoj od 70 °C došlo je do razgradnje fukoksantina te su posljedično utvrđene niže vrijednosti inhibicije DPPH radikala. Ghaliaoui i sur. (2020) su utvrdili da na antioksidativnu aktivnost utječe vrsta pretprocesiranja. Najveće antioksidativne aktivnosti dobivene su u smrznutim uzorcima smeđe makroalge *Phyllarira reniformis*: 80 % inhibicije DPPH radikala, dok su oni ekstrahirani iz osušenih i svježih uzoraka pokazali niže aktivnosti: 50,82 % odnosno 32,17 %.

Ove razlike u inhibiciji DPPH radikala frakcija F3 i F4 sugeriraju da, iako klorofil *a* i njegovi derivati (feofitin *a*) pokazuju određeno antioksidativno djelovanje, fukoksantin ima

značajniju ulogu u prevenciji oksidativnog oštećenja. Općenito, visoko antioksidativno djelovanje zabilježeno u vrstama ovog roda ukazuje na njen potencijal primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji kao izvora prirodnih antioksidansa.

## 5. ZÁVĚR

Na osnovi primijenjene ekstrakcije na čvrstoj fazi u izolaciji pigmenata iz smeđe makroalge *Cystoseira corniculata*, kao i iz *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata*, te prezentiranih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. HPLC analizom frakcija F3 i F4 dobivenih pomoću SPE iz liofiliziranih uzoraka *Cystoseira corniculata*, *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata* utvrđena je dominantnost fukoksantina u frakciji F3, te klorofila *a* u frakciji F4.
2. Ekstrakti smeđe makroalge *Ericaria crinita* sadrže najveću koncentraciju fukoksantina u frakciji F3 (12,62 mg/g suhe frakcije), dok najveću koncentraciju klorofila *a* u frakciji F4 sadrži uzorak *Cystoseira corniculata* (3,52 mg/g suhe frakcije).
3. Primjenom SPE moguće je dobiti ukupni kemijski profil pigmenata za sve 3 vrste makroalgi, što ju čini učinkovitom metodom za izolaciju karotenoida i klorofila iz smeđih makroalgi *Cystoseira corniculata*, *Ericaria crinita* i *Gongolaria barbata*.
4. Uzorci sve tri ispitivane vrste makroalgi bogat su izvor klorofila i karotenoida. U najvećoj koncentraciji određeni su ukupni karotenoidi u frakciji F3 (*C. corniculata*: 0,67 mg/g suhog ekstrakta, *E. crinita*: 0,34 mg/g suhog ekstrakta i *G. barbata*: 0,28 mg/g suhog ekstrakta), zatim klorofil *a* u frakciji F4 (*G. barbata*: 0,80 mg/g suhog ekstrakta, *E. crinita* 0,55 mg/g suhog ekstrakta i *C. corniculata*: 0,28 mg/g suhog ekstrakta) i nešto niže koncentracije klorofila *b* u frakciji F3 (*E. crinita* 0,27 mg/g suhog ekstrakta, *C. corniculata*: 0,15 mg/g suhog ekstrakta i *G. barbata*: 0,08 mg/g suhog ekstrakta).
5. Uzorak *C. corniculata* pokazao je vrlo visok postotak inhibicije DPPH radikala: 80,18 % u frakciji F3 i 22,47 % u frakciji F4, što pokazuje visoko antioksidativno djelovanje ove vrste te potencijal primjene kao prirodnog izvora antioksidansa.

## **6. LITERATURA**

- Airanthi MWA, Hosokawa M, Miyashita K: Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science* 76:C104-C111, 2011.
- Amico V: Marine brown algae of family Cystoseiraceae: Chemistry and chemotaxonomy. *Phytochemistry* 39(6):1257-1279, 1995.
- Andrade PB, Barbosa M, Matos RP, Lopes G, Vinholes J, Mouga T, Valentão P: Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry* 138:1819-1828, 2013.
- Barbosa M, Valentão P, Andrade P: Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases. *Marine drugs* 12:4934-4972, 2014.
- Botić V: Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz jadranskih algi *Ulva lactuca*, *Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica*. *Završni rad*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.
- Bruno de Sousa C, Cox CJ, Brito L, Pavão MM, Pereira H, Ferreira A, Ginja C, Campino L, Bermejo R, Parente M, Varela J: Improved phylogeny of brown algae *Cystoseira* (Fucales) from the Atlantic-Mediterranean region based on mitochondrial sequences. *PLoS ONE* 14:e0210143, 2019.
- 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.
- Cavalier-Smith, T: Evolution and relationships of algae: Major branches of the tree of life. U *Unravelling the Algae the Past, Present, and Future of Algal Systematics*, str. 21-55. CRC Press, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2007.
- Cheng S-H, Khoo HE, Kong KW, Prasad KN, Galanakis CM: Extraction of carotenoids and applications. U *Carotenoids: Properties, processing and applications*, str 259-288. Elsevier, London, Ujedinjeno kraljevstvo, 2020.
- Cikoš AM, Šubarić D, Roje M, Babić J, Jerković I, Jokić S: Recent advances on macroalgal pigments and their biological activities (2016–2021). *Algal Research* 65:102748, 2022.
- Cvitković D, Dragović-Uzelac V, Dobrinčić A, Čož-Rakovac R, Balbino S: The effect of solvent and extraction method on the recovery of lipid fraction from Adriatic Sea macroalgae. *Algal Research* 56:102291, 2021.
- Dai YL, Jiang YF, Lu YA, Yu JB, Kang MC, Jeon YJ: Fucoxanthin-rich fraction from *Sargassum fusiformis* alleviates particulate matter-induced inflammation in vitro and in vivo. *Toxicology Reports* 8:349-358, 2021.

- Dobrinčić A, Balbino S, Zorić Z, Pedisić S, Bursać Kovačević D, Elez Garofulić I, Dragović-Uzelac V: Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides. *Marine drugs* 18:168-197, 2020.
- Džambić D: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. *Završni rad*. Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija, Osijek, 2019.
- Falace A, Za Elli E, Bressa G: Morphological and reproductive phenology of *Cystoseira compressa* (esper) Gerloff & Nizamuddin (Fucales, Fucophyceae) in the gulf of Trieste (North Adriatic sea). *Annales Historie Sciences Sociales* 15:71-78, 2005.
- Global Biodiversity Information Facility: *Free and open access to biodiversity data*. *Species search*. Danska, 2021. <https://www.gbif.org/> (Pristupljeno 20.08.2022.)
- Ghaliaoui N, Mokrane H, Hazzit M, Hadjadj M, Otmani FS, Touati S, Seridi H: Impact of freezing and drying preprocessing on pigments extraction from the brown seaweed *Phyllaria reniformis* collected in algerian coast. *Carpathian Journal of Food Science and Technology* 12:81-94, 2020.
- Gupta S, Abu-Ghannam N: Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Techology* 22:315-326, 2011.
- Güven KC, Hakyemez G: Biochemical Investigations of *Cystoseira corniculata* Hauck. *Botanica Marina* 14:323-325, 1976.
- Haddar A, Sellimi S, Ghannouchi R, Martínez Álvarez O, Nasri M, Bougatef A: Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *International Journal of Biological Macromolecules* 51:477-483, 2012.
- Heffernan N, Smyth TJ, FitzGerald RJ, Vila-Soler A, Mendiola J, Ibanez E, Brunton NP: Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovovative Food Science and Emerging Technologies* 37:221-228, 2016.
- Holdt SL, Kraan S: Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23:543-559, 2011.
- Ikeda K, Kitamura A, Machida H, Watanabe M, Negishi H, Hiraoka J, Nakano T: Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30: 44-48., 2003.
- Indrawati R, Sukowijoyo H, Indriatmok, Wijayanti RDE, Limantara L: Encapsulation of brown seaweed pigment by freeze drying: Characterization and its stability during storage. *Procedia Chemistry* 14:353-360, 2015.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M: Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 103:369-377, 2007.

- Jerković I, Cikoš AM, Babić S, Čižmek L, Bojanić K, Aladić K, Ul'yanovskii NV, Kosyakov DS, Lebedev AT, Čož-Rakovac R, Trebše P, Jokić S: 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). *Marine Drugs* 19:235, 2021.
- Kanda H, Kamo Y, Machmudah S, Wahyudiono EY, Goto M: Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Marine Drugs* 12:2383-2396, 2014.
- Karkhaneh YM, Seyed HM, Mashinchian MA, Ghassempour AR: Seasonal variation of fucoxanthin content in four species of brown seaweeds from Qeshm Island, Persian Gulf and evaluation of their antibacterial and antioxidant activities. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 19:2394-2409, 2020.
- Khan W, Rayirat UP, Subramanian S, Jithesh MN, Rayorath P, Hodges DM, Critchley AT, Craigie JS, Norrie J, Prithiviraj B: Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:386-399, 2009.
- Kim J-C. Solvent extraction of fucoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum*. *Separation Science and Technology* 49:410-415, 2014.
- Kosanić M, Ranković B, Stanojković T: Biological potential of marine macroalgae of the genus *Cystoseira*. *Acta Biologica Hungarica* 66(4):374-384, 2015.
- Kranjac M, Zekić M, Radonić A, Marijanović Z, Jokić S, Jerković I: BioProspecting Jadranskog mora: Pregled dosadašnjih istraživanja isparljivih organskih spojeva. *Kemija u Industriji* 69:521-529, 2020.
- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K: Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs* 13:5847-5881, 2015.
- 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.
- Leandro A, Pereira L, Gonçalves AMM: Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Marine drugs* 18:17, 2019.
- Lee RE: *Phycology*. Cambridge University Press, New York, 2008.
- Li J, Liu Y, Liu Y, Wang Q, Gao X, Gong Q: Effects of temperature and salinity on the growth and biochemical composition of the brown alga *Sargassum fusiforme* (Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology* 31:3061-3068, 2019.



- 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.
- Lim MWS, Tan KM, Chew LY, Kong KW, Yan SW: Application of two-level full factorial design for the extraction of fucoxanthin and antioxidant activities from *Sargassum siliquosum* and *Sargassum polycystum*. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 27:446-463, 2018.
- Mahadevan K: Seaweeds: A sustainable food source. U: *Seaweed Sustainability*, str. 347-364. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2015.
- Mavumengwana-Khanyile B, Katima Z, Songa EA, Okonkwo JO: Recent advances in sorbents applications and techniques used for solid-phase extraction of atrazine and its metabolites deisopropylatrazine and deethylatrazine: a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 99:1017-1068, 2019.
- Milchakova N: Marine plants of the Black Sea. An illustrated field guide. Sevastopol, DigitPrint, 2011.
- Oliyaei N, Moosavi-Nasab M: Ultrasound-assisted extraction of fucoxanthin from *Sargassum angustifolium* and *Cystoseira indica* brown algae. *Journal of Food Processing and Preservation* 45:e15929, 2021.
- Oucif H, Miranda JM, Mehidi SA, Abi-Ayad, SMEA, Barros-Velázquez J, Aubourg SP: Effectiveness of a combined ethanol–aqueous extract of alga *Cystoseira compressa* for the quality enhancement of a chilled fatty fish species. *European Food Research and Technology* 244:291-299, 2018.
- Ozgun S, Turan F: Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment* 21(2):125-134, 2015.
- Pal A, Kamthania MC, Kumar A: Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds-A Review. *Open Access Library Journal* 1:1-17, 2014.
- Pardilhó SL, Machado S, Bessada SMF, Almeida MF, Oliveira MB, Dias JM; Marine Macroalgae Waste from Northern Portugal: A Potential Source of Natural Pigments?. *Waste and Biomass Valorization* 12:239-249, 2021.
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH: Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs* 9:1806-1828, 2011.
- Pereira L: Biodiversity and Description of the Main Algae with Bioactive Properties. U *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*, CRC Press, Portugal, 2018.

- Plaza M, Amigo-Benavent M, D. del Castillo M, Ibáñez E, Herrero M: Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International* 43:2341-2348, 2010.
- Polat S, Ozogul Y: Fatty acid, mineral and proximate composition of some seaweeds from the northeastern Mediterranean coast. *Italian Journal of Food Science* 21:317-324, 2009.
- Poole CF: New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 22:362-373, 2003.
- Radman S, Čižmek L, Babić S, Cikoš AM, Čož-Rakovac R, Jokić S, Jerković I: Bioprospecting of Less-Polar Fractions of *Ericaria crinita* and *Ericaria amentacea*: Developmental Toxicity and Antioxidant Activity. *Marine Drugs* 20:57, 2022a.
- Radman S, Zekić M, Flanjak I, Cikoš AM, Jokić S, Jerković I: Contribution to the chemodiversity of ex *Cystoseira* sp. - *Gongolaria barbata* and *Ericaria crinita* from the Adriatic Sea: Volatiles, fatty acids and major pigments. *Algal research* 63:2211-9264, 2022b.
- Rožić S, Puizina J, Šamanić I, Žuljević A, Antolić B: Molecular identification of the brown algae, *Cystoseira* spp. (Phaeophyceae, Fucales) from the Adriatic Sea – preliminary results. *Acta Adriatica* 53:447-456, 2012.
- Ryabushko VI, Prazukin AV, Popova EV, Nekhoroshev MV: Fucoxanthin of the brown alga *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh from the Black Sea. *Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment* 20(2):108-113, 2014.
- Sartory DP, Grobbelaar JU: Extraction of chlorophyll *a* from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia* 114:177-187, 1984.
- 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.
- Susanto E, Fahmi AS, Abe M, Hosokawa M, K Miyashita: Lipids, Fatty acids, and Fucoxanthin Content from Temperate and Tropical Brown Seaweeds. *Aquatic Procedia* 7:66-75, 2016.
- 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.
- Torres FAE, Passalacqua TG, Velásquez AMA, De Souza RA, Colepicolo P, Graminha MAS: New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: A review. *Revista Brasileira Farmacognosia* 24:265-276, 2014.

- 
- Tuney-Kizilkaya I, Sukatar A: Molecular and morphological identification and distribution of *Cystoseira* C. Agardh, 1820 species in Northern Mediterranean coasts of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin* 27:4606-4614, 2018.
- UNEP, United Nations Environment Programme: *Proposals for amendment of Annexes II and III of the SPA/BD Protocol*. MEDITERRANEAN ACTION PLAN, Floriana, Malta, 2009.
- Zwir-Ferenc A, Biziuk M: Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies* 15:677-690, 2006.
- Wang HD, Chen CC, Huynh P, Chang JS: Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology* 184:355-362, 2015.
- Wang J, Ma Y, Yang J, Jin L, Gao Z, Xue L, Hou L, Sui L, Liu J, Zou X: Fucoxanthin inhibits tumour-related lymphangiogenesis and growth of breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23:2219-2229, 2019.
- WEB 1 [https://en-academic.com/pictures/enwiki/67/Cystoseira\\_0003.JPG](https://en-academic.com/pictures/enwiki/67/Cystoseira_0003.JPG) (Pristupljeno 20.08.2022.)
- WEB 2 [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=1334](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=1334) (Pristupljeno 20.08.2022.)
- Yalçın S, Karakaş Ö, Okudan ES, 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* 59:325-337, 2021.

