



IZVORNI ZNANSTVENI RAD / ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

# Utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na prinos bioaktivnih spojeva makroalgi Jadranskog mora

## The effect of microwave-assisted extraction on the yield of bioactive compounds of macroalgae from the Adriatic Sea

Zrinka Čošić<sup>1\*</sup>, Patricija Čulina<sup>1</sup>, Zoran Zorić<sup>2</sup>, Lea Jankov<sup>1</sup>, Željka Špoljar<sup>1</sup>, Sandra Pedisić<sup>1</sup><sup>1</sup> Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska<sup>2</sup> Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu Sveučilišta u Zadru, Petra Kasandrića 3, 23000 Zadar

\*Corresponding author: zrinka.cosic12@gmail.com

### Sažetak

U ovom je istraživanju optimizirana ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima s obzirom na sadržaj ukupnih fenola i pigmenta (klorofila i karotenoida) smeđe alge *Halopteris scoparia* koristeći 96% etanol (v/v) kao ekstrakcijsko otapalo. Parametri ekstrakcije koji su varirali bili su temperatura ekstrakcije (10, 25, 40 °C), vrijeme ekstrakcije (5, 15, 25 minuta) te snaga mikrovalova (150, 300, 450 W). Utvrđeni optimalni parametri za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima bili su: temperatura ekstrakcije 25 °C, vrijeme ekstrakcije 25 min i snaga mikrovalova 300 W. U ekstraktima različitih smeđih (*Fucus virsoides*, *Cystoseira barbata*, *Sargasum hornschurchii*), zelenih (*Ulva lactuca* i *Dasycladus vermicularis*) i crvenih algi (*Coralina elongata*) Jadranskog mora dobivenim pri optimalnim ekstrakcijskim uvjetima određen je spektrofotometrijski ukupni sadržaj fenola od 39,55 (*Coralina elongata*) do 3687,05 mg/100 g s.tv. (*Cystoseira barbata*). Kromatografskom metodom određeni su pojedinačni karotenoidi i klorofili, a ukupni karotenoidi (zbroy pojedinačnih karotenoida) bili su u rasponu od 13,87 (*Coralina elongata*) do 291,17 mg/100 g s.tv. (*Sargasum hornschurchii*) te ukupni klorofili (zbroy pojedinačnih klorofila) od 16,60 (*Coralina elongata*) do 126,00 mg/100 g s.tv. (*Ulva lactuca*). Određena je i antioksidacijska aktivnost primjenom ORAC, (119,82 - 381,87 μmol Trolox/100 g s.tv.), ABTS (101,57 - 6514, 25 μmol Trolox/100 g s.tv.) i DPPH metoda (1951,23 - 3209,77 μmol Trolox/100 g s.tv.). Rezultati su pokazali da je najveći prinos ukupnih fenola i karotenoida kod smeđih algi što doprinosi i njihovoj većoj antioksidativnoj aktivnosti, dok je kod zelenih algi najveći prinos klorofila. Odabir metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima se pokazao kao dobar izbor za proizvodnju ekstrakata algi s bogatim sadržajem bioaktivnih spojeva i visokom antioksidativnom aktivnošću te bi njihova potencijalna primjena mogla biti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

**Ključne riječi:** ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, antioksidacijska aktivnost, ukupni fenoli, pigmenti, makroalge Jadranskog mora

### Abstract

In this study microwave-assisted extraction was optimized with regard to the content of total phenols and pigments (chlorophylls and carotenoids) of the brown alga *Halopteris scoparia* using 96% ethanol (v/v) as extraction solvent. The extraction temperature (10, 25, 40 °C), extraction time (5, 15, 25 minutes) and microwave power (150, 300, 450 W) were varied. The optimal parameters determined for microwave-assisted extraction were: extraction temperature 25 °C, extraction time 25 min and microwave power 300 W. In the extracts of various brown (*Fucus virsoides*, *Cystoseira barbata*, *Sargasum hornschurchii*), green (*Ulva lactuca* and *Dasycladus vermicularis*) and red algae (*Coralina elongata*) from the Adriatic Sea which were obtained under optimal extraction conditions, the spectrophotometric total phenolic content was determined from 39.55 (*Coralina elongata*) to 3687.05 mg/100 g d.m. (*Cystoseira barbata*). Individual carotenoids and chlorophylls were determined by the chromatographic method, and total carotenoids (the sum of individual carotenoids) ranged from 13.87 (*Coralina elongata*) to 291.17 mg/100 g d.m. (*Sargasum hornschurchii*) and chlorophyll from 16.60 (*Coralina elongata*) to 126.00 mg/100 g d.m. (*Ulva lactuca*). The antioxidant activity was also determined using ORAC, (119.82 - 381.87 μmol Trolox/100 g d.m.), ABTS (101.57 - 6514. 25 μmol Trolox/100 g d.m.) and the DPPH method (1951.23 - 3209.77 μmol Trolox/100 g d.m.). The results showed that the highest yield of total phenols and carotenoids was found in extracts of brown algae, contributing to their higher antioxidant activity, while the highest yield of chlorophylls was found in extracts of green algae. The microwave-assisted extraction method proved to be a good choice for the production of algae extracts with a rich content of bioactive compounds and high antioxidant activity, and their potential application could be in the food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** microwave assisted extraction, antioxidant activity, total phenols, pigments, macroalgae of Adriatic sea

## Uvod

U današnje doba sve je veći interes za novim funkcionalnim proizvodima koji sadrže bioaktivne spojeve (BAS) zbog njihovog blagotvornog djelovanja na zdravlje ljudi (Bravo i Mateos, 2008), a morske alge su obnovljivi i siguran izvor BAS te se osim za ljudsku prehranu mogu koristiti i za proizvodnju funkcionalnih proizvoda (Holdt i sur., 2011). BAS prisutni u morskim algama su pigmenti, polisaharidi, proteini, masne kiseline, vitamini i fenolni spojevi. Karakterizira ih širok raspon bioloških aktivnosti kao što su antimikrobno, antioksidativno, protuupalno, antitumorsko, antidiabetesno, antialergijsko, antikoagulantno i neuroprotektivno djelovanje (Wang i sur., 2017; Barbosa i sur., 2014; Rodrigues i sur., 2015). Proizvodnja ekstrakata makroalgi učinkovitim i ekološki prihvatljivim tehnologijama područje je velikog istraživačkog interesa, a nekonvencionalne metode ekstrakcije BAS danas su sve više u upotrebi zbog brojnih prednosti nad konvencionalnim metodama jer imaju veću ekološku prihvatljivost, potrebna je manja količina otapala i kraće vrijeme ekstrakcije. Jedna od najčešće korištenih metoda je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) koja se uspješno primjenjuje za ekstrakciju mnogih BAS iz različitih prirodnih resursa (Rodriguez-Jasso i sur., 2011) zbog većeg prinosa BAS u kraćem vremenu trajanja ekstrakcije (Cikoš i sur., 2018, Peng i sur., 2015, Esquivel-Hernández i sur., 2017, Cao i sur., 2018), kao na primjer za ekstrakciju fenolnih spojeva i sulfatiranih polisaharida iz morskih algi (Xu i sur., 2017). MAE metoda se temelji na djelovanju elektromagnetskog polja prilikom čega se energija uz pomoć mikrovalova prenosi na materijal kroz molekulske interakcije, pri čemu dolazi do razaranja stanice i izdvajanja staničnog sadržaja u otapalo (Kapoor i sur., 2018; Kadam i sur., 2013, Yuan i Macquarrie, 2015). Za postizanje većih prinosa ekstrakcije i bolje izolacije ciljanih spojeva bitno je optimizirati uvjete MAE poput otapala, snage i frekvencije mikrovalova, omjera otapala i čvrste tvari, temperature i vremena trajanja ekstrakcije (Kadam i sur., 2013; Cikoš i sur., 2018). Kod MAE otapalo je jedan od važnih parametara u procesu ekstrakcije, a što je veća dielektrična konstanta i dielektrični gubitak, to je veća sposobnost otapala da apsorbira mikrovalnu energiju, što može dovesti do bržeg zagrijavanja otapala u odnosu na tretirani materijal (Routray i Orsat, 2012). Istraživanja pokazuju da je poboljšana ekstrakcija fenolnih spojeva kod MAE kada se koriste alkoholi i vodene otopine alkohola (Osorio- Tobón, 2020). Povećanje snage mikrovalova dovodi do povećanja prinosa ekstrahiranog spoja (Hu i sur., 2008). Međutim, velika snaga mikrovalova može previše povećati temperaturu proizvoda i smanjiti prinos ekstrakcije radi degradacije termolabilnih spojeva (Ma i sur., 2009). Viša temperatura uzrokuje povećane međumolekularne interakcije unutar otapala, što povećava topljivost i stanični tlak te može uzrokovati pucanje stanice i povećati dostupnost spojeva koji se ekstrahiraju u otapalo. Porastom temperature ekstrakcije, viskoznost otapala se smanjuje, povećava se njegova pokretljivost i topljivost, čime se povećava učinkovitost ekstrakcije (Khajeh i sur., 2010). Također je uočeno da nakon postizanja optimalne temperature i vremena ekstrakcije učinkovitost ekstrakcije se počinje smanjivati daljnjim porastom temperature i vremena (Wang i sur., 2008). Prije MAE poželjno je da se uzorci melju i homogeniziraju kako bi se povećala interakcija stanične matrice s otapalom jer se time učinkovitost ekstrakcije povećava (Kothari i Seshadri, 2010). U istraživanju Georgiopoulou i sur. (2023) s obzirom na prinos ekstrakcije, sadržaj klorofila, karotenoida i fenola u ekstraktu te antioksidativnu aktivnost utvrđeni su optimalni parametri MAE za algu *Chlorella vulgaris*; temperatura 60 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme trajanja ekstrakcije 14 min. Optimalni mikrovalni uvjeti za ekstrakciju fenola smeđe alge *Sargassum vestitum* bili su vrijeme ekstrakcije 75 s, snaga mikrovalova 960 W i ekstrakcijsko otapalo 70 % etanol (Dang i sur., 2017). Čagalj i sur. (2021) su utvrdili najveći udio ukupnih fenola u liofiliziranom uzorku smeđe alge *Padina pavonica* uzorkovane u Jadranskom moru pri MAE na 200 W, 60 °C i 5 min sa 50 % etanolom. Unatoč raznolikosti morskih makroalgi u Jadranskom moru, još uvijek je ograničen broj istraživanja o ukupnom sadržaju

BAS i antioksidativnim svojstvima. Stoga je cilj ovog istraživanja bio optimizirati parametre MAE (temperature, vremena i snage mikrovalova) za dobivanje što većeg prinosa fenola i pigmenta različitih vrsti makroalgi Jadranskog mora. Također je u dobivenim ekstraktima pri optimalnim uvjetima određena antioksidacijska aktivnost primjenom ORAC, ABTS i DPPH metoda.

## Materijali i metode

U ovom istraživanju korišteni su uzorci smeđih algi (*Halopteris scoparia*, *Fucus virsoides*, *Cystoseira barbata*, *Sargassum hornschurchii*), zelenih algi (*Ulva lactuca*, *Dasycladus vermicularis*) i crvene alge (*Corallina elongata*) izronjeni u Jadranskom moru u okolici Zadra. U tablici 1 prikazani su analizirani uzorci kao i vrijeme probira u Jadranskom moru. Uzorci su tri puta oprani vodovodnom, a zatim destiliranom vodom nakon čega su zamrznuti na -60 °C te liofilizirani (CoolSave 55-9 PRO, Labogene, Denmark), samljeveni u prah i čuvani na -20 °C do daljnje upotrebe.

Tablica 1. Uzorci algi izronjenih u Jadranskom moru

Table 1. Algae samples sampled in the Adriatic Sea

Uzorak	Alga	Vrijeme probira
1.	<i>Halopteris scoparia</i>	15.11.2021.
2.	<i>Fucus virsoides</i>	16.10.2019.
3.	<i>Cystoseira barbata</i>	20.02.2020.
4.	<i>Sargassum hornschurchii</i>	1.12.2021.
5.	<i>Ulva lactuca</i>	22.05.2019.
6.	<i>Dasycladus vermicularis</i>	15.02.2022.
7.	<i>Corallina elongata</i>	24.11.2021.

## Optimizacija ekstrakcije potpomognute mikrovalovima bioaktivnih spojeva makroalgi

Kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije s najvišim prinosom ukupnih fenola i pigmenta korišteni su uzorci smeđe alge *Halopteris scoparia*, a tijekom provođenja MAE varirani su parametri: temperatura ekstrakcije (10, 25 i 40 °C), vrijeme ekstrakcije (5, 15 i 25 min) i snaga mikrovalova (150, 300 i 450 W). Na temelju istraživanja Cha i sur. (2010) i naših preliminarnih istraživanja 96% etanol je izabran kao ekstrakcijsko otapalo. U ekstrakcijske posude mikrovalnog reaktora (Ethos Easy, Milestone, Sorisole, Italija) odvaž se približno 1 g liofiliziranog uzorka algi, doda 25 mL 96 %-tnog etanola i magnetni mješalac te se uzorci ekstrahiraju u mikrovalnom reaktoru pri navedenim uvjetima. Konstantni parametri ekstrakcije bili su vrijeme potrebno za postizanje temperature ekstrakcije (5 min), miješanje (50%) i ventilacija nakon ekstrakcije (2 min). Nakon ekstrakcije uzorci su filtrirani (Whatman filter papir) u odmjerne tikvice od 25 mL koje su do oznake nadopunjene ekstrakcijskim otapalom. Ekstrakcija BAS ostalih uzorka algi provedena je primjenom utvrđenih optimalnih uvjeta ekstrakcije MAE za smeđu algu *Halopteris scoparia*.



## **Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela pigmentata**

Maseni udjeli pigmentata etanolnih ekstrakta liofiliziranog uzorka alge *Halopteris scoparia* tijekom MAE optimizacije određeni su prema metodi opisanoj u radu Sumanta i sur. (2014). Mjerenje intenziteta obojenja provelo se pri valnim duljinama od 649 nm i 664 nm (za klorofile) te 470 nm (za karotenoide). Dobivene vrijednosti koncentracija izražavaju se u  $\mu\text{g/mL}$  te su preračunate u maseni udio koji je izražen u mg na 100 g suhe tvari uzorka ( $\text{mg}/100 \text{ g s.tv.}$ ).

## **Određivanje ukupnih fenola**

Sadržaj ukupnih fenola određen je prema metodi opisanoj u radu Shortle i sur., (2014) uz male modifikacije. U staklenu epruvetu se otpipetira 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa i 2 ml destilirane vode. Nakon tri minute se doda 1 ml zasićene otopine natrijeva karbonata i promiješa na Vortexu. Uzorci se termostiraju u vodenoj kupelji 25 minuta na 50 °C te se apsorbancija mjeri na valnoj duljini 765 nm (UViLine 9 400, Secomam, Francuska). Koncentracija ukupnih fenola se izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca galne kiseline kao standarda, a rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline ( $\text{mg GAE}/100 \text{ g suhe tvari}$ ).

## **Određivanje karotenoida i klorofila primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju**

Sadržaj pojedinačnih karotenoida i klorofila u ekstraktima algi proizvedenim pri optimalnim MAE uvjetima određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, 1260 Infinity II LC System, Agilent, Santa Clara, CA, USA) prema metodi koju su prethodno opisali Castro-Puyana i sur. (2017) uz UV/VIS PDA detektor. Mobilna faza A se sastojala od smjese metanol:metil tert-butileter:voda (90:7:3, v/v/v), a smjesa metanol:metil tert-butileter (10:90, v/v) je bila mobilna faza B. Korištena je kolona reverzne faze Develosil RP-Aqueous (C30) (250 mm  $\times$  4,6 mm i.d., veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) i predkolona DevelosilGuard. Vrijeme uravnoteženja kolone bilo je 2 minute. Brzina protoka bila je 0,8 ml/min, a volumen injektiranja 10  $\mu\text{L}$ . Gradijent eluiranja mobilne faze bio je 0 min, 0 % B; 20 min, 30 % B; 35 min, 50 % B; 45 min, 80 % B; 50 min, 100 % B; 52 min, 0 % B. Temperatura kolone je bila 35 °C. Intenziteti signala korišteni za kvantifikaciju karotenoida i klorofila detektirani su na 450 i 660 nm. Identifikacija je provedena usporedbom vremena zadržavanja i spektralnih podataka s onima autentičnih standarda. Kvantifikacija karotenoida i klorofila je izračunata metodom vanjskog standarda, koristeći kalibracijske krivulje za  $\beta$ -karoten ( $y = 374,11x$ ,  $R^2 = 0,9817$ ), klorofil a ( $y = 35,932x$ ,  $R^2 = 0,9715$ ) klorofil b ( $y = 13,326x$ ,  $R^2 = 0,9195$ ), lutein ( $y = 11,86x$ ,  $R^2 = 0,9498$ ), fukoksantin ( $y = 51,483x$ ,  $R^2 = 0,9988$ ). Diadinksantin i neoksantin izraženi su kao ekvivalent luteina. Rezultati su izraženi u  $\text{mg}/100 \text{ g suhe tvari}$ .

## **Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH-a metodom**

U reakciji sa slobodnim radikalom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH) određena je antioksidativna aktivnost uzoraka (Brand-Williams i sur., 1995). Reakcijska smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 minuta i apsorbancija je izmjerena na 517 nm. Koristeći Trolox kao standard, DPPH vrijednosti su izražene kao  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g suhe tvari}$ .

## **Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom**

Antioksidativna aktivnost ABTS mjerena je prema modificiranoj metodi Millera i Rice-Evansa (1997). 40  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka pomiješa se s 4 mL 1% ABTS i nakon 1 minute se izmjeri apsorbancija na 734 nm. Koristeći Trolox kao standard, ABTS vrijednosti su izražene kao  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g suhe tvari}$ .

## **Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom**

ORAC metoda je proveden u skladu s opisanim postupkom u radu Elez Garofulić i sur. (2018) pomoću automatiziranog čitača ploča (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka). Mikroploča s 96 jažica sa 150  $\mu\text{L}$  fluoresceina napunjena je standardom Trolox, ili uzorkom, ili natrijevim fosfatnim puferom (pH 7,4, 75 mM) kao slijepom probom. Reakcija je započeta dodavanjem 25  $\mu\text{L}$  AAPH (240 mM) na ploču nakon inkubacije na 37 °C tijekom 30 minuta. Mjerenja fluorescencije (ekscitacija  $\lambda = 485 \text{ nm}$ /emisija  $\lambda = 538 \text{ nm}$ ) izvedena su na 37 °C svakih 90 sekundi tijekom 120 minuta. Za analizu podataka koristi se MARS softver (MARS 2.0 software, BMG Labtech, Offenburg, Njemačka). ORAC vrijednosti su izražene kao  $\mu\text{mol Trolox ekvivalenta na } 100 \text{ g suhe tvari}$  ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g suhe tvari}$ ).

## **Statistička obrada rezultata**

S ciljem optimiranja parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za određivanje biološkog potencijala smeđe alge *Halopteris scoparia* eksperiment je dizajniran kao puni faktorijski dizajn na tri razine. Sva analitička određivanja obavljena su u dva ponavljanja. Statistička obrada podataka provedena je programom Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) radi ispitivanja utjecaja parametara ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na sadržaj ukupnih fenola i pigmentata te antioksidativnu aktivnost (DPPH, ABTS i ORAC). Zavisne varijable bile su: sadržaj ukupnih fenola ( $\text{mg GAE}/100 \text{ g s.tv.}$ ), sadržaj pigmentata ( $\text{mg}/100 \text{ g s.tv.}$ ) i antioksidativna aktivnost ( $\mu\text{M TE}/100 \text{ g s.tv.}$ ), te je ispitivan utjecaj neovisnih varijabli: temperatura ekstrakcije (10, 25 i 40°C), vremena ekstrakcije (5, 10 i 25 minuta) te snage mikrovalova (150, 400 i 400 W). Zavisne varijable analizirane su s pomoću multivarijatne analize varijance (ANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey HSD testom. Razina značajnosti za sve testove je bila  $p \leq 0,05$ .

## **Rezultati i rasprava**

### **Optimizacija ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE)**

Optimizacija ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) provedena je na smeđoj algi *Halopteris scoparia* te je ispitan utjecaj parametara ekstrakcije: temperatura (10, 25 i 40 °C), vrijeme (5, 15 i 25 min) i snaga mikrovalova (150, 300 i 450 W) na sadržaj ukupnih fenola (tablica 2) te ukupnih klorofila a i klorofila b i karotenoida (tablica 3) određenih spektrofotometrijskim metodama.

Statistička analiza je pokazala da na udio ukupnih fenola smeđe alge *Halopteris scoparia* značajno utječe vrijeme ekstrakcije ( $p < 0,05$ ), dok parametri snage mikrovalova i temperature ekstrakcije nemaju značajan utjecaj (tablica 2). Povećanjem vremena MAE povećava se udio ukupnih fenola. Pri temperaturi ekstrakcije od 25 °C određen je najveći udio ukupnih fenolnih spojeva (188,28 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> s.tv.) koji se smanjuje povećanjem temperature ekstrakcije od 40 °C (183,49 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> s.tv.). Temperatura ekstrakcije utječe na omekšanje biljnog

Tablica 2. Utjecaj MAE parametara na maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima alge *Halopteris scoparia*

 Table 2. The influence of MAE parameters on the mass fraction of total phenolics in *Halopteris scoparia* extracts

Parametar ekstrakcije	N	Ukupni fenoli (mg 100 g <sup>-1</sup> s.tv.)
Temperatura (°C)		p=0,0698
10	18	168,04±6,3a
25	18	188,25±6,3a
40	18	183,49±6,3a
Vrijeme (min)		p<0,001
5	18	157,86±5,15a
15	18	181,67±5,15b
25	18	200,25±5,15c
Snaga (W)		p=0,9339
150	18	180,17±6,64a
300	18	178,08±6,64a
450	18	181,52±6,64a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

 Tablica 3. Utjecaj MAE parametara na maseni udio klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u ekstraktima alge *Halopteris scoparia*

 Table 3. The influence of MAE parameters on the mass fraction of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids in *Halopteris scoparia* extracts

Parametri ekstrakcije	N	Klorofil a (mg /100 g s.tv.)	Klorofil b (mg /100 g s.tv.)	Karotenoidi (mg /100 g s.tv.)
Temperatura (°C)		p=0,277	p=0,112	p=0,948
10	18	15,86±0,42a	8,50±0,26a	5,24±0,18a
25	18	16,82±0,42a	9,26±0,26a	5,21±0,18a
40	18	16,37±0,42a	9,02±0,26a	5,16±0,18a
Vrijeme (min)		p<0,001	p<0,001	p<0,001
5	18	14,46±0,27a	7,84±0,18a	4,52±0,14a
15	18	16,82±0,27b	9,05±0,18b	5,48±0,14b
25	18	17,77±0,27c	9,89±0,18c	5,62±0,14c
Snaga (W)		p=0,726	p=0,247	p=0,233
150	18	16,61±0,43a	8,70±0,26a	4,99±0,18a
300	18	16,31±0,43a	8,80±0,26a	5,21±0,18a
450	18	16,12±0,43a	9,28±0,26a	5,42±0,18a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

tkiva i oslabljuje interakcije između polifenola i proteina te polifenola i polisaharida što rezultira većom migracijom polifenola u otapalo (Mokrani i Madani., 2016), a smanjenje udjela ukupnih fenola pri temperaturi 40 °C, može biti zbog termolabilnosti fenolnih spojeva pri višim temperaturama (Călinoiu i Vodnar, 2019).

Statistička analiza je pokazala da na udio klorofila a i b te ukupnih karotenoida smeđe alge *Halopteris scoparia* značajno utječe vrijeme ekstrakcije ( $p \leq 0,05$ ) dok parametri temperature ekstrakcije i snage mikrovalova nemaju značajan utjecaj (tablica 3). Povećanjem vremena MAE povećava se udio ukupnih klorofila a i b te ukupnih karotenoida. Najviši prosječni udio klorofila a (17,77 mg/100 g s.tv. uzorka) i klorofila b (9,89 mg/100 g s.tv. uzorka) te ukupnih karotenoida (5,62 mg/100 g s.tv. uzorka) određen je pri vremenu ekstrakcije od 25 min, a najmanji udjeli su određeni pri najnižem vremenu ekstrakcije od 5 min.

Za utvrđivanje kombiniranog utjecaja parametara ekstrakcije na klorofil a i b, ukupne karotenoide i ukupne fenole smeđe alge *Halopteris scoparia*



Tablica 4. Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a i b, ukupnih karotenoida i ukupnih fenola smeđe alge *Halopteris scoparia*

Table 4. Optimal extraction conditions for chlorophyll a and b, total carotenoids and total phenols from the brown alga *Halopteris scoparia*

Optimalni uvjeti						
	Temperatura (°C)	Snaga (W)	Vrijeme (min)	Predviđeno	Dobiveno	Poželjnost
Klorofil a (mg/100 g s.tv.)	25	300	25	19,1386	18,5406	0,8619
Klorofil b (mg/100 g s.tv.)	25	300	25	10,0551	9,2896	0,8619
Karotenoidi (mg/100 g s.tv.)	25	300	25	6,1950	5,8508	0,8619
Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv.)	25	300	25	240,0862	232,0677	0,8619

Tablica 5. Maseni udjeli karotenoida i klorofila u smeđoj algi *Halopteris scoparia* određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

Table 5. Mass fractions of carotenoids and chlorophyll ( in the brown alga *Halopteris scoparia* determined using the HPLC-UV/VIS PDA method

KAROTENODI	mg/100 g s.tv.	KLOROFILI	mg/100 g s.tv.
Fukoksantin	41,79	Klorofil b	126,24
Derivat 1 lutein	141,59	Derivat 1 klorofil b	30,32
Derivat 1 neoksantin	32,2	Derivat 2 klorofil b	49,23
Derivat 2 neoksantin	39,82	Klorofil a	223,72
Derivat 3 neoksantin	18,24	Derivat 1 klorofil a	20,51
Diadinoksantin	8,95	Derivat 2 klorofil a	2,4
Lutein	21,85	UKUPNI KLOROFILI	452,41
β-karoten	5,34		
UKUPNI KAROTENOIDI	309,78		

optimalni uvjeti ekstrakcije prikazani su u tablici 4.

Prema statističkoj analizi, optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a i b, ukupnih karotenoida te ukupnih fenola smeđe alge *Halopteris scoparia* su: temperatura 25 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije od 25 minuta (tablica 4). U usporedbi sa istraživanjem Georgiopoulou i sur. (2023) optimalna snaga mikrovalova za algu *Chlorella vulgaris* je bila također 300 W, ali je temperatura MAE bila viša (60 °C), te kraće vrijeme ekstrakcije (14 min). Najveći udio ukupnih fenola u ekstraktu liofilizirane smeđe alge *Padina pavonica* uzorkovane u Jadranskom moru dobiven je na nižoj snazi mikrovalova (200 W), značajno višoj temperaturi (60 °C) i kraćem vremenu ekstrakcije (5 min) (Čagalj i sur., 2021).

Pri optimalnim uvjetima MAE određeni su pojedinačni klorofili (klorofil b, derivat 1 i 2 klorofila, klorofil a, derivati 1 i 2 klorofila a) i karotenoidi (fukoksantin, lutein, derivat luteina, derivat 1, 2 i 3 neoksantina, β-karoten) u ekstraktu *Halopteris scoparia* primjenom HPLC uz UV/VIS PDA detekciju, a rezultati su prikazani u tablici 5.

Maseni udio ukupnih karotenoida u ekstraktu liofilizirane alge *Halopteris scoparia* (zbroj svih pojedinačnih karotenoida) iznosio je 309,78 mg/100 g s.tv., a najzastupljeniji karotenoid bio je derivat luteina (141,59 mg/100 g s.tv.) čiji je udio 45,71 % ukupnih karotenoida. Maseni udio ukupnih klorofila (zbroj svih pojedinačnih klorofila) u ekstraktu smeđe alge *Halopteris scoparia* iznosio je 452,30 mg/100 g s.tv., a najzastupljeniji spojevi bili su klorofil a (223,72 mg/100 g s.tv.) i klorofil b (126,24 mg/100 g s.tv.) što čini 77,35 % ukupnih klorofila. Ozgun i sur., (2015) istraživali su udio pigmentata u smeđim algama uzorkovanih na mediteranskom dijelu obale Turske te je udio klorofila a kod smeđe

alge *Cystoseira barbata* iznosio 1,056 ± 0,20 mg/g, a kod *Cystoseira compressa* 1,297 ± 0,35 mg/g odnosno udio karotenoida kod *C. barbata* iznosio je 0,180 ± 0,06 mg/g, a kod *C. compressa* 0,234 ± 0,07 mg/g što je niže nego u našim analiziranim ekstraktima.

### Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) smeđih, zelenih i crvene alge Jadranskog mora

Pri optimalnim uvjetima MAE utvrđenim na uzorcima smeđe alge *Halopteris scoparia* provedena je ekstrakcija šest različitih vrsta makroalgi Jadranskog mora te su u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski određeni maseni udio ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost primjenom ORAC, ABTS i DPPH metoda (tablica 6), maseni udjeli pojedinačnih karotenoida (tablica 7 i 8) i klorofila (tablica 9 i 10) određenih primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode.

Najveći sadržaj ukupnih fenola imala je smeđa alga *Cystoseira barbata* (3687,05 mg GAE/100 g s.tv.), a najniži crvena alga *Corallina elongata* (39,55 mg GAE/100 g s.tv.). Prema dobivenim rezultatima ukupni fenoli smeđih algi se statistički razlikuju ( $p \leq 0,05$ ), a nema statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) u udjelu ukupnih fenola zelenih algi *Uva lactuca*, *Dasycladus vermicularis* te crvene alge *Corallina elongata*. Istraživanja drugih autora ukazuju na veći maseni udio fenola u smeđim algama nego kod zelenih i crvenih algi te ih karakterizira iznimno visoka biološka aktivnost (Gupta i Abu-Ghannan, 2011; Balboa i sur., 2013; Montero i sur., 2014) što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja gdje su sve smeđe alge (*Fucus virsoides*, *Cystoseira barbata* i *Sargassum hornsuhii*) sadržavale značajno više masene udjele ukupnih fenola nego zelene alge i crvena alga.

Tablica 6. Maseni udjeli ukupnih fenola analiziranih uzoraka algi primjenom MAE te antioksidacijska aktivnost određena primjenom ORAC, ABTS i DPPH metoda

Table 6. Mass fractions of total phenols of analyzed algae samples using MAE and antioxidant activity determined using ORAC, ABTS and DPPH methods

Alga	Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv. uzorka)	ORAC ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$ )
Fucus virsoides	2653,38 $\pm$ 38,38c	170,65 $\pm$ 0,83b	5776,67 $\pm$ 20,64d	2980,48 $\pm$ 16,09b
Cystoseira barbata	3687,05 $\pm$ 38,38d	119,82 $\pm$ 0,83a	6514,25 $\pm$ 20,64e	3209,77 $\pm$ 16,09c
Sargassum hornschurchii	731,36 $\pm$ 38,38b	254,76 $\pm$ 0,83c	4455,64 $\pm$ 20,64c	3007,70 $\pm$ 16,09b
Ulva lactuca	67,11 $\pm$ 38,38a	355,28 $\pm$ 0,83e	431,21 $\pm$ 20,64b	2009,60 $\pm$ 16,09a
Dasycladus vermicularis	75,57 $\pm$ 38,38a	381,87 $\pm$ 0,83f	364,61 $\pm$ 20,64b	3194,57 $\pm$ 16,09c
Corallina elongata	39,55 $\pm$ 38,38a	305,58 $\pm$ 0,83d	101,57 $\pm$ 20,64a	1951,23 $\pm$ 16,09a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

Najmanja antioksidacijska aktivnost prema ABTS metodi određena je u uzorku Corallina elongata (101,57  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$ ), a najveća u uzorku Cystoseira barbata (6514,25C  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv. uzorka}$ ). Isti trend primijećen je i primjenom DPPH metode gdje je antioksidacijska aktivnost analiziranih algi u rasponu od 1951,23 (Corallina elongata) do 3209,77  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$  (Cystoseira barbata). Ekstrakti algi koji pokazuju veću aktivnost hvatanja radikala DPPH dovode se u vezu s njihovom sposobnosti doniranja vodika. Rezultati antioksidativne aktivnosti analiziranih ekstrakata smeđih algi pokazuju da sadrže relativno veću antioksidativnu aktivnost određenu ABTS i DPPH metodom od zelenih i crvenih algi što je u skladu s istraživanjima Coxa i sur. (2010) i Kindleysides i sur. (2012). Isto tako veće vrijednosti antioksidativne aktivnosti smeđih algi određenih ORAC i DPPH metodom su u skladu s većim sadržajem masenih udjela fenola kod smeđih algi. Mnogi su istraživači zabilježili visoku korelaciju između ukupnog sadržaja fenola i antioksidativne aktivnosti (Chew i sur., 2008; Connan i sur., 2004; Wangenstein i sur., 2004; Wang i sur., 2009). Rezultati antioksidativne aktivnosti određene ORAC metodom su veće kod zelenih algi Ulva lactuca i Dasycladus vermicularis te crvene alge Corallina elongata. Osim fenolnih spojeva, pigmenti klorofila i karotenoidi su također prepoznati kao snažni antioksidansi (Safari i sur., 2015), te vjerojatno značajno doprinose antioksidacijskoj aktivnosti analiziranih ekstrakata algi.

U tablicama 7 i 8 prikazani su maseni udjeli karotenoida i statistička analiza za ukupne karotenoide u analiziranim ekstraktima algi primjenom HPLC-UV/VIS PDA metode. Primjenom HPLC metode identificirano je osam karotenoida u analiziranim ekstraktima algi od čega sedam ksantofila (fukoksantin, derivat luteina, tri derivata neoksantina, diadinoxantina i lutein) te karoten ( $\beta$ -karoten). Sastav karotenoida u morskim algama može varirati ovisno o vrsti algi, sezonskim ciklusima i mjestu s kojeg se sakupljaju kao i o fazi rasta algi. Osim toga morske alge mogu pokazivati slične karakteristike ovisno o skupini kojoj pripadaju, ali nemaju jedinstven karotenoidni i pigmentni profil (Yalcin i sur. 2021). Od pojedinačnih karotenoida, fukoksantin je detektiran u dva uzorka Cystoseira barbata i Fucus virsoides, u rasponu od 6,64 do 8,22 mg/100 g s.tv. U analiziranim uzorcima u najnižem udjelu određen je  $\beta$ -karoten.

Najveći ukupni prinos karotenoida zabilježen je kod smeđe alge Sargassum Hornschurchii i iznosio je 291,17 mg/100 g s.tv., a najmanji kod crvene alge Corallina elongata 13,87 mg/100 g s.tv. (tablica 8). U

uzorcima Cystoseira barbata, Ulva lactuca i Dasycladus vermicularis nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelu ukupnih karotenoida. U radu Manev i Petkova (2021) udio pigmentata karotenoida alge C. barbata izronjene na obali blizu Crnog mora bio je niži te je iznosio 51,58 mg/100 g s.tv. U ovom radu udio ukupnih karotenoida alge C. barbata bio je od 90,65 mg/100 g s. tv. U tablicama 10 i 11 prikazani su rezultati HPLC-UV/VIS PDA određivanja masenih udjela pojedinačnih i ukupnih klorofila (zbroj pojedinačnih klorofila) u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima MAE.

U analiziranim ekstraktima algi identificirano je šest klorofila (klorofil b, derivat 1 i 2 klorofila b te klorofil a i derivat 1 i 2 klorofila a (tablica 9). U svim uzorcima klorofil a je najzastupljeniji klorofil i to u rasponu od 16,54 (Corallina elongata) do 78,04 mg/100 g s.tv. (Sargassum hornschurchii). U uzorcima alge Cystoseira barbata detektiran je samo klorofil a koji je iznosio 33,68 mg/100 g s.tv. uzorka kao i kod Corallina elongata gdje je iznosio 16,54 mg/100 g s. tv. Od pojedinačnih klorofila, klorofil b je detektiran samo u zelenim algama odnosno u uzorcima Ulva lactuca (8,67 mg/100 g s.tv.) i Dasycladus vermicularis (47,63 mg/100 g s.tv. uzorka).

Ukupni maseni udio klorofila analiziranih uzoraka bili su u rasponu od 33,84 (Cystoseira barbata) do 126,00 (Ulva lactuca) mg/100 g s.tv. uzorka, a rezultati statističke analize su pokazali značajnu razliku ( $p \leq 0,05$ ) u udjelima ukupnih klorofila kod analiziranih uzoraka (tablica 10). Prema očekivanjima veći sadržaj klorofila imale su zelene alge Ulva lactuca i Dasycladus vermicularis u odnosu na smeđe alge Fucus virsoides i Cystoseira barbata, a najmanji sadržaj imala je crvena alga Corallina elongata. Garcia-Perez i sur. (2022) su u devet različitih vrsta smeđih algi (Ascophyllum nodosum, Bifurcaria bifurcata, Fucus spiralis, Himanthalia elongata, Laminaria ochroleuca, Laminaria saccharina, Pelvetia canaliculata, Sargassum muticum i Undaria pinnatifida) odredili ukupne klorofile u rasponu od 14,63 do 38,84  $\mu\text{g/g}$  koristeći etanol kao ekstrakcijsko otapalo što je značajno niže nego u našem istraživanju.



Tablica 7. Maseni udijeli karotenoida (mg/100 g s.tv.) u analiziranim ekstraktima algi određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

Table 7. Mass fractions of carotenoids (mg/100 g d.w.) in the analyzed algae extracts determined using the HPLC-UV/VIS PDA method

Alga	Fucus virsoides	Cystoseira barbata	Sargassum hornschurchii	Ulva lactuca	Dasycladus vermicularis	Corallina elongata
Fukoksantin	8,22 ± 0,50	6,64 ± 0,20	nd	nd	nd	nd
der 1 lutein	147,26 ± 1,80	63,80 ± 0,50	228,69 ± 2,80	29,62 ± 0,10	25,94 ± 0,50	nd
der 1 neoksantin	nd	nd	nd	9,4 ± 0,20	11,54 ± 0,2	nd
der 2 neoksantin	12,40 ± 0,60	nd	9,02 ± 0,40	12,71 ± 0,50	9,31 ± 0,30	nd
der 3 neoksantin	33,96 ± 0,50	13,65 ± 0,80	45,24 ± 0,90	5,46 ± 0,20	5,47 ± 0,30	nd
Diadinoksantin	nd	nd	nd	nd	7,43 ± 0,40	13,43 ± 0,80
lutein	12,70 ± 0,90	nd	nd	85,83 ± 0,90	82,90 ± 0,80	nd
β karoten	0,84 ± 0,01	nd	0,71 ± 0,01	nd	0,92 ± 0,10	0,40 ± 0,01

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost ± standardna devijacija; nd- neidentificiran spoj; der-deriv

Tablica 8. Rezultati statističke analize utjecaja vrste algi na maseni udio karotenoida

Table 8. Results of a statistical analysis of the influence of algae species on the mass fraction of carotenoids

Alga	Karotenoidi (mg/100 g s.tv.) (p<0,001)
Fucus virsoides	222,90±10,13c
Cystoseira barbata	90,65±10,13b
Sargassum hornschurchii	291,17±10,13d
Ulva lactuca	143,14±10,13b
Dasycladus vermicularis	122,27±10,13b
Corallina elongata	13,87±10,13a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

Tablica 9. Maseni udijeli klorofila (mg/100 g s.tv.) u analiziranim ekstraktima algi određeni primjenom HPLC- UV/VIS PDA metode

Table 9. Mass fractions of chlorophyll (mg/100 g d.w.) in the analyzed algae extracts determined using the HPLC-UV/VIS PDA method

Alga	Fucus virsoides	Cystoseira barbata	Sargassum hornschurchii	Ulva lactuca	Dasycladus vermicularis	Corallina elongata
klorofil b	nd	nd	nd	47,63±0,80	38,67±0,70	nd
der 1 klorofil b	nd	nd	nd	nd	nd	nd
der 2 klorofil b	nd	nd	nd	nd	nd	nd
klorofil a	72,07±0,70	33,68±0,40	78,04±1,01	63,41±1,30	58,70±0,30	16,54±0,60
der 1 klorofil a	2,41±0,01	nd	2,99±0,01	10,02±0,10	nd	nd
der 2 klorofil a	2,91±0,01	nd	nd	5,29±0,30	nd	nd

Rezultati su izraženi kao mg/100g s.tv. uzorka (prosječna vrijednost ± standardna devijacija); nd- neidentificiran spoj

Tablica 10. Rezultati statističke analize utjecaja vrste algi na maseni udio klorofila

Table 10. Results of a statistical analysis of the influence of algae species on the mass fraction of chlorophylls

Alga	Klorofili (mg/100 g s.tv.) ( $p < 0,001$ )
Fucus virsoides	77,85±0,22c
Cystoseira barbata	33,84±0,22b
Sargassum hornschurchii	81,15±0,22d
Ulva lactuca	126,00±0,22f
Dasycladus vermicularis	97,37±0,22e
Corallina elongata	16,60±0,22a

## Zaključak

U ovom istraživanju MAE je optimizirana na smeđoj algi *Halopteris scoparia* s obzirom na prinos ukupnih fenola i pigmenta te su utvrđeni optimalni uvjeti ekstrakcije za MAE: temperatura 25 °C, snaga mikrovalova 300 W i vrijeme ekstrakcije od 25 minuta. Pri optimalnim uvjetima dobiveni su ekstrakti različitih smeđih, zelenih i crvenih algi te su određeni ukupni fenoli i sastav pojedinačnih pigmenta HPLC metodom te je također u analiziranim uzorcima određena antioksidativna aktivnost primjenom ORAC, ABTS i DPPH metoda. Rezultati pokazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenola određen u uzorcima smeđih algi, a najmanji u crvenoj algi *Corallina elongata*. Najveći sadržaj klorofila određen je u zelenim algama gdje su najzastupljeniji bili klorofil a i klorofil b. U smeđim algama određen je najveći sadržaj karotenoida, a najzastupljeniji su bili derivat luteina i derivat neoksantina. Analizirani ekstrakti algi su pokazali visoku antioksidativnu aktivnost, a najveće ABTS i DPPH vrijednosti određene su u uzorcima smeđih algi, te ORAC antioksidativna aktivnost u zelenim algama. Stoga možemo zaključiti da su ekstrakti smeđih algi bogat izvor karotenoida i fenola, a zelene alge klorofila te kao izvor vrijednih antioksidanasa mogu imati potencijalnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (proizvodnji proizvoda dodane vrijednosti, funkcionalne hrane i dodataka prehrani).

## Literatura

- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food chemistry*, 138 (2-3) 1764-1785.
- Barbosa, M., Valentão, P., Andrade, P.B. (2014). Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: Implications for neurodegenerative diseases. *Marine drugs*, 12 (9) 4934-4972.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.L. W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28 (1) 25-30.
- Bravo, L., Mateos, R. (2008). Analysis of flavonoids in functional foods and nutraceuticals. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, 145-204.
- Čalinoiu, L.F., Vodnar, D.C. (2019). Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran. *Biomolecules*, 10 (1) 21.
- Cao, C., Huang, Q., Zhang, B., Li, C., Fu, X. (2018). Physicochemical characterization and in vitro hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* by microwave-assisted aqueous two-phase extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109 357-368.
- Castro-Puyana, M., Pérez-Sánchez, A., Valdés, A., Ibrahim, O.H.M., Suarez-Álvarez, S., Ferragut, J.A., Micol, V., Cifuentes, A., Ibáñez, E., García-Cañas, V. (2017). Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International*, 99 1048-1055.
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 41 (6) 1067-1072.
- Cikoš, A.M., Jokić, S., Šubarić, D., Jerković, I. (2018). Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Marine drugs*, 16 (10) 348.
- Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Ar Gall E. (2004) Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina* 47:410-416.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int Food Res J* 17: 205-220.
- Čagalj, M., Skroza, D., Tabanelli, G., Özogul, F., Šimat, V. (2021). Maximizing the antioxidant capacity of *Padina pavonica* by choosing the right drying and extraction methods. *Processes*, 9 (4) 587.
- Dang, T.T., Bowyer, M.C., Van Altena, I.A., Scarlett, C.J. (2018). Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga *Sargassum vestitum*. *Separation science and Technology*, 53(11) 1711-1723.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Brnčić, M., Dragović-Uzelac, V. (2018). UPLC-MS2 profiling of blackthorn flower polyphenols isolated by ultrasound-assisted extraction. *Journal of food science*, 83(11) 2782-2789.
- Esquivel-Hernández, D.A., Ibarra-Garza, I.P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S.P., Rostro-Alanis, M.D.J., Alemán-Nava, G.S., García-Pérez, J.S., Parra-Saldívar, R. (2017). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11 (1) 215-231.





- Garcia-Perez, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, A., Pereira, A.G., Fraga-Corral, M., Zhao, C., Xiao, J., Simal-Gandara, J. Prieto, M.A., (2022). Pigment composition of nine brown algae from the Iberian northwestern coastline: influence of the extraction solvent. *Marine Drugs*, 20 (2) 113.
- Georgiopoulou, I., Tzima, S., Louli, V., Magoulas, K. (2023). Process Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Compounds from *Chlorella vulgaris* and Comparison with Conventional and Supercritical Fluid Extraction. *Applied Sciences*, 13 (4) 2740.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (6) 315-326.
- Holdt, S. L., Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, 23 543-597.
- Hu, Z., Cai, M., Liang, H.H. (2008). Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Separation and Purification Technology*, 61 (3) 266-275.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P. (2013). Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (20) 4667-4675.
- Kapooore, R. V., Butler, T. O., Pandhal, J., Vaidyanathan, S. (2018). Microwave-assisted extraction for microalgae: From biofuels to biorefinery. *Biology*, 7 (1) 18.
- Khajeh, M., Reza Akbari Moghaddam, A., Sanchooli, E. (2010). Application of Doehlert design in the optimization of microwave-assisted extraction for determination of zinc and copper in cereal samples using FAAS. *Food analytical methods*, 3 133-137.
- Kindleysides, S., Quek, S.Y., Miller, M.R. (2012). Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. *Food Chemistry*, 133 (4) 1624-1631.
- Kothari, V., Seshadri, S. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. *Nutrition & Food Science*, 40 (4) 403-408.
- Ma, W., Lu, Y., Dai, X., Liu, R., Hu, R., Pan, Y. (2009). Determination of anti-tumor constitute mollugin from traditional chinese medicine *Rubia cordifolia*: comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Separation Science and Technology*, 44 (4) 995-1006.
- Manev, Z.K., Petkova, N.T. (2021). Component composition and antioxidant potential of *Cystoseira barbata* from the Black Sea. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series II: Forestry Wood Industry Agricultural Food Engineering*, 163-172.
- Miller N., Rice-Evans C. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research* 26: 195-199.
- Mokrani, A., Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162 68-76.
- Montero, L., Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2014). Separation and characterization of phlorotannins from brown algae *Cystoseira abies-marina* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Electrophoresis*, 35 (11) 1644-1651.
- Osorio-Tobón, J.F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57 4299-4315.
- Ozgun, S., Turan, F. (2015). Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 21 (2) 125-134.
- Peng, F., Cheng, C., Xie, Y., Yang, Y. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from "Anli" pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim). *Food Science and Technology Research*, 21 (3) 463-471.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Silva, A., Amorim, M., Pereira, L., Rocha-Santos, T.A., Gomes, A.M., Duarte, A.C., Freitas, A.C., (2015). Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (12) 3177-3188.
- Rodriguez-Jasso, R.M., Mussatto, S.I., Pastrana, L., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. (2011). Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*, 86 (3) 1137-1144.
- Routray, W., Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5 409-424.
- Safari, P., Rezaei, M., Shaviklo, A.R. (2015). The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian gulf green algae (*Chaetomorpha* sp.) using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52 2974-2981.
- Shortle, E., O'grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat science*, 98 (4) 828-834.
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2231 606X.
- Wang, H.M.D., Li, X.C., Lee, D.J., Chang, J.S. (2017). Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource technology*, 244 1407-1415.
- Wang, T., Jonsdottir, R., Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food chemistry*, 116 (1), 240-248.
- Wang, Y., You, J., Yu, Y., Qu, C., Zhang, H., Ding, L., Zhang, H., Li, X. (2008). Analysis of ginsenosides in *Panax ginseng* in high pressure microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 110 (1) 161-167.
- Wangensteen, H., Samuelsen, A. B., Malterud, K. E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food chemistry*, 88 (2) 293-297.
- Xu, S.Y., Huang, X., Cheong, K.L. (2017). Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Marine Drugs*, 15 (12) 388.
- Yalçın, S., Karakaş, Ö., Okudan, E.Ş., Başkan, K.S., Çekiç, S.D., Apak, R. (2021). HPLC detection and antioxidant capacity determination of brown, red and green algal pigments in seaweed extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 59 (4) 325-337.
- Yuan, Y., Macquarrie, D.J. (2015). Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept. *Bioresource technology*, 198, 819-827.