Antioksidacijski potencijal različitih ekstrakata jadranskih algi

Smoljo, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:868748

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČLIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL RAZLIČITIH EKSTRAKATA JADRANSKIH ALGI

ZAVRŠNI RAD

MARINA SMOLJO

Matični broj: 4

Split, rujan 2018

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL RAZLIČITIH EKSTRAKATA JADRANSKIH ALGI

ZAVRŠNI RAD

MARINA SMOLJO

Matični broj: 4

Split, rujan 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FAKULTY OF CHEMISTRY AND TEHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF VARIOUS EXTRACTS OF ADRIATIC ALGAE

BACHELOR THESIS

MARINA SMOLJO

Parent number: 4

Split, September 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada: je prihvaćena na 3. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL RAZLIČITIH EKSTRAKATA JADRANSKIH ALGI

Marina Smoljo, 4

Sažetak:

Kada se slobodni radikali nagomilavaju u našem organizmu i nadvladaju mehanizam antioksidativne zaštite javlja se stanje koje se naziva oksidacijski stres. Antioksidansi su aktivne tvari prisutne u hrani koji usporavaju ili inhibiraju djelovanje slobodnih radikala. Za određivanje aktivnosti nekog uzorka, odnosno antioksidansa, koriste se različite metode temeljene na različitim mehanizmima djelovanja. Mnoga istraživanja ukazuju na činjenicu da biljni ekstrakti posjeduju dobra antioksidacijska svojstva. Morske alge također su bogate antioksidansima pa im se u posljednje vrijeme pridaje posebna pozornost iako njihova upotreba u prehrani nije učestala. U cilju određivanja antioksidacijskog kapaciteta korišteni su ekstrakti jadranskih algi (dvije smeđe alge, *Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica* te jedna zelena alga *Ulva lactuca*) pripravljeni u tri različita otapala (destilirana voda, etanol i aceton) i pri različitim temperaturama (20 °C, 40 °C i 60 °C). Za dobivanje rezultata korištene su dvije antioksidacijske metode, FRAP (engl. *Ferric-raducing antioxidant power*) i DPPH metoda (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal*). Dobiveni rezultati pokazali su da najbolju antioksidacijsku snagu imaju ekstrakti smeđe alge *Dictyota dichotoma*, kao i alge *Padina pavonica*, pri različitim temperaturama, dok su se najslabijim pokazali ekstrakti zelene alge *Ulva lactuca*. Usporedbom rezultata ne može se donijeti zaključak o utjecaju temperature i/ili otapala na antioksidacijski potencijal ekstrakata.

Ključne riječi: antioksidansi, FRAP, DPPH, zelene alge, smeđe alge

Rad sadrži: 27 stranica, 14 slika, 8 tablica, 24 literaturnih referenci

Jezik izvornik: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić-Mekinić -predsjednik
2. Doc. dr. sc. Miće Jakić -član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - mentor

Datum obrane: 28. rujna 2018. g.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnci Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split Study
Undergraduate study of food tecnology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 3.

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF VARIOUS EXTRACTS OF ADRIATIC ALGAE

Marina Smoljo, 4

Abstract:

When free radicals accumulate in our organism and overcome the mechanisms of its antioxidant protection, the stage of oxidative stress starts. Antioxidants are active substances present in food that slow down or inhibit the action of free radicals. For determination of the sample activity, or antioxidants, different methods based on different mechanisms of action are used. Many studies point out the fact that herbal extracts possess good antioxidant properties. Marine algae are also rich in antioxidants, so numerous studies are focused on them, although their use in diet is still not frequent. In order to determine the antioxidant capacity, extracts of Adriatic algae (two brown algae, *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* and one green algae of the *Ulva lactuca*) were prepared using three different solvents (distilled water, ethanol and acetone) and at different temperatures (20 °C, 40 °C and 60 °C). Two antioxidant methods, FRAP (Ferric-reducing antioxidant power) and DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) were used. The obtained results showed that the best antioxidant power provide extracts of brown algae *Dictyota dichotoma*, as well as *Padina pavonica*, at different temperatures, while extracts of green algae *Ulva lactuca* showed the weakest activity. By comparing the results, the conclusion about the influence of temperature and/or solvent on the antioxidant potential of extracts cannot be brought.

Keywords: antioxidants, FRAP, DPPH, green algae, brown algae

Thesis contains: 27 pages, 14 figures, 8 tables, 24 references

Original in: Croatian

Defence committee:
1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor
2. Ph. D. Miće Jakić, Assistant Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Defence date: 28th September 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc.dr.sc. Danijele Skroza, u razdoblju od ožujka do rujna 2018. godine.

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na ukazanom povjerenju i pomoći te vodstvu pri izradi ovoga rada.
Također, jedno veliko hvala mojim roditeljima i obitelji, kao i prijateljima na nesebičnoj podršci tijekom školovanja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Odrediti antioksidacijski potencijal jadranskih algi (smeđe alge: *Dictyota dichtoma* i *Padina pavonica*, zelena alga: *Ulva lactuca*) korištenjem dviju spektrofotometrijskih metoda: metode FRAP *(Ferric-raducing antioxidant power)* i metode DPPH *(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay).*
- Usporediti rezultate i izvesti zaključke o antioksidacijskoj aktivnosti analiziranih morskih algi.

SAŽETAK

Kada se slobodni radikali nagomilavaju u našem organizmu i nadvladaju mehanizam antioksidativne zaštite javlja se stanje koje se naziva oksidacijski stres. Antioksidansi su aktivne tvari prisutne u hrani koji usporavaju ili inhibiraju djelovanje slobodnih radikala. Za određivanje aktivnosti nekog uzorka, odnosno antioksidansa, koriste se različite metode temeljene na različitim mehanizmima djelovanja. Mnoga istraživanja ukazuju na činjenicu da biljni ekstrakti posjeduju dobra antioksidacijska svojstva. Morske alge također su bogate antioksidansima pa im se u posljednje vrijeme pridaje posebna pozornost iako njihova upotreba u prehrani nije učestala. U cilju određivanja antioksidacijskog kapaciteta korišteni su ekstrakti jadranskih algi (dvije smeđe alge, *Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica* te jedna zelena alga *Ulva lactuca*) pripravljeni u tri različita otapala (destilirana voda, etanol i aceton) i pri različitim temperaturama (20 °C, 40 °C i 60 °C). Za dobivanje rezultata korištene su dvije antioksidacijske metode, FRAP (engl.*Ferric-raducing antioxidant power*) i DPPH metoda (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal*). Dobiveni rezultati pokazali su da najbolju antioksidacijsku snagu imaju ekstrakti smeđe alge *Dictyota dichotoma*, kao i alge *Padina pavonica*, pri različitim temperaturama, dok su se najslabijim pokazali ekstrakti zelene alge *Ulva lactuca.* Usporedbom rezultata ne može se donijeti zaključak o utjecaju temperature i/ili otapala na antioksidacijski potencijal ekstrakata.

Ključne riječi: antioksidansi, FRAP, DPPH, zelene alge, smeđe alge

SUMMARY

When free radicals accumulate in our organism and overcome the mechanisms of its antioxidant protection, the stage of oxidative stress starts. Antioxidants are active substances present in food that slow down or inhibit the action of free radicals. For determination of the sample activity, or antioxidants, different methods based on different mechanisms of action are used. Many studies point out the fact that herbal extracts possess good antioxidant properties. Marine algae are also rich in antioxidants, so numerous studies are focused on them, although their use in diet is still not frequent. In order to determine the antioxidant capacity, extracts of Adriatic algae (two brown algae, *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* and one green algae of the *Ulva lactuca*) were prepared using three different solvents (distilled water, ethanol and acetone) and at different temperatures (20 °C, 40 °C and 60 °C). Two antioxidant methods, FRAP (Ferric-reducing antioxidant power) and DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) were used. The obtained results showed that the best antioxidant power provide extracts of brown algae *Dictyota dichotoma*, as well as *Padina pavonica*, at different temperatures, while extracts of green algae *Ulva lactuca* showed the weakest activity. By comparing the results, the conclusion about the influence of temperature and/or solvent on the antioxidant potential of extracts cannot be brought.

Keywords: antioxidants, FRAP, DPPH, green algae, brown algae

SADRŽAJ

UVOD 1
1. OPĆI DIO 2
1.1. ANTIOKSIDANSI 2
1.2. REAKCIJSKI MEHANIZMI 4
1.2.1. ET metode 5
1.2.1.1. FRAP metoda (engl.*Ferric-reducing antioxidant power*) 5
1.2.1.2. TEAC metoda (engl.*Trolox equivalent antioxidant capacity*) 6
1.2.1.3. CUPRAC metoda *(engl.Cupric ion reducing antioxidant capacity*) 7
1.2.1.4. DPPH metoda (engl.*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay*) 7
1.2.2. HAT metode 8
1.2.3. Ostale metode 9
1.3. MORSKE ALGE 10
1.3.1. Bioaktivnost makroalgi 12
2. EKSPERIMENTALNI DIO 13
2.1. MATERIJAL 13
2.2. UREĐAJI 13
2.3. KEMIKALIJE 13
2.4. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI 14
2.4.1. FRAP metoda 14
2.4.2. DPPH metoda 15
3. REZULTATI 17
3.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM 17
3.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM 20
4. RASPRAVA 23
5. ZAKLJUČAK 25
6. LITERATURA 26

UVOD

Antioksidansi su aktivne tvari prisutne u hrani i imaju važnu ulogu u zaštiti ljudskog organizma od utjecaja slobodnih radikala koji uslijed prekomjernog nakupljanja u organizmu mogu izazvati oksidacijski stres. Aktivnost antioksidansa se može pratiti pomoću različitih metoda temeljenih na različitim mehanizmima djelovanja koje se obzirom na njih dijele na, HAT (engl. *Hydrogen atom transfer*) i ET (engl. *Electron transfer*) metode.

Rezultati brojnih provedenih studija ukazali su na činjenicu da biljni ekstrakti posjeduju dobra antioksidacijska svojstva i to zahvaljujući prisustvu fenolnih spojeva. U posljednje vrijeme posebna pažnja pridaje se morskim algama. Iako upotreba algi u prehrani i nije tako učestala, ne može se izostaviti činjenica da zbog visokog fenolnog potencijala i antioksidacijske aktivnosti imaju veliki značaj za zdravlje čovjeka u zaštiti od pojave oksidacijskog stresa.

Zanimljivo je da Jadran obiluje velikim količinama raznih vrsta algi, za koje je poznato da sadrže antioksidanse, stoga je u ovom radu ispitana antioksidacijska aktivnost ekstrakata dviju smeđih algi (*Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica)* i jedne zelene alge (*Ulva lactuca*), pripravljenih korištenjem destilirane vode, etanola i acetona, na temperaturama od 20, 40 i 60 °C. Za istraživanje jačine antioksidacijskog potencijala jadranskih algi korištene su dvije antioksidacijske metode, i to FRAP metoda (engl. *Ferric-reducing antioxidant power*) i DPPH metoda (korištenjem *2,2-difenil-2-pikrilhidrazil radikala*).

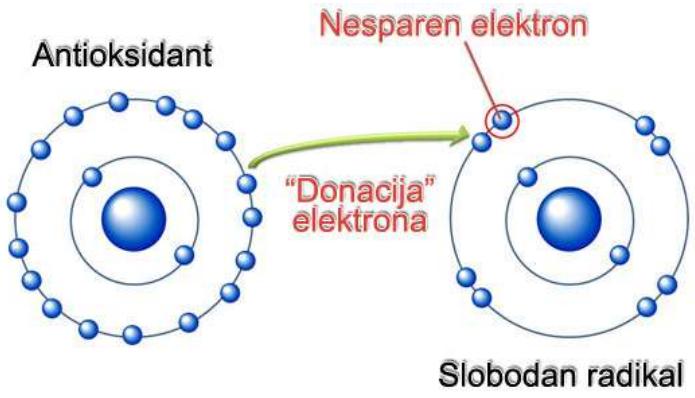
1. OPĆI DIO

1.1. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi štite ključne komponente stanica tako što neutraliziraju štetne učinke slobodnih radikala, koji nastaju kao prirodni nusproizvodi metabolizma stanica. Antioksidansi stupaju u reakcije sa slobodnim radikalima donirajući im proton ili elektron i na taj način ih inaktiviraju. Katalaza, superoksid-dismutaza i glutation-peroksidaza su enzimi s antioksidacijskom ulogom u organizmu, dok drugu liniju antioksidacijske obrane čine nutritivne komponente kao što su: fenolni spojevi i njihovi derivati, te esencijalni mikronutrijenti, kao npr.vitamin E i C, karoteni, selen i dr. (1, 2).

Slobodni radikali su vrlo nestabilne kemijske strukture koje u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron zbog kojeg su vrlo reaktivni, a nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu (3). Mehanizam nastajanja slobodnih radikala odvija se u tri osnovna koraka:

1. inicijacija – dolazi do pucanja kovalentne veze i od molekule nastaju dva slobodna radikala, tj. povećava se broj slobodnih radikala;
2. propagacija – stvoreni slobodni radikal daje novi radikal i stabilni produkt i održava se broj slobodnih radikala;
3. terminacija – spajanje dva radikala i nastajanje stabilnog neradikalnog produkta; smanjuje se broj slobodnih radikala (4).



Slika 1. Djelovanje antioksidansa na slobodni radikal (5)

Postoji više podjela slobodnih radikala, kao npr. na prirodne i sintetske; endogene i egzogene itd., a najčešći biološki slobodni radikali dijele se na:

- dušikove (RNS, engl. *Reactive nitrogen species*-reaktivne dušikove vrste) i
- kisikove (ROS, engl. *Reactive oxygen species*-reaktivne kisikove vrste) (4).

Kada se RNS i ROS, te ostali slobodni radikali nalaze na neprikladnim mjestima u organizmu i kada su zastupljeni u velikoj količini, ravnoteža je poremećena pa kao posljedica toga nastaje stanje zvano oksidacijski stres, koji predstavlja neravnotežu između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti tijela da neutralizira njihove štetne učinke (4).

Antioksidansi su bitni faktori u održavanju zdravlja, a njihova pozitivna djelovanja utječu na poboljšanje funkcija živčanog sustava, dišnog sustava, reproduktivnih funkcija, imuniteta, smanjenje pretilosti te samog procesa starenja. Oni inhibiraju ili usporavaju oksidaciju drugih molekula i tako se nastoje oduprijeti oksidacijskom stresu. Osim toga antioksidansi sprječavaju i lančane reakcija slobodnih radikala. Kako bi se uspostavila ravnoteža između antioksidansa i slobodnih radikala u tijelu, antioksidansi se moraju neprestano obnavljati. Ljudski antioksidativni obrambeni sustav sastoji se od neenzimskih antioksidansa (vitamin E, vitamin C, koenzim Q10, glutation, flavonoidi, karotenoidi) i antioksidativnih enzima (superoksid-dismutaza – SOD; glutation peroksidaza - GPRx; askorbat-oksidaza - Aox; katalaza - CAT) (4).

Tablica 1. Podjela antioksidansa obzirom na način djelovanja (6)

Vrsta antioksidansa	**Uloga**
Primarni antioksidansi	onemogućuju nastajanje slobodnih radikala
Sekundarni antioksidansi	uništavaju već stvorene slobodne radikale
Tercijarni antioksidansi	ispravljaju nastala oštećenja stanica

Djelovanje antioksidansa može se opisati sljedećim mehanizmima:

- Uklanjanjem kisika, ili utjecajem na smanjivanje lokalne koncentracije kisika;
- Uklanjanjem slobodnih radikala;
- Uklanjanjem ciljnih ROS-a kao superoksida ili vodikova peroksida;
- Uklanjanjem singletnog kisika i metalnih iona (3).

1.2. REAKCIJSKI MEHANIZMI

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti mogu se podijeliti na metode koje se temelje na:

- prijenosu vodika (engl. *Hydrogen atom transfer* - HAT) i
- prijenosu elektrona (engl. *Electron transfe r*- ET) (2, 7).

Antioksidansi, pomoću dva glavna mehanizma (HAT i ET) mogu deaktivirati radikale, a energija disocijacije veze i ionizacijski potencijal su dva glavna čimbenika koja određuju mehanizam i djelotvornost antioksidansa. Mehanizmi HAT i ET uglavnom se javljaju zajedno u svim uzorcima, a krajnji rezultat je isti iako se kinetika i potencijal za sporedne reakcije razlikuju (7).

Tablica 2. Antioksidacijske metode (7)

Puni naziv metode	**Skraćeni naziv**	**Mehanizam djelovanja**
Ferric-reducing antioxidant power	FRAP	ET
Trolox equivalent antioxidant capacity	TEAC	ET
Cupric ion reducing antioxidant capacity	CUPRAC	ET
2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay	DPPH	ET
Oxygen radical absorbing capacity	ORAC	HAT
Total oxidant scavening capacity	TOSC	HAT
Total reactive antioxidant potential	TRAP	HAT
Low-density lipoprotein oxidation	LDL OKSIDACIJA	HAT

1.2.1. ET metode

Reakcije koje se temelje na ET mehanizmu mjere sposobnost potencijalnog antioksidansa da prenosi jedan elektron na nestabilnu molekulu, uključujući radikale, metale i karbonile.

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{\cdot +}$$

$$AH^{\cdot +} \leftrightarrow A^{\cdot} + H_3O^{+} \qquad \text{(reakcijase odvija u prisustvu } H_2O\text{)}$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \rightarrow XH + H_2O$$

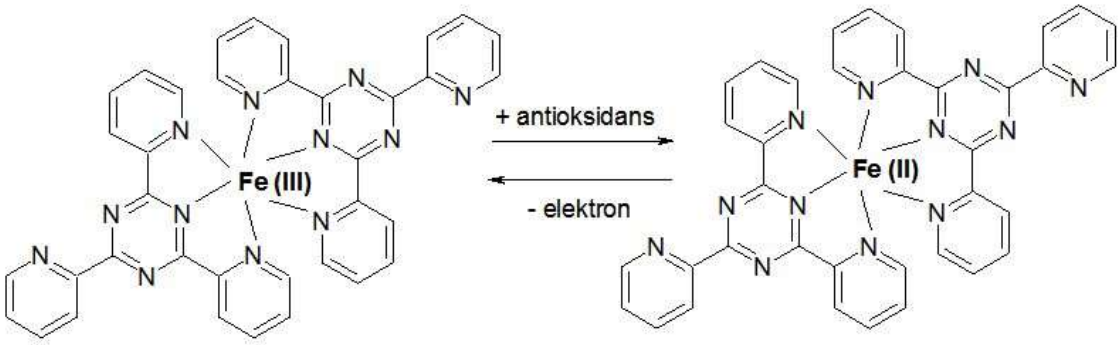
$$M(III) + AH \rightarrow AH^{+} + M(II)$$

Antioksidacijske metode koje se temelje na ovom mehanizmu su najčešće spektrofotometrijske i mjere sposobnost antioksidansa da reducira molekule oksidansa, a krajnji rezultat je promjena boje (absorbancije). Metode koje se temelje na prijenosu elektrona, za određene redoks reakcije, imaju određeno vrijeme trajanja i mjere oksidaciju u tom vremenu, tj. termodinamičku pretvorbu (2, 7).

1.2.1.1. FRAP metoda (engl.*Ferric-reducing antioxidant power*)

FRAP metoda se prvenstveno razvila za mjerenje redukcijske snage krvne plazme, ali se naknadno prilagodila pa se danas učestalo koristi za ispitivanje antioksidansa. Temelji se na sposobnosti antioksidansa da reduciraju žuti feril-tripiridil-s-triazin kompleks (Fe(III)–TPTZ) u plavi željezni kompleks (Fe(II)–TPTZ) djelovanjem antioksidansa (slika 2). FRAP metoda se izvodi pri kiselom pH (pH=3,6).

Rezultati FRAP-a mogu varirati ovisno o ispitivanom uzorku i duljini trajanja analize, pa se metoda može provoditi u kratkim vremenskim intervalima (npr. 4 minute) ili u slučaju nekih polifenola koji reagiraju sporije pa zahtijevaju dulje vrijeme reakcije, do 30 minuta (7, 8).

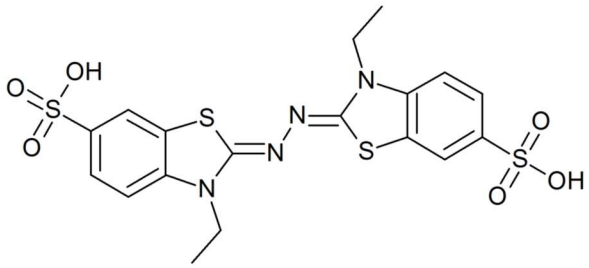


Fe3+-TPTZ (žute boje) Fe^{2+}-TPTZ (plave boje)

Slika 2. FRAP reakcija (9)

1.2.1.2. TEAC metoda (engl.*Trolox equivalent antioxidant capacity*)

TEAC metoda se koristi za testiranje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka hrane. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzoatiazolin-6-sulfonska kiselina)) je supstrat peroksidaze koji pri oksidaciji u prisutnosti H_2O_2 generira radikalni kation ($ABTS^{\cdot+}$) koji je intenzivno obojan i može se spektrofotometrijski pratiti u rasponu od 600 do 750 nm. Antioksidacijski kapacitet se mjeri kao sposobnost antioksidansa iz ispitivanog uzorka da stupe u reakcije s nastalim $ABTS^{\cdot+}$ radikalom i na taj način ga inaktiviraju, a rezultati se izražavaju preko standarda koji je najčešće *Trolox* zbog čega se ova metoda i naziva TEAC (7,8, 10).



Slika 3. Struktura ABTS (11)

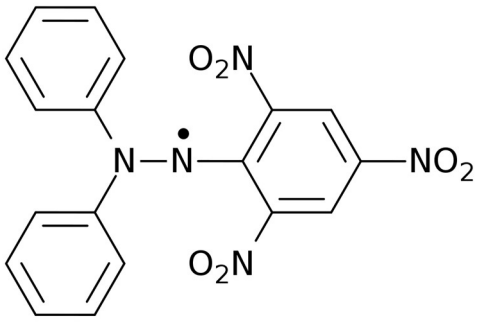
1.2.1.3. CUPRAC metoda *(engl.Cupric ion reducing antioxidant capacity*)

CUPRAC metoda se temelji na redukciji Cu (II) do Cu (I) djelovanjem redukcijskog sredstva (antioksidansa) koji su prisutni u uzorku. CUPRAC reagens je lako i različito primjenjiv u rutinskim laboratorijima, te je stabilniji i dostupniji od ostalih obojenih reagensa (npr. ABTS, DPPH). Kod ove metode redoks reakcija koja daje obojene vrste odvija se pri neutralnom pH, za razliku od ostalih ET metoda (7, 8).

1.2.1.4. DPPH metoda (engl.*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay*)

Radikal DPPH˙ (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) koji je obojan ljubičastom bojom jedan je od rijetkih stabilnih organskih dušikovih radikala i komercijalno je dostupan. Ova metoda temelji se na sposobnosti antioksidansa da stupi u reakcije s DPPH˙, što se mjeri pri valnoj duljini od 515-528 nm.

Sposobnosti *hvatanja* slobodnih radikala se izračunava kao postotak inhibicije radikala koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa, a drugi način izražavanja antioksidativnog kapaciteta je preko IC_{50} vrijednosti, što označava koncentraciju antioksidansa potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH˙ za 50% (7,8,12,13).



Slika 4. DPPH radikal (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) (14)

1.2.2. HAT metode

HAT metode mjere sposobnost antioksidansa da doniranjem atoma vodika *ugase* slobodne radikale. Mjerenje kapaciteta ili antioksidacijske aktivnosti se temelji na kinetičkoj konkurenciji, a reakcije su pH neovisne, te traju prilično kratko. U HAT metode spadaju:

- ORAC metoda (engl .*Oxygen radical absorbing capacity*);
- TOSC metoda (engl.*Total oxidant scavening capacity);*
- TRAP metoda (engl.*Total reactive antioxidant potential*) i
- LDL oksidacija *(engl. Low-density lipoprotein oxidation)*(2,7).

ORAC metoda mjeri antioksidativnu inhibiciju peroksilnih radikala koji reagiraju s fluorescentnom probom kako bi se oblikovao nefluorescentni produkt, a kapacitet antioksidansa određen je količinom produkta nastalog tijekom vremena (7).

TOSC metoda dozvoljava kvantifikaciju antioksidacijskog kapaciteta specifično prema tri snažna oksidansa (peroksinitrata, hidroksilnih radikala i peroksilnih radikal), te se bavi pitanjima o mogućnosti procjene različitih antioksidansa s različitim biološkim relevantnim radikalnim izvorima (7).

TRAP metoda mjeri neenzimatske antioksidanse (npr. askorbinska kiselina, glutation, β-karoten i α-tokoferol) te se kao takva najčešće koristi za mjerenje *in vivo* antioksidacijskog kapaciteta u plazmi ili serumu. Test je osjetljiv na sve poznate antioksidanse koji razgrađuju lanac i obuhvaća iniciranje peroksidacije lipida stvaranjem peroksilnih radikala topljivih u vodi (7).

Primjena LDL oksidacije (oksidacija lipoproteina niske gustoće) je prilagođena za procjenu sposobnosti antioksidansa u fiziološki relevantnom sustavu. Oksidacija je pokrenuta pomoću AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) ili Cu (II), a LDL je izoliran iz uzorka krvi (7).

1.2.3. Ostale metode

Metode koje se ne mogu svrstati u HAT i u ET metode ili se ne mogu opisati niti jednom od tih metoda jer nisu dovoljno dobro istraženi mehanizmi njihovog djelovanja spadaju u ostale metode.

Jedna od najpoznatijih i najčešće proučavanih oscilirajućih reakcija koje se koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenih otopina je Briggs-Rauscher reakcija (BR metoda). Reakcija se odvija pri pH 2 i to odgovara fiziološkoj pH vrijednosti želuca gdje se odvija glavnina procesa probave. Time se smatra da ova metoda može pomoći u boljem razumijevanju uloge bioaktivnih komponenti u prevenciji bolesti i održavanju zdravlja. Tijekom Briggs-Rauscher reakcije komponente prolaze kroz periodične oscilacije prilikom čega reakcijska smjesa mijenja boju. Do naglog prigušenja (inhibicije) osciliranja dolazi prilikom dodavanja antioksidansa, a kako bi se precizno izmjerilo vrijeme inhibicije oscilacije reakcije, koje je proporcionalno koncentraciji antioksidansa u uzorku, reakcija se osim vizualno vrlo često prati i potenciometrijski (2).

Uz BR metodu u ovu skupinu antioksidacijski metoda često se svrstavaju i β-karoten metoda i metoda fotokemiluminoscencije. β-karoten metoda *(Croton ili β-Carotene Bleaching)* se zasniva na izbjeljivanju β-karotena dodavanjem uzorka koji sadrži antioksidans, a gubitak boje optički se prati na 443 nm u fosfatnom puferu pri pH 7. Metoda ispitivanja fotokemiluminoscencije obuhvaća fotokemijsku generaciju superoksida O_2^- slobodnih radikala u kombinaciji sa CL detekcijom, a test započinje optičkom uzbudom fotosenzibilizatora što rezultira stvaranjem superoksidnih radikalnih aniona (7, 8).

1.3. MORSKE ALGE

Pretpostavlja se da postoji više od 25 000 vrsta algi od kojih je većina morske alge, dok ostatak čine slatkovodne alge, a zajedničko svojstvo im je sposobnost fotosinteze (15). Bogat su izvor ljekovitih i hranjivih tvari pa su korisne i zdrave za organizam. Obiluju mineralima, vitaminima, proteinima, prehrambenim vlaknima, aminokiselinama i drugim vrijednim nutrijentima pa se često koriste kao dodatak prehrani (16).

Alge se mogu podijeliti na mikroalge i makroalge. Mikroalge su alge vidljive pod mikroskopom, sadrže veći udio lipida, te su bez korijena, lišća i cvjetova. Makroalge su pak vidljive *golim* okom, sadrže veći udio polisaharida i rastu u dubinama ali i na površini (17). Prema prisutnosti pigmenta u njima, makroalge se mogu podijeliti na: zelene alge (*Chlorophyta*), plave alge (*Cyanophyta*), smeđe alge (*Phaeophyta*) i crvene alge (*Rhodophyta*) (15, 16).

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada korištene su tri vrste alge rasprostranjene u Jadranu, dvije smeđe alge *Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica,* te jedna zelena alga *Ulva lactuca.*

U. lactuca, poznata kao morska salata, je jestiva zelena alga koja živi u staništima bogatim organskim tvarima na dubini do 23 m. Široko je rasprostranjena na stjenovitim obalama mora i oceana, te je pokazatelj onečišćenja vode. Pripada porodici *Ulvaceae.* Bogata je antioksidansima, bjelančevinama i vlaknima, te u sebi sadrži vitamine i minerale potrebne čovjeku i tako dobro djeluje na imunološki i probavni sustav (18, 19).



Slika 5. *Ulva lactuca* (19)

D. dichotoma je smeđa alga, ali je uglavnom zelene boje, te pripada porodici *Dictyotaceae.* Živi na stjenovitim obalama, a može se čak naći i na dubini od 20 m. Ima zaobljene rubove na kojima se nalaze crne mrlje koje predstavljaju reproduktivne organe (20).



Slika 6. *Dictyota dichotoma* (20)

P. pavonica, iz porodice *Dyctiotaceae,* ili u prijevodu paunov rep, je vrsta smeđe alge rasprostranjene u Sredozemnom moru i Atlanskom oceanu. Živi u stjenovitim područjima, a za stijenu je pričvršćena rizoidima. Na donjoj površini nalaze se koncentrične linije od tankih bjelkastih niti, a sama donja površina je tamno-smeđe, svijetlo-smeđe ili maslinasto-zelene boje, dok je gornja površina prekrivena tankim slojem mulja (21).



Slika 7. *Padina pavonica* (21)

1.3.1. Bioaktivnost makroalgi

U potrazi za bioaktivnim spojevima za razvoj zdrave hrane i novih lijekova, zadnjih godina, sve se više koriste alge, a posebno smeđe (*Phaeophyta*) zbog njihove sposobnosti da proizvode različite sekundarne metabolite koji su posebno značajni za ljudsko zdravlje (npr. terpenoidi, fukoksantin, fenolni spojevi, bromofenoli) (22). Kao fotosintetski organizmi, alge su i dalje dobro razvijene bez ozbiljnih fotodinamičkih i strukturnih oštećenja bez obzira na njihovu izloženost ekstremnim uvjetima (ultraljubičasto zračenje, temperatura, slanost, koncentracija kisika) koji mogu dovesti do nastanka slobodnih radikala i drugih oksidirajućih agensa. Njihova otpornost na oksidaciju proizlazi iz njihovog prirodnog sadržaja antioksidanasa. U odnosu na zelene i crvene alge, smeđe alge sadrže znatno veće količine fenolnih spojeva koji se smatraju uglavnom odgovornima za njihovu antioksidativnu aktivnost, čemu kao dokaz ide činjenica da smeđe alge imaju i relativno bolji antioksidacijski potencijal od zelenih i crvenih algi (22, 23).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. MATERIJAL

U eksperimentalnom dijelu korišteni su ekstrakti koji su prethodno pripremljeni ekstrakcijom suhih algi *D. dichtoma, P. pavonica* i *U. lactuca* korištenjem tri različita otapala (destilirana voda, etanol i aceton) pri različitim temperaturama (20 °C, 40 °C i 60 °C).

2.2. UREĐAJI

Od uređaja u eksperimentalnom dijelu završnog rada korišten je spektrofotometar Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise (*Tecan Group Ltd., Mannedorf, Švicarska*) i vaga (*Kern, Model ALS 120-4, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo*), a testiranje se provelo u mikrotitarskim pločicama (*Micro test plates, PS, Without lid, nesterilne, Sarsted, Njemačka*).

2.3. KEMIKALIJE

Korišteni reagensi i otapala u radu su:

- natrijev acetat, $CH_3COONa \times H_2O$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- glacijalna octena kiselina, $C_2H_4O_2$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- klorovodična kiselina, 37% (*Pancreac, Barcelona, Španjolska);*
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) $C_{18}H_{12}N_6$ (*Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka*);
- željezo (III) klorid, $FeCl_3$(*Kemika, Zagreb, Hrvatska);*
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), $C_{14}H_{18}O_4$, Mr=250,29 g/mol, 97% čistoće (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka*)
- etanol p.a. (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, free radical), $C_{18}H_{22}N_5O_6$ (*Sigma-Aldrich, Steinhem, Njemačka*).

2.4. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

U ovom radu za određivanje antioksidacijskog potencijala različitih ekstrakata jadranskih algi korištene su dvije spektrofotometrijske metode, FRAP i DPPH metoda.

2.4.1. FRAP metoda

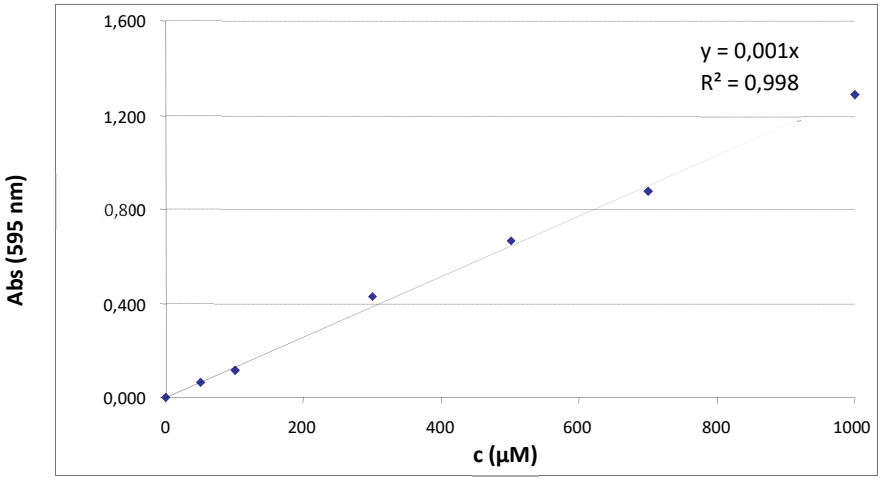
Antioksidacijski potencijal različitih ekstrakata jadranskih algi određen je FRAP metodom (engl. *Ferric reducing antioxidant power*). Mehanizam reakcije se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe(II)-TPTZ u Fe(III)-TPTZ oblik uz djelovanje antioksidansa pri čemu nastaje plavo obojenje maksimalne absorpcije pri 595 nm (7, 24).

Reagensi:

- acetatni pufer, c ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$) = 300 mmol/L, pH 3,6
- otopina klorovodične kiseline, c (HCl) = 40 mmol/L
- otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl, c($C_{18}H_{12}N_6$) = 10 mmol/L
- otopina $FeCl_3$ c(Fe^{3+}) = 20 mmol/L
- FRAP reagens se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL otopine TPTZ i 2,5 mL otopine $FeCl_3$

Postupak određivanja:

U mikrotitarsku pločicu se otpipetira 300 µL svježe pripravljene otopine FRAP reagensa i očita mu se absorbancija pri 595 nm. Potom se u reagens doda 10 µL uzorka i prati se promjena absorbanciija nakon 4 minute. Promjena absorbancije, izračunava se kao razlika konačne vrijednosti absorbancije reakcijske smjese nakon 4 minute i absorbancije FRAP reagensa prije dodatka uzorka, te se uspoređuje s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda. Kao standard korišten je *Trolox*, a rezultati za FRAP otopina ekstrakata uspoređeni su s rezultatima za FRAP *Troloxa* i izraženi kao µM *Trolox* ekvivalenti (TE). Sva mjerenja izvršena su u 4 ponavljanja. Rezultati svih ispitivanja prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).



Slika 8.Ovisnost koncentracije Troloxa o absorbanciji FRAP reakcijske smjese nakon 4 minute.

2.4.2. DPPH metoda

DPPH metoda ili metoda *gašenja* slobodnih DPPH radikala u pravilu je nezaobilazna kod određivanja antioksidacijske aktivnosti čistih spojeva i/ili biljnih ekstrakata. Ljubičasto obojani radikal DPPH˙ jedan je od rijetkih stabilnih i komercijalno dostupnih organskih dušikovih radikala. Reakcija DPPH radikala sa antioksidansom (A), temelji se na redukciji DPPH radikala kojemu se donira atom vodika i tako nastaje DPPH-H i radikal antioksidansa (A˙). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala izračunava se preko postotka preostalog DPPH˙ koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Napredovanje reakcije se prati spektrofotometrom, a posljedica gašenja DPPH radikala je promjena boje iz ljubičaste u žutu boju (7, 12).

Reagensi:

- otopina DPPH radikala priprema se otapanjem 4 mg DPPH radikala u 100 mL etanola pri čemu se dobije intenzivno obojena ljubičasta otopina. Radni DPPH pripravlja se razrjeđivanjem otopine DPPH radikala etanolom, sve dok se ne postigne absorbancija otopine 1,2 (±0,002) pri 492 nm i to neposredno prije mjerenja.

Postupak određivanja:

U mikrotitarske pločice otpipetira se volumen od 290 μL radne otopine DPPH radikala i očita se absorbancija prije dodatka uzorka. Nakon toga, u otopinu DPPH radikala se doda 10 μL uzorka. Promjena absorbancijepri 492 nm očita se nakon jednog sata. Sve analize, odnosno mjerenja izvršena su u 4 ponavljanja. Antioksidacijska aktivnost, odnosno % inhibicije DPPH radikala računa se prema izrazu:

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

gdje je: $A_{C(0)}$ – absorbancija kontrole (otopina DPPH radikala) kod t = 0 minuta;

$A_{A(t)}$ – absorbancija reakcijske smjese nakon 1 h.

3. REZULTATI

3.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Tablica 3. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata zelene alge *Ulva lactuca* dobivenih primjenom FRAP metode

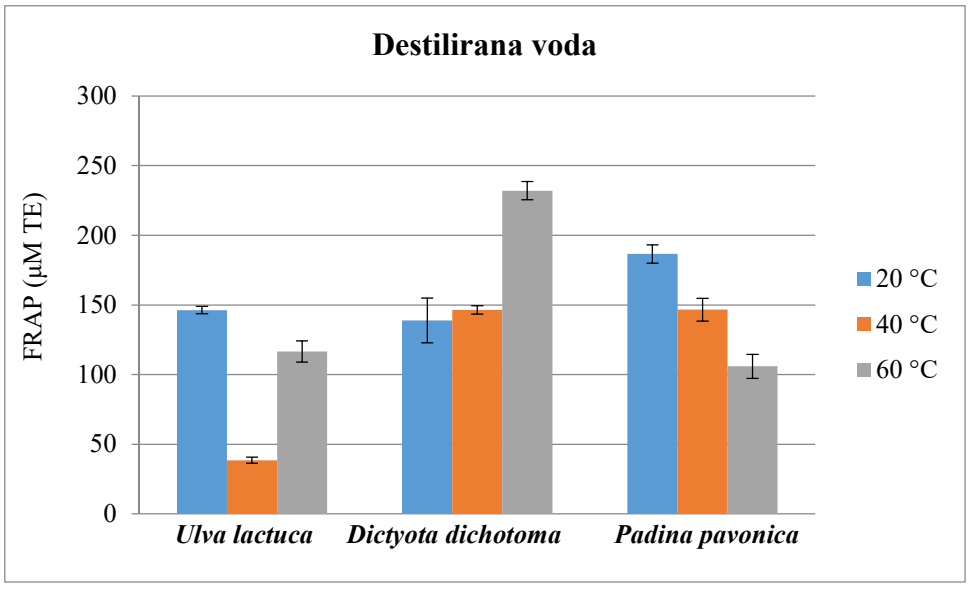
OTAPALO	TEMPERATURA (°C)	FRAP (μM TE)
Destilirana voda	20	146,25±2,65
	40	38,58±2,08
	60	116,58±7,51
Etanol	20	32,00±1,00
	40	27,67±2,31
	60	34,00±4,00
Aceton	20	48,67±2,08
	40	40,17±1,04
	60	45,33±1,15

Tablica 4. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata smeđe alge *Dictyota dichotoma* dobivenih primjenom FRAP metode

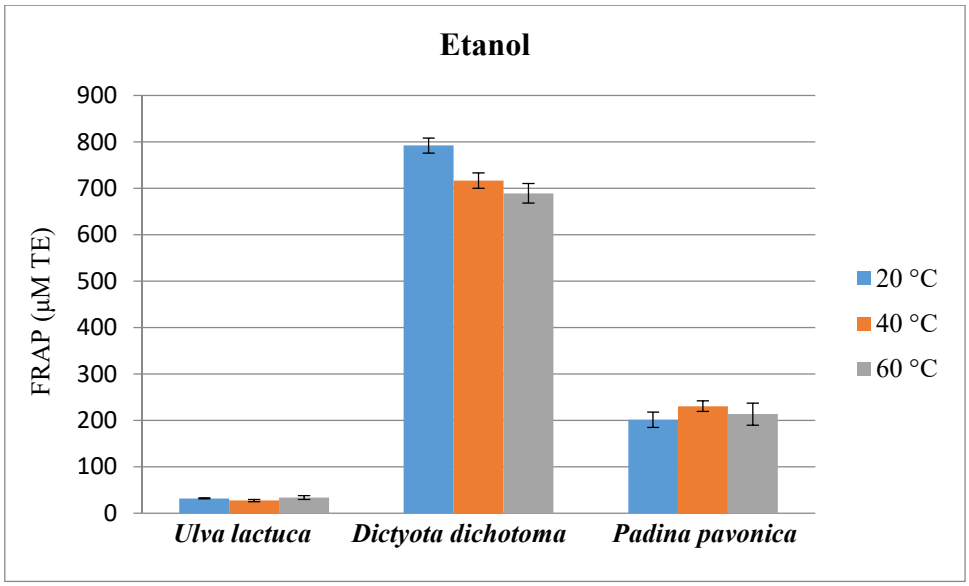
OTAPALO	TEMPERATURA (°C)	FRAP (μM TE)
Destilirana voda	20	138,83±16,07
	40	146,50±3,00
	60	232,00±6,56
Etanol	20	792,33±8,74
	40	717,00±16,52
	60	689,50±20,88
Aceton	20	1011,50±36,76
	40	843,17±23,71
	60	777,50±19,97

Tablica 5. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata smeđe alge *Padina pavonica* dobivenih primjenom FRAP metode

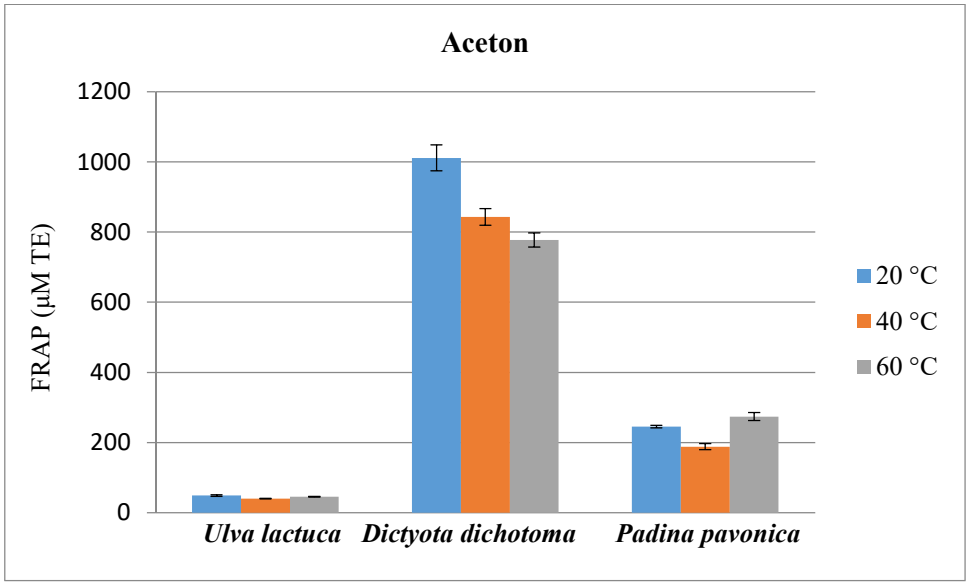
OTAPALO	TEMPERATURA (°C)	FRAP (µM TE)
Destilirana voda	20	186,58±6,51
	40	146,58±8,08
	60	105,92±8,62
Etanol	20	201,50±8,19
	40	230,83±11,50
	60	213,80±23,58
Aceton	20	245,33±3,21
	40	188,25±8,66
	60	274,00±11,27



Slika 9. Usporedni prikaz rezultataodređivanja redukcijskog kapaciteta vodenih ekstrakata jadranskih algi pri različitim temperaturama



Slika 10. Usporedni prikaz rezultataodređivanja redukcijskog kapaciteta etanolnih ekstrakata jadranskih algi pri različitim temperaturama



Slika 11. Usporedni prikaz rezultataodređivanja redukcijskog kapacitetaacetonskih ekstrakata jadranskih algi pri različitim temperaturama

3.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Tablica 6. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata zelene alge *Ulva lactuca* dobivenih primjenom DPPH metode

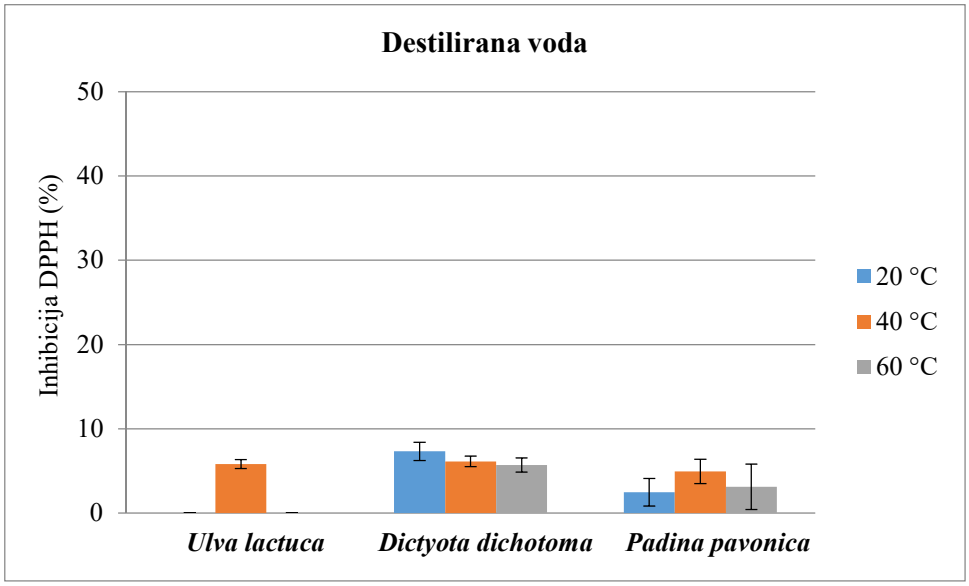
OTAPALO	**TEMPERATURA (°C)**	**DPPH (% inhibicije)**
Destilirana voda	20	0
	40	5,79±0,53
	60	0
Etanol	20	2,68±0,09
	40	1,26±0,34
	60	2,57±0,25
Aceton	20	1,39±0,69
	40	0,49±0,81
	60	0,45±1,19

Tablica 7. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata smeđe alge *Dictyota dichotoma* dobivenih primjenom DPPH metode

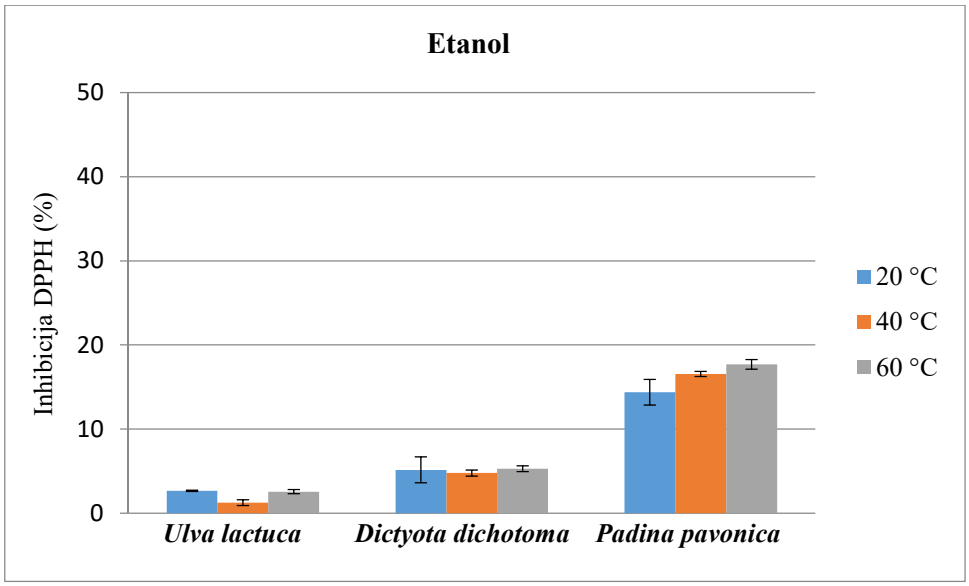
OTAPALO	**TEMPERATURA (°C)**	**DPPH (% inhibicije)**
Destilirana voda	20	7,32±1,09
	40	6,12±0,62
	60	5,68±0,84
Etanol	20	5,16±1,55
	40	4,80±0,36
	60	5,30±0,34
Aceton	20	5,85±0,76
	40	6,19±1,15
	60	5,94±0,95

Tablica 8. Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata smeđe alge *Padina pavonica* dobivenih primjenom DPPH metode

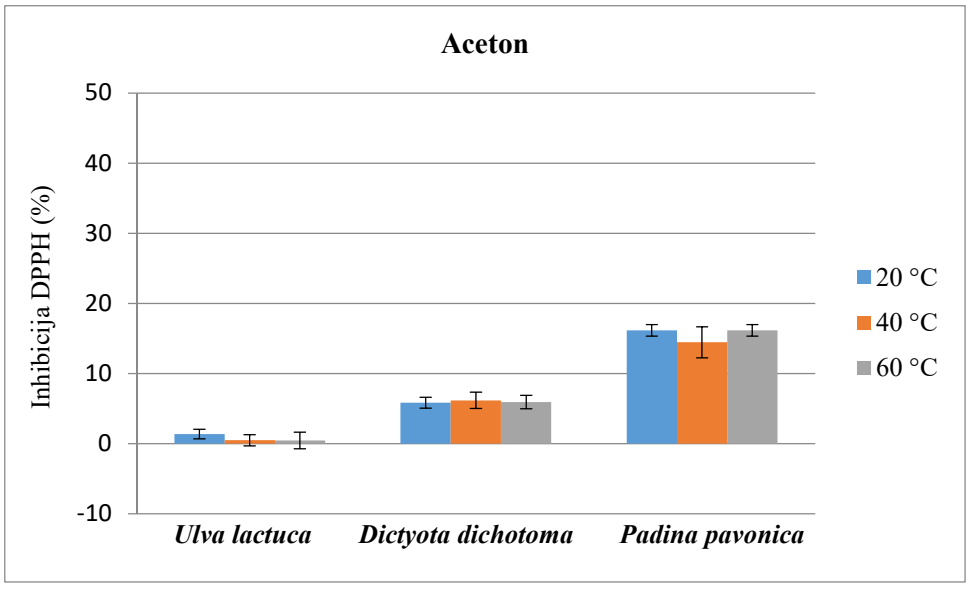
OTAPALO	TEMPERATURA (°C)	DPPH (% inhibicije)
Destilirana voda	20	2,46±1,62
	40	4,92±1,44
	60	3,11±2,70
Etanol	20	14,39±1,52
	40	16,56±0,30
	60	17,70±0,57
Aceton	20	16,17±0,81
	40	14,47±2,21
	60	16,17±0,83



Slika 12. Usporedni prikaz rezultata određivanja sposobnosti inhibicije molekula slobodnog radikala kod vodenih ekstrakata jadranskih algi pri različitim temperaturama



Slika 13. Usporedni prikaz rezultata određivanja sposobnosti inhibicije molekula slobodnog radikala kod etanolnih ekstrakata jadranskih algi pri različitim temperaturama



Slika 14. Usporedni prikaz rezultata određivanja sposobnosti inhibicije molekula slobodnog radikala kod acetonskih ekstrakata jadranskih algi pri različitim temperaturama

4. RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je odrediti antioksidacijski potencijal ekstrakata jadranskih algi pripravljenih u različitim otapalima i pri različitim temperaturama, pomoću dvije antioksidacijske metode, FRAP i DPPH.

Rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala ekstrakata algi dobivenih primjenom FRAP metode prikazani su u tablicama 3-5 i na slikama 9-11. Usporedbom FRAP vrijednosti za algu *U. lactuca* možemo uočiti da su vodeni ekstrakti, osobito oni pripravljeni pri 20 i 60 °C, imali najbolji antioksidacijski kapacitet, dok su etanolni ekstrakti ove alge uglavnom pokazivali niže FRAP vrijednosti (27,67 – 34,00 μM TE). Acetonski ekstrakti su imali nešto veće FRAP vrijednosti (40,17 – 48,67 μM TE) u odnosu na etanolne ekstrakte, no i dalje su bili dvostruko slabiji od vodenih ekstrakata pripravljenih pri 20 i 60 °C (tablica 3).

Za razliku od zelene alge, smeđa alga *D. dichotoma* je imala znatno veći antioksidacijski kapacitet. Iz tablice 4 vidljivo je da su u ovom slučaju vodeni ekstrakti bili najslabiji, dok su acetonski pokazali najbolji antioksidacijski kapacitet (pri 20 °C FRAP je iznosio 1011,50 μM TE). Etanolni ekstrakti su bili nešto slabiji u odnosu na acetonske.

Druga smeđa alga analizirana u ovom radu, alga *P. pavonica,* imala je slabiji antioksidacijski kapacitet u usporedbi s *D. dichotoma*. Ono što se može primijetiti jest da su najbolju antioksidacijsku snagu imali acetonski ekstrakti, kao i kod smeđe alge *D. dichotoma*, ali u ovom slučaju pri 60 °C FRAP vrijednost je iznosila samo 274,00 μM TE. Etanolni ekstrakti su imali sličnu aktivnost kao acetonski, kao najslabiji pokazali su se vodeni ekstrakti (tablica 5).

Usporedbom rezultata antioksidacijskog kapaciteta jadranskih algi (*Ulva lactuca, Dictyota dichotoma, Padina pavonica*) prikazanih na slikama 9-11 može se zaključiti da se među vodenim ekstraktima ne može izdvojiti niti jedna alga s najboljim ili najslabijim učinkom obzirom da je njihova aktivnost ovisila o temperaturi i vrsti otapala koje se koristilo u pripravi ekstrakata. U slučaju etanolnih i acetonskih ektrakata razmjerno je uočljiva razlika u aktivnosti analiziranih algi. Smeđa alga *D. dichotoma* imala je najbolji antioksidacijski učinak pri svim temperaturama dok je najslabiju antioksidacijsku snagu imala zelena alga *U. lactuca*.

Osim najboljeg učinka kod etanolnih i acetonskih ekstrakata alge *D. dichotoma* uočava se i utjecaj temperature na aktivnost pri čemu porastom temperature antioksidacijski kapacitet ekstrakata slabi.

Rezultati antioksidacijske aktivnosti određeni DPPH metodom ukazuju na slabu aktivnost analiziranih ekstrakata algi. U slučaju vodenih ekstrakata zelene alge *U. lactuca* pripravljenih pri 20 i 60 °C, postotak inhibicije iznosio je nula, dok je ista alga najbolji učinak, koji je opet bio gotovo zanemariv, pokazala u vodenom ekstraktu pripravljenom pri 40 °C (5,79 % inhibicije). U odnosu na zelenu algu, smeđa alga *P. pavonica* pokazala je najbolju inhibiciju i to osobito alkoholni i acetonski ekstrakti (tablice 6-8).

Za razliku od rezultata antioksidacijske metode određene FRAP metodom gdje se posebno istaknula alga *D. dichotoma*, DPPH metoda je pokazala da su najbolji učinak imali alkoholni i acetonski ekstrakti alge *P. pavonica* (slike 12-14). Ni u ovom slučaju usporedbom rezultata ne može se zaključiti imaju li temperatura i/ili otapalo utjecaj na antioksidacijski potencijal analiziranih ekstrakata jadranskih algi.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenih istraživanja i prezentiranih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Rezultati FRAP metode ukazuju na to da ekstrakti zelene alge *U. lactuca* pripravljenih na 40 °C imaju najslabiju antioksidacijsku aktivnost za razliku od ekstrakata smeđih algi, a posebno alge *D. dichotoma* koja pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost.
- Kod vodenih ekstrakata antioksidacijski učinak ovisi o temperaturi i vrsti otapala korištenim za pripravu ekstrakta.
- Kod ekstrakata alge *D. dichotoma* uočava se da porastom temperature slabi antioksidacijski kapacitet ekstrakata.
- Rezultati antioksidacijske aktivnosti određeni DPPH metodom ukazuju na slabu aktivnost analiziranih ekstrakata jadranskih algi.
- Također, DPPH metodom utvrdilo se da ekstrakti zelene alge *U. lactuca* imaju najslabiju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s smeđom algom *P. pavonica* koja je pokazala najbolju inhibiciju, osobito etanolni i acetonski ekstrakti.
- Usporedbom rezultata ne može se donijeti općeniti zaključak o utjecaju temperature i/ili otapala na antioksidacijski potencijal ekstrakata.

6. LITERATURA

1. Badarinath AV, Mallikarjuna Rao K, Madhu Sudhana Chetty C, Ramkanth S, Rajan TV, Gnanaprakash K. A Review on *In-vitro* Antioxidant Methods: Comparisions, Correlations and Considerations. Int. J. PharmTech Res. 2010;2(2):1276-1285.
2. Jakelić M. Jednostavni i parcijalno-linearni regresijski modeli primjenjeni na različitim svojstvima vodenih biljnih ekstrakata. Diplomski rad. Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2016.
3. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija- uzroci i posljedice. Med. Flumin. 2007;43:84-93.
4. Knez M. Antioksidansi. Završni rad. Osijek, Hrvatska: Studij kemije Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku;2014 (na hrvatskom jeziku).
5. Djelovanje antioksidansa na slobodni radikal, https://zena.rtl.hr/clanak/ostalo_na_temu_zdravlja/antioksidansi_jesu_li_nam_doista_potrebni/11233 (PRISTUPLJENO 30.10.2017.)
6. Puljak A, Perko G, Mihok D, Radašević H. Antioksidansi i oligoelmenti u starijih ljudi. Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik. Zagreb; 2004;10(52):98-102.
7. Prior RL, Xianli W, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. J. Agric. Food Chem. 2005;53(1):4290-4302.
8. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of Methods to Determine Anioxidant Capacities. Food Anal Methods. 2009;2:41-60.
9. FRAP reakcija, https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in-human-health/phytochemical-profile-of-honey (PRISTUPLJENO 31.10.2017.)
10. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavanoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. 2004;55:279-290 (na hrvatskom jeziku).
11. Wikipedia, Struktura ABTS, https://en.wikipedia.org/wiki/File:ABTS.png (PRISTUPLJENO 2.11.2017.)
12. Huang D, Boxin O, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. J. Agric. Food Chem. 2005;53(6):1841-1856
13. Buljeta I. Antioksidativni kapacitet i fizikalno-kemijski parametri meda od vriska (Satureja montana L.). Završni rad. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki

fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2005 (na hrvatskom jeziku).

14. Wikipedia, DPPH radikal, https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH (PRISTUPLJENO, 31.10.2017.)
15. Wikipedia, https://hr.wikipedia.org/wiki/Alge (PRISTUPLJENO 11.9.2018.)
16. Wikipedia, http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/alge (PRISTUPLJENO 11.9.2018.)
17. Blažina M, Magić L. Procjena potencijala jadranskih algi za kogeneracijsku proizvodnju biogoriva 3. generacije. Centar za istraživanje mora/Zeleni festival; Zagreb; 2017 (na hrvatskom jeziku).
18. Wikipedia, https://hr.wikipedia.org/wiki/Morska_salata (PRISTUPLJENO 05.09.2018.)
19. Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Ulva_lactuca (PRISTUPLJENO 05.09.2018.)
20. Wikipedia, http://www.waterwereld.nu/dichotoma.php (PRISTUPLJENO 05.09.2018.)
21. Wikipedia, https://hr.wikipedia.org/wiki/Paunov_rep (PRISTUPLJENO 05.09.2018.)
22. Dang TT, Bowyear MC, Altena IAV, Scarlett CJ. Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. Int. J. Food Sci. Technol. 2018;53:174-181.
23. Fellah F, Louaileche H, Debhi-Zebboudj A, Touati N. Seasonal variations in the phenolic compound content and antioxidant activities of three species of seaweeds from Tiskerth islet, Bejaia, Algeria. J. Mater. Environ. Sci. 2017;8(12):4451-4486.
24. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic acid Concentration. Methods Enzym. 1999;299,15-27.