Utjecaj načina ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet makroalgi (ORAC metoda)

Klanac, Anita

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:167:287826

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET MAKROALGI (ORAC METODA)

ZAVRŠNI RAD

ANITA KLANAC

Matični broj: 20

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET MAKROALGI (ORAC METODA)

ZAVRŠNI RAD

ANITA KLANAC

Matični broj: 20

Split, rujan 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF
FOOD TECHNOLOGY

THE IMPACT OF THE EXTRACTION MODE ON THE ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF MACROALGAE (ORAC METHOD)

BACHELOR THESIS

ANITA KLANAC

Parent number: 20

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

UTJECAJ NAČINA EKSTRAKCIJ NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET MAKROALGI (ORAC METODA)

Anita Klanac, 20

Sažetak:
Pod utjecajem različitih čimbenika u organizmu se stvaraju štetni slobodni radikali, koji predstavljaju stalnu prijetnju ljudskom organizmu. Kako bi se obranio od istih organizam u normalnom fiziološkom stanju proizvodi antioksidanse, molekule sposobne da spriječe oksidaciju drugih molekula. Brojnim istraživanjima pokazalo se da morske alge imaju značajna antioksidacijska svojstva u borbi protiv slobodnih radikala i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje.
Za određivanje antioksidacijske sposobnosti nekog uzorka koriste se različite metode zasnivane na različitim mehanizmima djelovanja na određenu vrstu slobodnih radikala. U cilju određivanja antioksidacijskog kapaciteta uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog peroksil radikala u ovom radu se koristio standardizirani test pod nazivom ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Analizirani su ekstrakti dviju smeđih algi, *Padina pavonica* (L.) Thivy i *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux, te zelene makroalge *Ulva lactuca* L., pripravljeni korištenjem različitih otapala (voda, etanol i aceton) pri različitim temperaturama (20, 40 i 60 °C).
Dobiveni rezultati ukazali su na najbolju antioksidacijsku aktivnost ekstrakata pripravljenih u etanolu, osobito ekstrakata alge *D. dichotoma*. Svi ekstrakti zelene alge *U. lactuca* pokazali su znatno nižu antioksidacijsku aktivnost. Također rezultati ukazuju na različitosti u antioksidacijskom potencijalu ekstrakata ovisno o primijenjenoj temperaturi u postupku ekstrakcije, stoga se ne može donijeti zaključak o utjecaju temperature ekstrakcije na bolji ili lošiji antioksidacijski potencijal ekstrakata.

Ključne riječi: slobodni radikali, antioksidansi, morske alge, ORAC metoda

Rad sadrži: 27 stranica, 13 slika, 5 tablica, 22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul – predsjednik Povjerenstva
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić – član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - mentor

Datum obrane: 26. rujna 2018. god

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Orientation: nutritional technology

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

THE IMPACT OF EXTRACTION ON THE ANTIOXIDIC CAPACITY OF MACROALGAE (ORAC METHOD)

Anita Klanac, 20

Abstract:
Free radicals are created under the influence of various factors in the body and they represent a permanent danger to the human organism. To protect themselves from them, organism in normal physiological state produce antioxidants, molecules capable of inhibiting the oxidation of other molecules. Numerous studies have shown that marine algae have significant antioxidant properties in the fight against free radicals and positive effect on human health.
For determination of the antioxidant capacity of the samples, various antioxidant methods, based on different mechanisms of action on a particular type of free radicals, are used. In order to determine the antioxidant capacity of the sample by monitoring the inhibition of the action of the free peroxyl radical in this paper, a standardized test called ORAC (Oxygen Absorption Capacity) was used. The extracts of two brown algae, *Padina pavonica* (L.) Thivy and *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux and green macroalgae of *Ulva lactuca* L. prepared using different solvents (water, ethanol and acetone) and at different temperatures (20, 40 and 60°C) were analysed.
The obtained results showed the best antioxidant activity of ethanol extracts, in particular *D. dichotoma* extracts. All extracts of the green algae *U. lactuca* showed significantly low antioxidant activity. Also, the results indicate differences in the antioxidant potential of extracts depending on the applied extraction temperature, so general conclusion about the positive or negative effect of the applied temperature on the antioxidant properties of the extract can not be brought.

Keywords: free radicals, antioxidants, sea algae, ORAC method

Thesis contains: 27 pages, 13 figures, 5 tables, 22 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: 26th September 2018.

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

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

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

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak završnog rada bio je odrediti antioksidacijski kapacitet ekstrakata (pripravljenih u različitim otapalima, pri različitim temperaturama) jadranskih algi, *Ulva lactuca* L., *Padina pavonica* (L.) Thivy i *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux, korištenjem ORAC metode.

SAŽETAK

Pod utjecajem različitih čimbenika u organizmu se stvaraju štetni slobodni radikali, koji predstavljaju stalnu prijetnju ljudskom organizmu. Kako bi se obranio od istih organizam u normalnom fiziološkom stanju proizvodi antioksidanse, molekule sposobne da spriječe oksidaciju drugih molekula. Brojnim istraživanjima pokazalo se da morske alge imaju značajna antioksidacijska svojstva u borbi protiv slobodnih radikala i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje.

Za određivanje antioksidacijske sposobnosti nekog uzorka koriste se različite metode zasnivane na različitim mehanizmima djelovanja na određenu vrstu slobodnih radikala. U cilju određivanja antioksidacijskog kapaciteta uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog peroksil radikala u ovom radu se koristio standardizirani test pod nazivom ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Analizirani su ekstrakti dviju smeđih algi, *Padina pavonica* (L.) Thivy i *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux, te zelene makroalge *Ulva lactuca* L., pripravljeni korištenjem različitih otapala (voda, etanol i aceton) pri različitim temperaturama (20, 40 i 60 °C).

Dobiveni rezultati ukazali su na najbolju antioksidacijsku aktivnost ekstrakata pripravljenih u etanolu, osobito ekstrakata alge *D. dichotoma*. Svi ekstrakti zelene alge *U. lactuca* pokazali su znatno nižu antioksidacijsku aktivnost. Također rezultati ukazuju na različitosti u antioksidacijskom potencijalu ekstrakata ovisno o primijenjenoj temperaturi u postupku ekstrakcije, stoga se ne može donijeti zaključak o utjecaju temperature ekstrakcije na bolji ili lošiji antioksidacijski potencijal ekstrakata.

Ključne riječi: slobodni radikali, antioksidansi, morske alge, ORAC metoda

SUMMARY

Free radicals are created under the influence of various factors in the body and they represent a permanent danger to the human organism. To protect themselves from them, organism in normal physiological state produce antioxidants, molecules capable of inhibiting the oxidation of other molecules. Numerous studies have shown that marine algae have significant antioxidant properties in the fight against free radicals and positive effect on human health.

For determination of the antioxidant capacity of the samples, various antioxidant methods, based on different mechanisms of action on a particular type of free radicals, are used. In order to determine the antioxidant capacity of the sample by monitoring the inhibition of the action of the free peroxyl radical in this paper, a standardized test called ORAC (Oxygen Absorption Capacity) was used. The extracts of two brown algae, *Padina pavonica* (L.) Thivy and *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux and green macroalgae of *Ulva lactuca* L. prepared using different solvents (water, ethanol and acetone) and at different temperatures (20, 40 and 60°C) were analysed.

The obtained results showed the best antioxidant activity of ethanol extracts, in particular *D. dichotoma* extracts. All extracts of the green algae *U. lactuca* showed significantly low antioxidant activity. Also, the results indicate differences in the antioxidant potential of extracts depending on the applied extraction temperature, so general conclusion about the positive or negative effect of the applied temperature on the antioxidant properties of the extract can not be brought.

Keywords: free radicals, antioxidants, sea algae, ORAC method

SADRŽAJ

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. SLOBODNI RADIKALI 2

1.1.1. Reaktivni oblici kisika (ROS) 4

1.1.2. Reaktivni oblici dušika (RNS) 6

1.2. ZAŠTITA OD DJELOVANJA SLOBODNIH RADIKALA 7

1.3. OKSIDACIJSKI STRES 7

1.3.1. Peroksidacija lipida 8

1.4. ORAC metoda 9

1.4.1. Prednosti i nedostatci ORAC metode 9

1.5. MORSKE ALGE 10

1.5.1. *Padina pavonica* (L.) Thivy 11

1.5.2. *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux 11

1.5.3. *Ulva lactuca* L. 11

1.5.4. Biološka aktivnost 12

1.5.5. Antioksidacijska svojstva algi (14) 12

2. EKSPERIMENTALNI DIO 14

2.1. KEMIKALIJE 14

2.2. UREĐAJI 14

2.3. UZORCI 14

2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI 15

2.4.1. ORAC metoda 15

3. REZULTATI 17

3.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKIH SVOJSTAVA MAKROALGI ORAC METODOM 17

4. RASPRAVA 22

5. ZAKLJUČAK 24

6. LITERATURA 25

UVOD

Pojmove kao što su slobodni radikali, oksidacijski stres i antioksidansi posljednjih godina sve češće susrećemo i najčešće se povezuju s pozitivnim učincima hrane na naš organizam. Posebno su zanimljivi slobodni radikali, molekule koje se stvaraju u našem organizmu u normalnim fiziološkim funkcijama i kao takve imaju važnu ulogu. S druge pak strane, slobodni radikali u organizam dolaze i djelovanjem vanjskih čimbenika poput UV zračenja, vremenskih prilika, okolišnih zagađenja, itd., te stoga predstavljaju stalnu prijetnju našem organizmu.

Nagomilavanje štetnih slobodnih radikala ima nepovoljan učinak na ljudsko zdravlje i dovodi do pojave oksidacijskog stresa, dok antioksidansi štite organizam od njihovog štetnog djelovanja.

U novije vrijeme sve je veći interes za biljnim ekstraktima i spojevima prirodnog podrijetla koji posjeduju dobra antioksidacijska svojstva. Jedni od izvora bioaktivnih spojeva su i morske alge. Osim što su to nisko kalorijske namirnice, one sadrže izuzetno vrijedne fitokemikalije koje su zaslužne za njihova dobra antioksidacijska svojstva i pozitivni utjecaj na ljudsko zdravlje.

Kako bi se odredila sposobnost nekog uzorka u borbi protiv slobodnih radikala koriste se brojne antioksidacijske metode. Svaku od tih metoda karakterizira određeni mehanizam djelovanja na određenu vrstu slobodnih radikala. Tako se npr. za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog peroksil radikala koristi standardizirani test pod nazivom ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda.

U ovom radu je ORAC metodom određen antioksidacijski kapacitet ekstrakata algi *Ulva lactuca* L., *Padina pavonica* (L.) Thivy i *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux pripravljenim u različitim otapalima i pri različitim temperaturama.

1. OPĆI DIO

1.1. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su atomske ili molekulske vrste koje u vanjskoj elektronskoj ljusci posjeduju jedan ili više nesparenih elektrona. Oni mogu donirati ili prihvatiti elektron od drugih molekula i stoga se ponašaju kao oksidansi ili reducensi (1). Manjak elektrona i težnja za davanjem ili uzimanjem istih, čini slobodne radikale visoko reaktivnim, te u odnosu na slične ione nestabilnim molekulama. Upravo zbog reaktivnosti iznimno je važno držati pod kontrolom njihovo nastajanje. Slobodni radikali imaju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima uključujući metaboličke puteve, signalizaciju stanica, imunološki odgovor i razne patološke procese. Otkrivanje i kvantificiranje ovih vrsta važno je za bolje razumijevanje normalnih i patofizioloških funkcija na staničnoj i tkivnoj razini (2).

U našem organizmu svi slobodni radikali koji se pojavljuju su endogenog ili egzogenog podrijetla. Endogeni nastaju kao posljedica raznih upala, mentalnog stresa, infekcija, raka ili putem prirodnog procesa starenja. S druge strane, egzogeni slobodni radikali iz okoliša u ljudsko tijelo ulaze udisanjem dima cigareta, uzimanjem pojedinih lijekova i slično (3).

Biološki sustav je izrazito bogat slobodnim radikalima od kojih je najjednostavniji primjer atom vodika koji posjeduje samo jedan nespareni elektron. Nadalje, dvoatomna molekula kisika sa dva nesparena elektrona se također smatra slobodnim radikalom. U skupinu radikala, zbog svoje elektronske konfiguracije, spadaju i ioni prijelaznih metala poput kobalta, bakra, željeza, itd. Ipak, biološki najznačajniji slobodni radikali su reaktivni oblici kisika (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*) u koje ubrajamo radikale kisika i reaktivne neradikalne derivate kisika (tablica 1) (4).

Tablica 1. *Reaktivni oblici kisika - ROS* (4)

RADIKALI	NERADIKALI
Superoksidni, $O_2^{\cdot-}$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Hidroksilni, $^{\cdot}OH$	Hipokloritna kiselina, $HOCl$
Peroksilni, $R^{\cdot}O_2$	Ozon, O_3
Alkoksilni, $R^{\cdot}O$	Singletni kisik, $^1\Delta gO_2$
Hidroperoksilni, $H^{\cdot}O_2$	Peroksinitrit, $ONOO^-$

Osim već spomenutih reaktivnih oblika kisika, drugi osnovni oblici su reaktivni oblici dušika (RNS, *engl. Reactive Nitrogen Species*) (tablica 2).

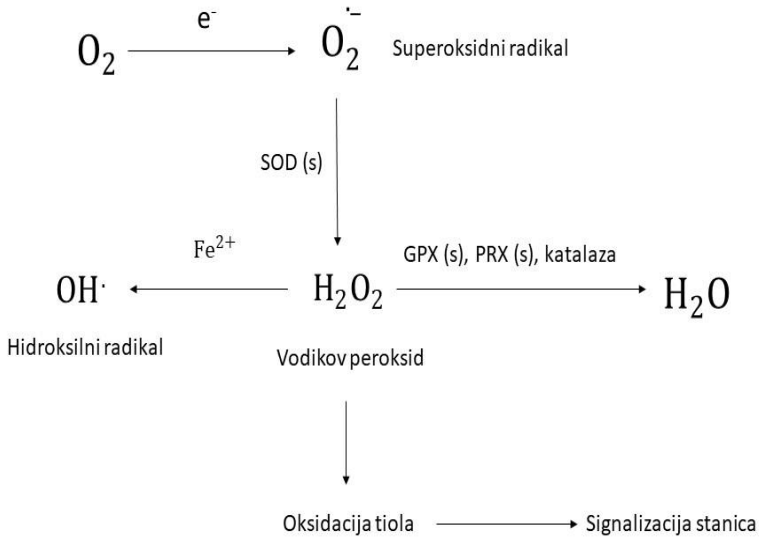
Tablica 2. *Reaktivni oblici dušika – RNS* (4)

RADIKALI	NERADIKALI
Dušikov (II) oksid, $^{\cdot}NO$	Nitritna kiselina, HNO_2
Dušikov (IV) oksid, $^{\cdot}NO_2$	Dušikov (III) oksid, N_2O_3
	Dušikov (IV) oksid, N_2O_4
	Nitronium ion, NO_2^+
	Peroksinitrit, $ONOO^-$
	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
	Alkil peroksinitrit, $ROONO$
	Nitroksilni anion, NO^-
	Nitrozilni kation, NO^+
	Nitrilni klorid, NO_2Cl

ROS i RNS su pojmovi koji opisuju slobodne radikale i druge neradikalne reaktivne derivate. Radikali su manje stabilni od neradikalnih vrsta i njihova reaktivnost je veća (5).

1.1.1. Reaktivni oblici kisika (ROS)

Slobodni radikali koji sadrže kisik, uz svoju iznimnu reaktivnost, sposobni su u membrani stanica i jezgri uništiti biološki važne molekule kao što su DNA, proteini, lipidi i ugljikohidrati. Time dolazi do oštećenja stanica i pojedinih homeostaznih poremećaja (1).



Slika 1. *Nastajanje reaktivnih oblika kisika* (7)

Superoksidni ion **($O_2^{\cdot-}$)** je važan u mnogim slučajevima biološke toksičnosti kisika. Nastaje kada se molekuli kisika prilikom susreta sa snažnim redukcijskim sredstvom poput metala, doda jedan elektron. Uslijed dodatka elektrona dolazi do povećanja reaktivnosti zbog slabljenja jakosti kovalentne veze. Superoksidni radikali neprekidno nastaju, a jedan od glavnih izvora je respiracijski lanac u kojem, tzv. „curenjem“ elektrona s ubikinona na kisik, 1-3% kisika prelazi u superoksidni radikal. Svi ti novonastali radikali u respiracijskom lancu, tijekom transporta elektrona mogu uzrokovati oštećenja na mitohondrijskim proteinima, lipidima i DNA. Superoksidni radikali mogu nastati i tijekom transporta kisika, biotransformacije ksenobiotika (lijekovi, droge, itd.) i uz pomoć enzima iz skupine oksidaza (4).

Hidroksilni radikal (**$^{\cdot}OH$**) kao najreaktivniji slobodni radikal kisika u biološkom sustavu, može stupiti u reakcije sa velikim brojem staničnih komponenti. Na primjer, može inicirati reakciju lipidne peroksidacije, kemijski mijenjati purinske i pirimidinske baze u DNA, napadati membranske lipide, itd. (4).

$^{\cdot}OH$ nastaje u Fentonovoj reakciji koja je katalizirana prijelaznim metalima i koja inače uzrokuje oštećenja stanica. Za oštećenje uzrokovano kisikom može biti odgovorno željezo, koje se iz slobodnog oblika Fe^{3+} kataliziran slobodnim radikalima reducira u Fe^{2+}, odnosno oblik aktivan u spomenutoj reakciji.

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \text{ intermedijarni kompleks} \rightarrow Fe(III) + OH^- + {}^{\cdot}OH$$

Još jedan od načina nastajanja $^{\cdot}OH$ je Haber Weissova rekcija koja, osim ionima željeza, može biti katalizirana i ionima bakra.

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + {}^{\cdot}OH \quad (4)$$

Singletni kisik (**$^1\Delta gO_2$**) se pojavljuje kao još jedan vrlo reaktivni neradikalni oblik kisika koji ima umjereno dug životni vijek (4). Najčešće se proizvodi u foto osjetljivim reakcijama, dok se s druge strane u biološkom sustavu generira u reakciji hipokloritne kiseline i vodikovog peroksida. U odnosu na ostale radikale, zanemarujući superoksidni, mnogo selektivnije reagira sa mnogim organskim supstratima, dobivajući tako hidroperokside (6).

Hipokloritna kiselina (**HOCl**) se stvara uz pomoć enzima mijeloperoksidaze (MPO) u aktiviranim neutrofilima.

$$H^+ + Cl^- + H_2O_2 \rightarrow HOCl + H_2O$$

Kiselina može klorirati DNA baze, oksidirati NAD(P)H, itd. Ima mogućnost prolaska kroz membranu, te na taj način može i negativno utjecati na membranske proteine (oštetiti ih). U njezinom prisustvu dolazi do otpuštanja metalnih iona iz proteina (4).

Biološki sustavi stvaraju ***vodikov peroksid*** (**H_2O_2**) kao jedini radikal koji se smatra slabim oksidansom i reducirajućom tvari. On sudjeluje stvaranju reaktivnog hidroksilnog radikala, reakcijom homolitičke fisije uz prisustvo UV svjetlosti (4).

1.1.2. Reaktivni oblici dušika (RNS)

Intenzivnim istraživanjem dušikovog oksida (NO) i njegovog metabolizma došlo je do potrebe i proučavanjem reaktivnih dušikovih oblika (RNS). RNS obuhvaća širok raspon spojeva različitih karakteristika (8).

Posljednjih godina otkrivene su promjene koje se odnose na biokemiju slobodnih radikala, te širok spektar njihovih novih kemijskih i fizikalnih svojstava. Postalo je jasno da radikali nisu nužno kratkotrajni i reaktivni te da njihova biološka svojstva nisu uvijek tako štetna. Pravi primjer toga je upravo ***dušikov (II) oksid*** ($^{\cdot}\mathbf{NO}$) koji ima relativno specifične funkcije. Osim što nije izrazito reaktivan, potpomaže i važne fiziološke funkcije. (8) $^{\cdot}NO$ se enzimatski sintetizira pomoću NO sintaze. U usporedbi sa $O_2^{\cdot-}$ i $HO^{\cdot}$, ima znatno duži poluživot, te ih stabilizira upravo stupajući u reakcije s njima. Stoga je predloženo da $^{\cdot}NO$ može funkcionirati kao tzv. „čistač“ slobodnih radikala i njegove vrlo niske doze u staničnim membranama mogu inhibirati lipidnu peroksidaciju. Velika stabilnost mu omogućava prolaz kroz stanične membrane te prijenos signala u stanicama (9).

S druge strane, kod niskih razina glutationa (npr. kod procesa starenja) prekomjerne količine $^{\cdot}NO$ mogu nitrozilirati proteine te uzrokovati njihovu disfunkciju ili reagirati s drugim reaktivnim molekulama te tako oblikovati neke druge RNS. Da bi se to spriječilo, glavni način uklanjanja $^{\cdot}NO$ je procesom konjugacije pomoću glutationa (9).

Reakcijom dušikovog monoksida (NO) sa $O_2^{\cdot-}$ nastaju ***peroksinitriti*** ($\mathbf{ONOO^-}$). Pri iznimno velikoj koncentraciji NO, brzina reakcije je veća. Istraživanja su pokazala da peroksinitriti iniciranjem transformacije masnih kiselina kroz peroksidaciju, nitriranjem i sličnim procesima, imaju važnu ulogu u oksidacijskom stresu (9).

Dušikov dioksid ($^{\cdot}\mathbf{NO_2}$) je spoj koji također jednim dijelom može doprinijeti iniciranju oksidativnih oštećenja u tkivima (9).

1.2. ZAŠTITA OD DJELOVANJA SLOBODNIH RADIKALA

Slobodni radikali i druge reaktivne vrste sudjeluju u brojnim kliničkim oboljenjima kao što su bolesti srca i kardiovaskularnog sustava (ateroskleroza, hipertenzija), bolesti pluća (hipoksija, utjecaj pušenja), bolesti bubrega (nefrotoksičnost metalnim ionima), oboljenja mozga (Parkinsonova bolest), bolesti vida (fotična rinopatija), bolesti gastrointestinalnog trakta (oralno trovanje željezom), bolesti crvenih krvnih stanica (malarija, Frankonijeva anemija), karcinomi, starenje, itd. (4).

Osnovnu funkciju u obrani organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala preuzimaju antioksidansi, koji onemogućavaju oksidativne reakcije. Da bi njihovo djelovanje bilo učinkovito trebaju biti dobri *hvatači* slobodnih radikala, imati mogućnost smanjivati lokalnu koncentraciju kisika, uklanjati perokside i sl. Neki od vrlo efikasnih antioksidansa su: vitamini C i E, ubikinon, mokraćna kiselina, β-karoten, flavonoidi, itd. (4).

1.3. OKSIDACIJSKI STRES

U normalnim metaboličkim uvjetima uvijek postoje određeni sustavi koji pružaju djelotvornu zaštitu od slobodnih radikala. No, uslijed nedostatka antioksidansa, nagomilavanja oštećenih makromolekula i sličnih promjena, obrambeni mehanizmi zataje, stoga pojedine stanice, tkiva ili čak cijeli organizam preplave slobodni radikali i nastane patološko stanje pod nazivom oksidacijski stres (4).

Prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala dolazi do gubitka ravnoteže i ne mogućnosti stanice da iste razgradi, a sve skupa rezultira promjenama koje su vezane za oštećenje pojedinih stanica. Promjenu ravnoteže mogu uzrokovati različiti procesi koji potiču stvaranje ROS i RNS (4). Oksidacijski stres osim što je povezan sa oštećenjem širokog raspona molekularnih vrsta (lipidi, proteini), kratkoročno se može pojaviti i u tkivima ozlijeđenim traumom, infekcijom, prekomjernom tjelovježbom, itd. Ta tkiva potom utječu na povećanu proizvodnju enzima koji su uključeni u nastajanje ROS (1).

Jedno od važnijih negativnih utjecaja ROS-a je oštećenje DNA koje uzrokuje mutaciju ili smrt stanice, oštećenja proteina te pojavu kroničnih i akutnih poremećaja koji nastaju putem lipidne peroksidacije. Stanice za zaštitu od štetnog djelovanja ROS-a

stvaraju enzimske (Cu/Zn, glutation peroksidaze, itd.) i ne-enzimske (vitamin E i C, β-karoten, itd.) antioksidanse koji uklanjaju i/ili obnavljaju oksidirane molekule. Bez obzira na staničnu antioksidativnu zaštitu, učinkovitost stvaranja antioksidansa se tijekom starenja organizma može smanjiti ili u potpunosti nestati, stoga procesi stvaranja ROS u slučaju oslabljenih mogućnosti detoksifikacije antioksidansa mogu dovesti do ireverzibilnih oštećenja makromolekula. U tom slučaju pojava lipidne peroksidacije i stvaranje reaktivnih aldehida ima presudnu ulogu (4).

1.3.1. Peroksidacija lipida

U normalnim biološkim uvjetima, procesom ne-enzimatske oksidacije molekula kisika oduzima elektrone drugim molekulama te na taj način potiče nastanak slobodnih radikala. Potom stvoreni radikali napadaju višestruko nezasićene masne kiseline, što u konačnici dovodi do lipidne peroksidacije (10).

Djelovanjem ROS-a na nezasićene masne kiseline dolazi do pucanja slabe dvostruke veze između ugljika i vodika. Vodik se odvaja tvoreći novi tzv. alkil radikal koji se uz prisustvo kisika oksidira i tako nastaje peroksilni radikal ($R^{\cdot}O_2$). On dalje ulazi u reakcije sa masnim kiselinama, nakon čega se lipidni hidroperoksidi (LOOH), koji nastaju tim reakcijama, razgrađuju uz katalizatore Fe^{2+} i Cu^{+} te tvore alkoksi ($R^{\cdot}O$) i hidroksilne radikale ($^{\cdot}OH$) (4).

Reakcije lipidne peroksidacije narušavaju temeljnu strukturu i značajke masnih kiselina, te time automatski i cjelovitost biološke membrane, čiji glavni dijelovi su upravo ove komponente. Reaktivni aldehidi (4-hidroksialkenali i drugi srodni nezasićen aldehidi), kao završni produkti lipidne peroksidacije, zbog relativno dugog života opasniji su za stanice od samih slobodnih radikala. Aldehidi difundiraju te time šire područje štetnog djelovanja (4).

1.4. ORAC metoda

ORAC metoda predstavlja standardizirani test kojeg su razvili znanstvenici Ghiselli i Glazer. Uz pomoć testa se reakcijskim mehanizmom prijenosa atoma vodika (HAT, engl. *Hydrogen Atom Transfer*) mjeri stupanj inhibicije peroksil radikala ($R^{\cdot}O_2$). U osnovnom testu peroksilni radikal reagira sa fluorescentnom probom da bi formirao ne-fluorescentni produkt. Fluorescentna proba zapravo predstavlja staničnu molekulu koja je od strane peroksilnog radikala izložena oksidaciji. Naknadno dodani antioksidans se potom natječe sa probom za radikale, što u posljedici inhibira i usporava oksidaciju same probe. Prva verzija ORAC testa upotrijebila je B-fikoeritrin (B-PE), protein izoliran iz crvene alge *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägel. Međutim, naknadno je ustanovljeno da upotreba B-PE ima određene nedostatke, stoga se preferiraju stabilnije i manje reaktivnije fluorescentne probe kao što je fluorescein. ORAC test prati reakciju dulji vremenski period, od najmanje 30 minuta, a ukupni antioksidacijski učinak je predstavljen kao površina ispod krivulje mjerenja intenziteta fluorescencije. Treba napomenuti da je ovo jedina metoda koja daje informaciju o zaštitnom učinku antioksidansa tijekom dužeg vremenskog perioda (11). Prilikom reakcije probe sa peroksilnim radikalom dolazi do slabljenja intenziteta fluorescencije tijekom vremena.

Kao standardna otopina u testu se koristi u vodi topivi analog vitamina E, odnosno sintetski antioksidans, pod nazivom Trolox (12).

1.4.1. Prednosti i nedostatci ORAC metode

Svakim danom se javlja sve veći interes za korištenjem i mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta u biološkim uzorcima i hrani. ORAC metoda je samo jedna u nizu antioksidacijskih metoda koja se koristi upravo u te svrhe. S druge strane ističe se kao jedina metoda koja kombinira stupanj i trajanje inhibicije oksidacije u jednu vrijednost. U hrani ORAC mjeri aktivnost lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa, a također može mjeriti i antioksidacijski kapacitet krvne plazme, s kojim nam daje podatke o promjeni antioksidacijskog kapaciteta krvi nakon konzumacije različitih namirnica (13). Nadalje, ORAC je standardizirana metoda, što znači da nam omogućuje navođenje na ispravnu upotrebu testova, usporedbu prehrambenih proizvoda, određivanje standarda

kvalitete hrane i dr. Jedan od osnovnih nedostataka je dugo trajanje testa, no to se zanemaruje s obzirom na veliki broj uzoraka koji se mogu istovremeno ispitati (12).

1.5. MORSKE ALGE

Općenito pod pojmom algi razlikujemo makroalge i mikroalge. Makroalge su raznolika skupina morskih organizama koji su razvili složene i specifične metaboličke putove kako bi preživjeli u vrlo konkurentnom morskom okolišu. Postoje tri različite vrste makroalgi. To su crvene, smeđe i zelene (14).

Crvene vrste algi u odnosu na smeđe i zelene sadrže visoke razine proteina. Najveći utjecaj na sadržaj proteina i aminokiselina ima okoliš i njegove varijacije, pa on stoga najviše ovisi o mjestu na kojem su alge pronađene te godišnjem dobu u kojem su uzorkovane (14).

Smeđe alge imaju malen udio proteina, ali zato u svom sastavu imaju veću količinu polifenola i polisaharida (14). U smeđim algama je udio fenolnih spojeva vrlo visok i oni su uglavnom odgovorni za njihovu antioksidacijsku aktivnost. Dokazano je da smeđe alge imaju relativno značajno viši antioksidacijski potencijal od zelenih i crvenih (15). Neke od značajnih smeđih algi, koje su ujedno i korištene u eksperimentalnom dijelu rada su *Padina pavonica* (L.) Thivy i *Dictyota Dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux.



a) b) c)

Slika 2. *Istraživane morske alge*: a) *P. pavonica* (16)*;* b) *D. dichotoma* (17)*;* c) *U. lactuca* (18)

Zelene morske alge sa sadržajem proteina preko 20% su potencijalni izvor komercijalno korisnih biljnih bjelančevina, a neke vrste sadrže i visoku koncentraciju vitamina i minerala (14). *Ulva lactuca* L. je zelena alga koja je korištena u eksperimentalnom dijelu ovo rada.

1.5.1. *Padina pavonica* (L.) Thivy

P. pavonica, smeđa alga iz obitelji Dictyophyceae, rasprostranjena je širom toplih i tropskih obala, a najčešće je pronalazimo u Sredozemnom moru i Atlanskom oceanu. Tijelo alge je smeđe-bijele boje, a držač koji se sastoji od fleksibilnih rizoida služi joj za površinsku vezanost. Brojnim istraživanjima otkrivena su njezina različita svojstva te se stoga koristi kao sirovina za proizvodnju biodizela, kao bioindikator onečišćenja, antioksidans, antibakterijsko sredstvo i dr. (19).

1.5.2. *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux

Vrsta smeđe alge pod nazivom *D. dichotoma* česti je stanovnik Jadranskoga mora. Alga pripada porodici Dictyophyceae, a iznimno je značajna po proizvodnji sulfatiranih polisaharida. Poznata je njezin uporaba u ljudskoj i životinjskoj prehrani, te proizvodnji alginata (20).

1.5.3. *Ulva lactuca* L.

Tanka, plosnata, rastezljiva zelena do tamnozelena alga pod nazivom *U. lactuca* rasprostranjena je širom svijeta. Nazivom nam je poznatija kao morska salata. U usporedbi s drugim algama vrste *Ulva* imaju znatno više stope rasta u prirodi. *U. lactuca* raste pričvršćena na kamenje ili na slične podloge, ali se može vrlo lako odvojiti i plivajući na površini stvoriti tzv. zelene plime. Alga je jestiva, stoga se često koristi u ljudskoj prehrani. Pokazatelj je onečišćene vode, a značajna njezina uloga je što se može uzgojiti za proizvodnju biomase i bioremedijaciju otpadnih voda (21).

1.5.4. Biološka aktivnost

Morske alge su izvrsni spremnici proteina i derivata koji imaju izrazito učinkovita biološka svojstva (14). Biomasa algi također sadrži i mnoge vrijedne sastojke poput minerala, vitamina, aminokiselina, lipida, itd. (22).

Tijekom posljednjih godina istraživanja su usmjerena na alge kao izvor prirodnih bioaktivnih sastojaka, a sve veća pažnja je posvećena biofunkcionalnim proteinima i nekim peptidima. Za svaku vrstu algi, sadržaj jednako kao i tip proteinske molekule ovisi o nekoliko čimbenika kao što su dostupna svjetlost, temperatura i slanost vode, raspoloživost dušika, hranjivih tvari i minerala, UV zračenje, razina ugljikohidrata, itd. (14).

1.5.5. Antioksidacijska svojstva algi (14)

U brojnim epidemiološkim, kliničkim i eksperimentalnim istraživanjima se pokazalo da morske alge posjeduju značajna antioksidacijska svojstva te da mogu imati pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Znanstvenici iz različitih dijelova svijeta proučavali su sposobnost ekstrakata algi da inhibiraju peroksidaciju lipida ili uklanjaju slobodne radikale, te *in vitro* studijama potvrdili antioksidacijska svojstva ispitivanih ekstrakata. Ova svojstva algi su djelomično objašnjena i usko povezana sa njihovim kemijskim sastavom, no ipak je vrlo često teško utvrditi koji spojevi su odgovorni za antioksidacijsku aktivnost jer često aktivnost proizlazi iz sinergističkog učinka koji se javlja između nekoliko spojeva. No s druge strane, u sastavu algi identificirani su polarni spojevi kao što su aminokiseline povezane s mikosporinom i fenolni spojevi kao što su cimetna kiselina, florotanini i bromofenoli, koji se smatraju jednim od spojeva potencijalno odgovornih za antioksidacijsku aktivnost algi. Proučavanje morskih algi kao izvor antioksidansa danas je važan segment u istraživanju prirodnih proizvoda zbog njihovih značajnih potencijalnih koristi za ljudsko zdravlje i prehrambenu industriju.

Prva istraživanja antioksidansa u algama provedena su u Japanu kako bi se pronašli novi aditivi i nadomjestak za sintetske antioksidanse kao što su butilirani hidroksianisol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT) koji su pokazali kancerogene učinke te enzimatske i lipidne promjene kod životinja. Činjenica da se neke sušene alge mogu pohraniti dulji vremenski period bez opasnosti od oksidacijskog kvarenja, čak i kad je

više od 30% ukupnih masnih kiselina u obliku polinezasićenih lanaca, privuklo je zanimanje istraživača. Morske alge, jednako kao i druge fotosintetske biljke, izložene su kombinaciji svijetlosti i kisika što dovodi do stvaranja slobodnih radikala i ostalih jako oksidirajućih sredstava. Međutim, odsustvo oksidacijskih oštećenja u strukturama makroalgi i njihova stabilnost u oksidaciji tijekom skladištenja ukazuju na zaštitne antioksidacijske obrambene sustave njihovih stanica. Poznato je da morske alge sadrže široku paletu bioaktivnih spojeva, od kojih mnogi imaju komercijalne primjene u farmaceutskoj, medicinskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji. Prirodni antioksidansi, koji se nalaze u mnogim algama, važni su bioaktivni spojevi koji igraju bitnu ulogu u borbi protiv različitih bolesti i procesa starenja kroz zaštitu stanica od oksidacijskih oštećenja. Istraživanje algi tijekom posljednjih 40-ak godina rezultiralo je izolacijom preko 15 000 novih spojeva od kojih su mnogi pokazali da imaju biološka svojstva. Alge iz tri skupine, tradicionalno poznate kao Chlorophyta (zelene alge), Rhodophyta (crvene alge) i Phaeophyta (smeđe alge) proizvode spojeve s različitim bioaktivnim djelovanjima. Među funkcionalnim sastojcima izvedenim iz morskih algi, neki od najznačajnijih su florotanini, sulfatirani polisaharidi, karotenoidi i fenolne kiseline.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. KEMIKALIJE

U eksperimentalnom dijelu ovoga rada korišteni su sljedeći reagensi:

- Natrijev fosfat dihidrat, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany
- 2,2 - azobis (2 - metilpropionamid) – dihidroklorid (AAPH), Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany

2.2. UREĐAJI

- Ultrazvučna kupelj, Ultrasonic cleaner, Digital pro$^+$
- Tecan, BioTek, Synergy HTX, IP-2014-09-6897, BioTek, Instrumenta, Inc., Winooski, VT
- Analitička vaga, Kern, Model ALS 120-4, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo

2.3. UZORCI

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su ekstrakti zelene alge *Ulva lactuca* L. iz porodice Ulvaceae, te dviju smeđih algi, *Padina pavonica* (L.) Thivy *i Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux iz porodice Dictyotaceae. Alge su prikupljene početkom veljače 2018. godine na području Lučke kapetanije (Split). Biljni ekstrakti su pripravljeni ekstrakcijom jednog grama homogeniziranog, prethodno osušenog, biljnog materijala s različitim otapalima (voda, etanol, aceton) pri tri različite temperature (20, 40 i 60 °C).

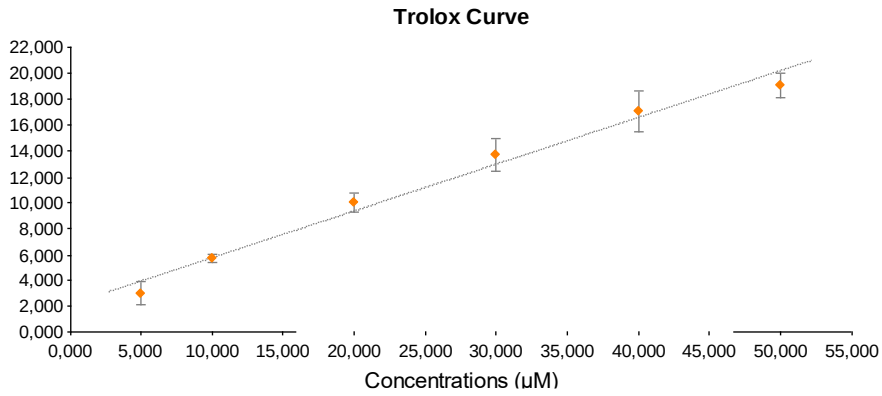
2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

2.4.1. ORAC metoda

Ovom metodom se određuje antioksidacijski kapacitet uzorka i to na način da se prati inhibicija djelovanja slobodnog peroksil radikala na fluorescentni spoj fluorescein (14).

Reagensi:

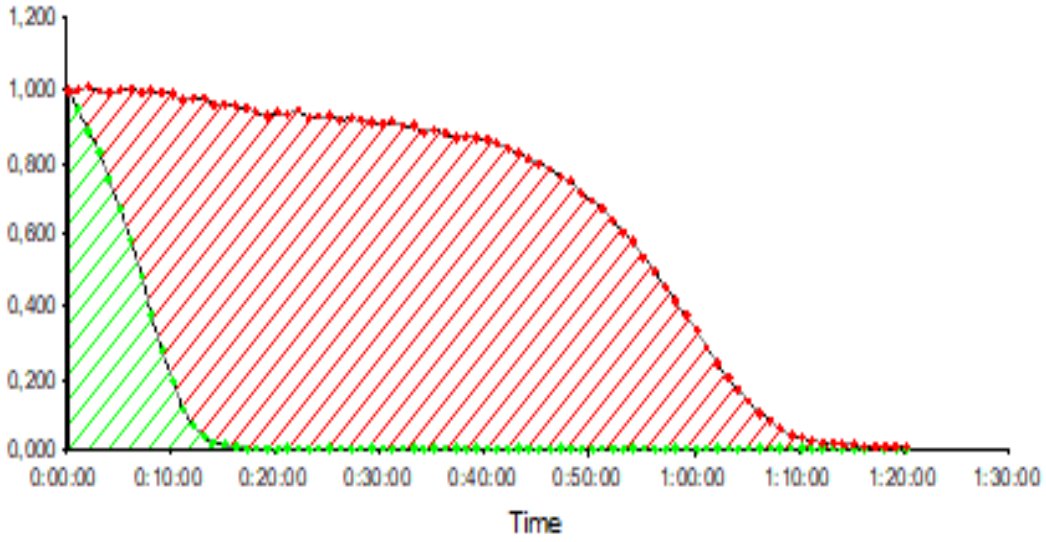
- ***Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M:*** Odvaže se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4), te se svaka količina posebno otopi u tikvici sa 200 mL destilirane vode. Nakon toga se 61 mL 0,2 M otopine Na_2HPO_4 i 39 mL 0,2 M otopine $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ pomiješa u novu tikvicu od 200 ml te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- ***Fosfatni pufer, pH=7,4, c=0,075 M:*** U odmjernu tikvicu od 100 mL se doda 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svaki dan je potrebno pripremiti svježu otopinu pufera.
- ***Fluorescein; Stock otopina (4,2 mM):*** Otopi se 15 mg fluoresceina u 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Otopina se čuva na +4 ℃ u mraku par dana. ***Radna otopina fluoresceina (0,08 μM):*** Nadopuni se 1,9 μL stock otopine sa 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Svaki dan se obavezno pripremaju svježa razrjeđenja otopina fluoresceina.
- ***AAPH:*** 0,207 g AAPH otopi se u 5 mL 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens, do mjerenja se čuva u ledenoj kupelji i stabilan je 8 h.
- ***Otopina standarda – Trolox:*** Početna, odnosno stock otopina Troloxa, početne koncentracije 0,02 mM se pripravi otapanjem 0,25 g Troloxa u 50 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Iz pripremljene 0,02 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja. Alikvoti se mogu zamrznuti i čuvati nekoliko mjeseci. Za svako mjerenje priprema se 6 razrjeđenja Troloxa i to u koncentraciji od 5-50 μM od kojih se izrađuje baždarna krivulja. Dobivena jednadžba pravca služi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta i računanje ORAC vrijednosti izraženih u μM Trolox ekvivalenta (TE).



Slika 3. *Baždarni pravac za ORAC metodu za otopine Trolox-a*

Postupak:

U svaku jažicu mikrotitarske pločice doda se 150 µL fluoresceina i 25 µL uzorka. Uzorak predstavljaju 0,075 M fosfatni pufer za slijepu probu (blank), otopina standarda Troloxa za izradu baždarne krivulje i uzorci ekstrakata algi. Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37 °C. Nakon što prođe pola sata dodaje se 25 µL 2,2 - azobis (2 - metilpropionamid) - dihidroklorid, odnosno skraćeno AAPH, te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije pri λ_{eks} = 485 nm i λ_{em} = 520 nm.



Slika 4. *Primjer izgleda normaliziranih rezultata korištenih za računanje ORAC vrijednosti ekstrakata algi*

3. REZULTATI

3.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKIH SVOJSTAVA MAKROALGI ORAC METODOM

Tablica 3. *ORAC vrijednost (µM TE) za ekstrakte alge Ulva lactuca L. pripravljene korištenjem različitih otapala i pri različitim temperaturama*

	20 °C	40 °C	60 °C
Vodeni ekstrakt	10,8 ± 4,96	13,8 ± 0,87	11,9 ± 2,74
Etanolni ekstrakt	19,6 ± 5,31	16,8 ± 3,53	12,5 ± 1,91
Acetonski ekstrakt	3,3 ± 1,46	4,9 ± 2,17	14,4 ± 2,73

- *Testirani uzorci razrijeđeni u omjeru 1:100*

Tablica 4. *ORAC vrijednost (µM TE) za ekstrakte alge Padina pavonica (L.) Thivy pripravljene korištenjem različitih otapala i pri različitim temperaturama*

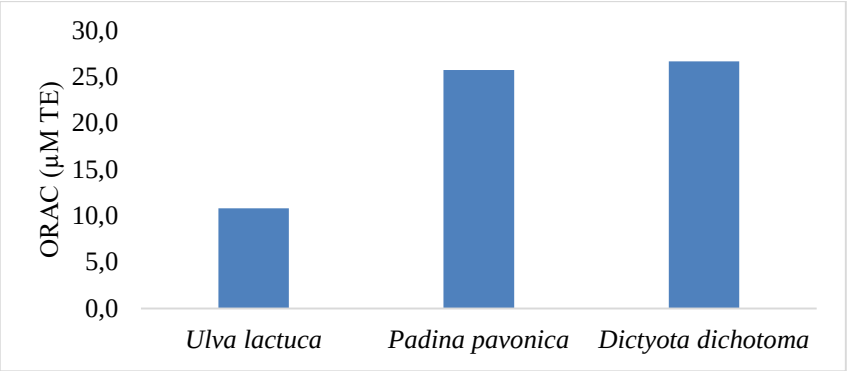
	20 °C	40 °C	60 °C
Vodeni ekstrakt	25,7 ± 2,37	22,5 ± 1,51	26,2 ± 4,50
Etanolni ekstrakt	46,2 ± 0,81	55,8 ± 2,41	51,2 ± 2,33
Acetonski ekstrakt	45,9 ± 0,64	37,8 ± 0,23	39,1 ± 0,37

- *Testirani uzorci razrijeđeni u omjeru 1:100*

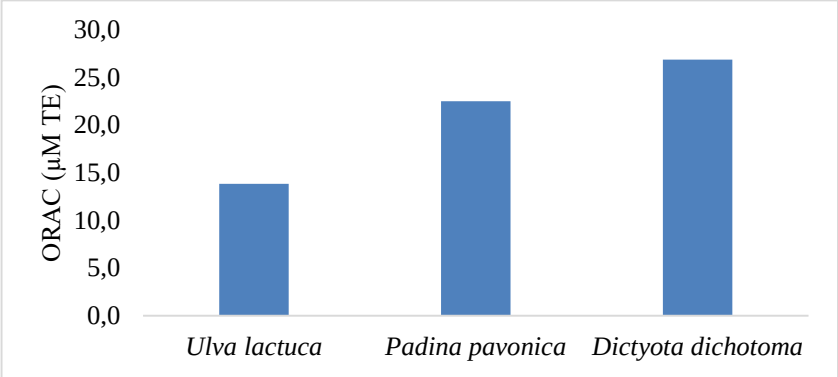
Tablica 5. *ORAC vrijednost (μM TE) za ekstrakte alge Dictyota dichotoma (Hudson) J.V.Lamouroux pripravljene korištenjem različitih otapala i pri različitim temperaturama*

	20 °C	40 °C	60 °C
Vodeni ekstrakt	26,7 ± 1,22	26,8 ± 2,54	20,6 ± 0,79
Etanolni ekstrakt	39,1 ± 1,40 *	40,8 ± 3,01 *	38,7 ± 0,72 *
Acetonski ekstrakt	30,9 ± 1,62 *	28,4 ± 1,37 *	22,9 ± 0,92 *

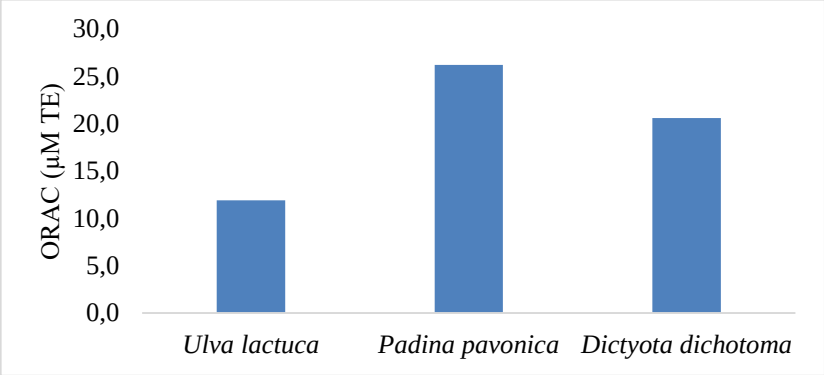
- *Testirani uzorci razrijeđeni u omjeru 1:100 i 1:400 (*)*



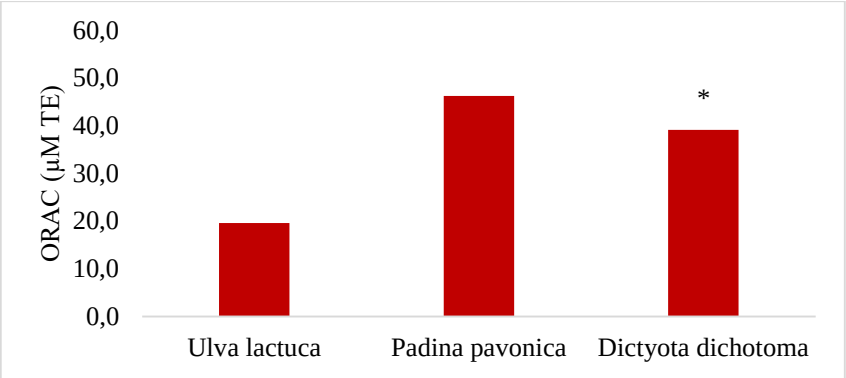
***Slika 5**. Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (µM TE) kod vodenih ekstrakata algi (1:100) pripravljenih pri temperaturi od 20 °C*



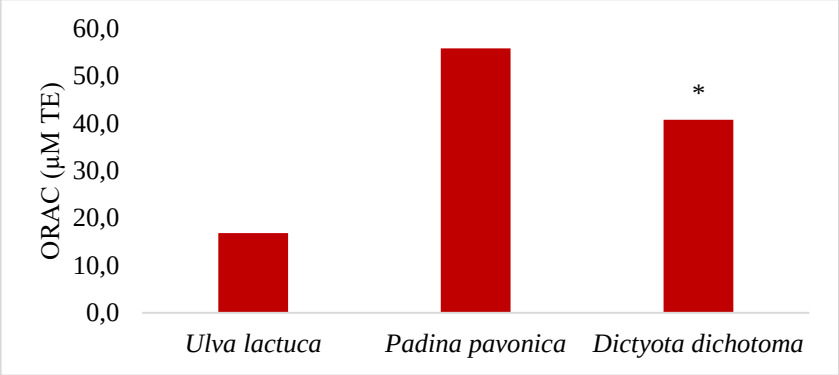
***Slika 6**. Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (µM TE) kod vodenih ekstrakata algi (1:100) pripravljenih pri temperaturi od 40 °C*



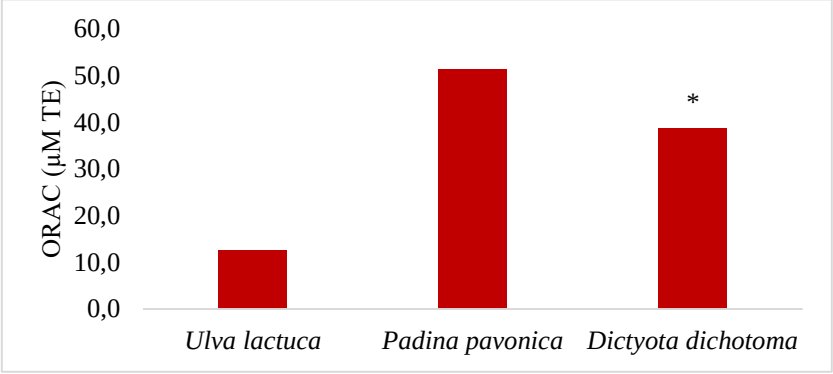
***Slika 7**. Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (µM TE) kod vodenih ekstrakata algi (1:100) pripravljenih pri temperaturi od 60 °C*



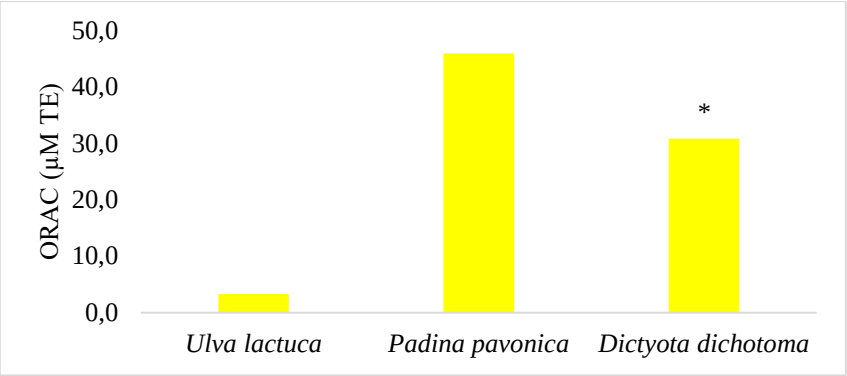
Slika 8. *Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (µM TE) kod etanolnih ekstrakata algi (1:100 i 1:400 (*)) pripravljenih pri temperaturi od 20 °C*



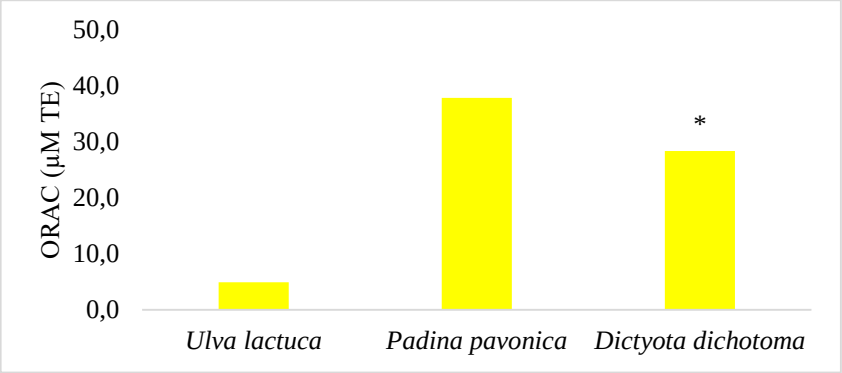
Slika 9. *Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (µM TE) kod etanolnih ekstrakata algi (1:100 i 1:400 (*)) pripravljenih pri temperaturi od 40 °C*



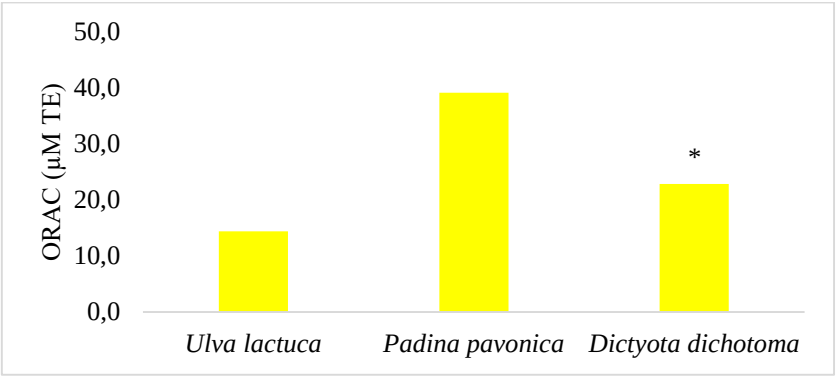
Slika 10. *Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (µM TE) kod etanolnih ekstrakata algi (1:100 i 1:400 (*)) pripravljenih pri temperaturi od 60 °C*



***Slika 11**. Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (μM TE) kod acetonskih ekstrakata algi (1:100 i 1:400 (*)) pripravljenih pri temperaturi od 20 °C*



***Slika 12**. Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (μM TE) kod acetonskih ekstrakata algi (1:100 i 1:400 (*)) pripravljenih pri temperaturi od 40 °C*



***Slika 13.** Usporedni prikaz ORAC vrijednosti (μM TE) kod acetonskih ekstrakata algi (1:100 i 1:400 (*)) pripravljenih pri temperaturi od 60 °C*

4. RASPRAVA

Cilj završnog rada bio je odrediti antioksidacijski kapacitet ekstrakata tri jadranske alge korištenjem ORAC metode. Ekstrakti algi su pripremljeni korištenjem tri različita otapala: vode, etanola i acetona, te pri različitim temperaturama: 20, 40 i 60 °C u svrhu praćenja utjecaja otapala i temperature na antioksidacijski kapacitet pojedine alge. Dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 3-5 i na slikama 5-13.

Kod dobivenih rezultata može se uočiti da su najslabiju antioksidacijsku aktivnost pokazali ekstrakti zelene alge *Ulva lactuca* L. u usporedbi s ekstraktima dviju ispitivanih smeđih algi. Najslabiji antioksidacijski kapacitet pokazali su acetonski ekstrakti alge *U. lactuca* pripravljeni pri nižim temperaturama (20 i 40 °C) dok je ekstrakt pripravljen pri temperaturi od 60 °C u istom otapalu imao najveće ORAC vrijednosti. Ovaj ekstrakt je u odnosu na vodene i etanolne ekstrakte pripravljene pri istoj temperaturi isto pokazao znatno veću ORAC vrijednost. Etanolni ekstrakti alge *U. lactuca* su pri svim temperaturama imale bolji učinak u usporedbi s vodenim ekstraktima što se može i vidjeti iz tablice 3.

I kod ekstrakata alge *Padina pavonica* (L.) Thivy svi etanolni ekstrakti su pokazali najbolju antioksidacijsku aktivnost (ORAC vrijednosti su se kretale od 46,2 – 55,8 μM TE) dok su vodeni ekstrakti bili najslabiji. Kod ekstrakata alge pripravljenih u acetonu, najbolja aktivnost je dokazana za ekstrakt pripravljen pri 20 °C i to s ORAC vrijednostima približno jednakim kao i kod etanolnih ekstrakta alge *P. pavonica* pri istoj temperaturi.

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata alge *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux koji su pripravljeni u etanolu i acetonu je bio znatno jači zbog čega su navedeni ekstrakti analizirani pri četiri puta većem razrjeđenju u odnosu na ostale ekstrakte istraživane u ovom radu (tablica 5). I kod ove smeđe alge pokazalo se da najbolju antioksidacijsku aktivnost imaju etanolni ekstrakti, a najslabiju vodeni. Slično kao i kod etanolnog ekstrakta alge *P. pavonica* i kod alkoholnog ekstrakata alge *D. dichotoma* najveću aktivnost su imali ekstrakti pripravljeni pri temperaturi od 40 °C.

Međusobnom usporedbom vodenih ekstrakata algi pripravljenih pri različitim temperaturama (slike 5, 6 i 7) može se vidjeti da je *U. lactuca* pokazala najslabiji učinak dok je antioksidacijska moć *P. pavonice* i *D. dichotome* pri 20 °C bila gotovo jednaka (ORAC = 25,7 i 26,7 μM TE).

Uspoređujući ekstrakte istraživanih algi pripravljene u etanolu i pri svim temperaturama (20, 40, 60 °C) vidljivo je da najbolju antioksidacijsku aktivnost ima ekstrakt alge *D. dichotome*, budući da su uzorci razrijeđeni za analizu u omjeru 1:400, a ORAC vrijednosti su znatno veće u odnosu na ostale uzorke koji su analizirani pri razrjeđenju 1:100. Iz grafičkih usporedbi prikazanih na slikama 8-10 može se zaključiti da primjena temperature od 40 °C pri pripravi alkoholnih ekstrakata ima povoljan učinak na antioksidacijsku aktivnost ekstrakata jadranskih algi i to osobito kod smeđe alge *P. pavonica*.

Ista situacija pojavljuje se i kod ekstrakata algi pripravljenih u acetonu. Kod svih temperatura antioksidacijska aktivnost ekstrakata alge *D. dichotoma* je najveća, no kao i kod prethodnih prikaza i usporedbe rezultata ne može se donijeti zaključak o utjecaju temperature na antioksidacijski potencijal analiziranih ekstrakata.

Predmet ovog istraživanja nije bila priprava ekstrakata ni određivanje njihovog fenolnog sastava već je to urađeno u sklopu završnog rada kolegice Viktorije Botić, ali je za raspravu naših rezultata zanimljivo istaknuti nekoliko zaključaka koje ona navodi u svom radu. Naime prema njenim rezultatima pokazalo se da je najučinkovitije otapalo u ekstrakciji fenolnih komponenti bio aceton kod algi *D. dichotoma* i *P. pavonica,* a kod alge *U. lactuca* voda što u ovom slučaju nikako ne korelira s dobivenim rezultatima antioksidacijskog kapaciteta istih uzoraka. Obzirom da je udio flavonoida i tanina bio najveći u acetonskim ekstraktima, nešto niži u etanolnim, a najslabiji u vodenim, ne možemo u potpunosti opravdati bolju antioksidacijsku aktivnost analiziranih ekstrakata algi niti prisustvom većeg udjela ovih složenih fenolnih komponenti. Isto je i kod usporedbe fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata algi ovisno o primijenjenoj temperaturi, gdje dobiveni rezultati ukazuju na različitosti u antioksidacijskom potencijalu ekstrakata ovisno o primijenjenoj temperaturi u postupku ekstrakcije.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovi prezentiranih rezultata možemo izdvojiti slijedeće zaključke:

- Antioksidacijska aktivnost vodenih, etanolnih i acetonskih ekstrakata zelene alge *U. lactuca* pripravljenih pri različitim temperaturama (20, 40, 60 °C) uvijek je bila najmanja u odnosu na ekstrakte smeđih jadranskih algi pripravljenih pri istim uvjetima.
- Najbolju antioksidacijsku aktivnost i moć u borbi protiv slobodnih kisikovih radikala pokazali su ekstrakti pripravljeni u etanolu i to osobito ekstrakti alge *D. dichotoma.*
- Obzirom da rezultati ukazuju na različitosti u antioksidacijskom potencijalu ekstrakata ovisno o primijenjenoj temperaturi u postupku ekstrakcije ne možemo donijeti zaključak o utjecaju temperature ekstrakcije na bolji ili lošiji antioksidacijski potencijal ispitivanih ekstrakata.

6. LITERATURA

1. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra A. Free radicals, antioxidants and functional foods:m Impact on human health. Pharmacognosy Rev. 2007;(4) https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902

2. Uppu RM, Murthy SN, Pryor WA, Parinandi NL, editors. Free Radicals and Antioxidant Protocols. Hatfield, Hertfordshire, UK: Humana Press; 2010.

   https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8

3. Kabel AM. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. World Journal of Nutrition and Health. 2014;2(3):35-38.

   https://doi.org/10.12691/jnh-2-3-2

4. Bradamante V, Lacković Z, editors. Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa, Zagreb: Medicinska naklada; 2001.

5. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. International Journal of Biomedical Science. 2008;4(2):89–96.

6. Richardson T, Finley JW, editors. Chemical Changes in Food During Processing, New York: Van Nostrand Reinhold Company; 1985.

7. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer, https://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-3002-2-17 (PRISTUPLJENO 17.09.2018.)

8. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. Biological aspects of reactive nitrogen species. Biochim Biophys Acta. 1999;1411(2-3):385-400.

   https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00028-6

9. Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. Clin Geriatr Med. 2004;329–359.

   https://doi.org/10.1016/j.cger.2004.02.005

10. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - Uzroci i posljedice. Rijeka. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. 2007;43:84-93.

11. Roje B. Usporedba fluorescentnih probi u ORAC metodi, Prirodoslovno-matematički fakultet, Odjel za kemiju, Split, 2015.

12. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290-4302.

    https://doi.org/10.1021/jf0502698

13. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. J Agric Food Chem. 2003;51(11):3273-9.

    https://doi.org/10.1021/jf0262256

14. Dominguez H, editor. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. 80 High Street, Sawston, Cambridge CB22 3HJ, UK: Woodhead Publishing Limited; 2013.

15. Dang TT, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett J. Comparison of chemical profile and antioxidant properties of the brown algae. Int J Food Sci Technol. 2018;53:174-181.

16. https://www.cibsub.cat/bioespecie-padina_pavonica-32235 (PRISTUPLJENO 02.09.2018.)

17. Bluish y-branch brown seaweed Dictyota dichotoma, http://www.wildsingapore.com/wildfacts/plants/seaweed/phaeophyta/ybranch.htm (PRISTUPLJENO 02.09.2018.)

18. *Ulva lactuca*, https://en.wikipedia.org/wiki/Ulva_lactuca (PRISTUPLJENO 02.09.2018.)

19. Benita M, Dubinsky Z, Iluz D. *Padina pavonica*: Morphology and Calcification Functions and Mechanism. Am J Plant Sci. 2018;9(6):1156-1168.

https://doi.org/10.4236/ajps.2018.96087

20. Usoltseva RV, Shevchenko NM, Malyarenko OS, Ishina IA, Ivannikova SI, Ermakova SP, et al. Structure and anticancer activity of native and modified polysaccharides from brown alga Dictyota dichotoma. Carbohydrate Polymers. 2018;180:21-28.
https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.006

21. Nikolaisen L, Daugbjerg Jensen P, Svane Bech K, Dahl J, Busk J, Brødsgaard T, Rasmussen MB, Bruhn A, Bjerre AB, Bangsø NH, Albert KR, Ambus P, Kádár Z, Heiske S, Sander B, Schmidt ER, et al. Energy Production from Marine Biomass (*Ulva lactuca*). Danish Technological Institute. 2011.

22. Fellah F, Louaileche H, Dehbi-Zebboudj A, Touati N. Seasonal variations in the phenolic compound content and antioxidant activities of three selected species of seaweeds from Tiskerth islet, Bejaia, Algeria. J. Mater. Environ. Sci. 2017;8(12):4451-4456.