

UNIVERSITA' DI BOLOGNA
SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Biologia Marina

**Determinazione del contenuto polifenolico e dell'attività
antiossidante in estratti dell'alga bruna *Fucus vesiculosus***

Tesi di laurea in Botanica marina applicata

Relatore

Prof. Rossella Pistocchi

Presentata da

Anna Calfapietra

Correlatore

Prof. Carolina Padrón Sanz

III sessione

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

1 Introduzione	3
1.1 Prodotti naturali.....	3
1.1.1 Origine dei prodotti naturali.....	3
1.1.2 Alcuni esempi di prodotti naturali.....	4
1.1.3 Prodotti naturali di origine marina.....	6
1.2 Alghe marine come fonte di composti antiossidanti.....	8
1.2.1 Importanza degli antiossidanti esogeni.....	8
1.2.2 Antiossidanti naturali vs antiossidanti sintetici.....	8
1.2.3 Attività antiossidante nelle alghe.....	10
1.2.3.1 Polifenoli.....	14
1.2.3.2 Attività antiossidante nelle alghe brune (Phaeophyceae).....	18
. <i>Fucus vesiculosus</i>	21
1.3 Metodologie applicate.....	23
1.3.1 Estrazione dei polifenoli.....	23
1.3.2 Quantificazione dei polifenoli totali.....	24
1.3.3 Determinazione dell'attività antiossidante.....	25
1.3.4 Analisi cromatografica.....	26
2 Obiettivi	28
3 Materiali e metodi	29
3.1 Campioni.....	29
3.2 Reattivi e macchinari.....	29
3.3 Ottenimento degli estratti.....	30
3.4 Determinazione del contenuto polifenolico totale.....	31
3.4.1 Preparazione della curva di calibrazione.....	31
3.4.2 Procedimento dettagliato per l'analisi quantitativa dei polifenoli totali.....	32
3.5 Determinazione dell'attività antiossidante.....	33
3.6 Analisi HPLC.....	33
3.6.1 Preparazione curve di calibrazione.....	34
3.6.2 Procedimento per l'identificazione dei singoli polifenoli.....	35
3.7 Analisi statistica.....	35

4 Risultati e discussione	36
4.1 Determinazione dei polifenoli totali	36
4.2 Determinazione dell'attività antiossidante.....	39
4.2.1 Attività antiossidante e polifenoli totali.....	42
4.3 Analisi HPLC.....	44
4.3.1 Attività antiossidante e polifenoli individuali.....	50
5 CONCLUSIONI	53
6 BIBLIOGRAFIA	55

1 Introduzione

1.1 Prodotti naturali

Per migliaia di anni i prodotti naturali hanno rivestito un ruolo di enorme importanza nell'ambito sanitario e nella prevenzione delle malattie. Le antiche civiltà cinesi, indiane e nord africane lasciarono scritti che evidenziavano l'utilizzo di fonti naturali per la cura di varie patologie (Phillipson, 2001). Da sempre questi prodotti sono diffusi nelle differenti culture, sebbene, con l'avvento dell'industria chimica, la sintesi di nuovi composti artificiali abbia acquisito una rilevanza crescente.

Nel corso degli anni, la medicina legata all'uso di prodotti naturali, è sempre stata accostata alla medicina tradizionale; gli studi clinici, farmacologici e chimici svolti in questo ambito, hanno però gettato le basi per la sintesi dei recenti farmaci (Newman et al., 2000). Durante gli ultimi decenni, vari studi hanno dimostrato l'importanza dell'uso di prodotti naturali come la fonte più abbondante di composti utilizzati a scopo farmacologico (Cragg et al., 1997; Newman et al., 2003) e diversi autori, come Mikail et al. (2011) ne difendono l'importanza nell'industria alimentare.

La facilità e la rapidità caratterizzanti l'isolamento e la fabbricazione di prodotti di derivazione sintetica, hanno favorito un loro avanzamento nell'impiego farmacologico, determinando una riduzione della domanda e dell'interesse per i prodotti naturali (Mishra & Tiwari, 2011); questi ultimi però, continuano a fornire una struttura unica e di grande diversità e a offrire opportunità di scoperta di nuovi composti a basso peso molecolare. Inoltre, bisogna tenere in considerazione il fatto che solo un 10% della biodiversità mondiale è stata valutata in relazione alla sua potenziale attività biologica, e per questo molti composti di grande interesse aspettano solo di essere scoperti (Cragg & Newman, 2005).

1.1.1 Origine dei prodotti naturali

Per quanto riguarda l'origine biochimica dei prodotti naturali, è importante avere chiari alcuni concetti. Il metabolismo primario include quei processi, come: la biosintesi e la degradazione delle proteine, degli acidi grassi, degli acidi nucleici, e dei carboidrati, che fanno parte di tutti gli organismi viventi, innescati e portati a termine per azione di composti che prendono il nome di metaboliti primari (Dewick, 2002). Si parla invece di metaboliti secondari, riferendosi alla biosintesi di composti

da parte dell'organismo, caratteristici dell'individualità di quest'ultimo, generalmente non essenziali per la crescita, lo sviluppo e la riproduzione dello stesso, ma prodotti in risposta a stimoli ambientali, come adattamenti necessari per la sopravvivenza (Maplestone et al., 1992). Questi composti generalmente apportano benefici ai loro produttori, come ad esempio i veleni che li proteggono dai competitori, predatori e parassiti. Sono prodotti a partire da precursori presenti universalmente (per lo più acetil coenzima A, aminoacidi e acido shikimico) per azione di enzimi specifici che probabilmente originano dalla duplicazione e dalla divergenza di geni normalmente codificanti per il metabolismo primario (Cavalier Smith, 1992). Queste modificazioni possono essere indotte da cause naturali (es: virus o cambiamenti nell'ambiente circostante) o non naturali (chimiche o radioattive) all'interno dell'organismo, come sforzo del medesimo per adattarsi a tali cambiamenti e aumentare la propria longevità (Sarker et al., 2006). I metaboliti secondari sono coinvolti nelle vie biosintetiche, secondo differenti meccanismi e reazioni (alcalinizzazione, decarbossilazione, ecc.) (Dewick, 2002).

1.1.2 Alcuni esempi di prodotti naturali

Esistono vari tipi di farmaci di origine naturale, individuati in funghi e microrganismi: un esempio è la scoperta, ad opera di Fleming nel 1929, della Penicillina, come prodotto della specie funginea *Penicillium notatum*; il farmaco fu successivamente perfezionato, da Chain e da Florey, durante gli anni '40, e valse ad entrambi, insieme a Fleming, il premio Nobel nel 1945 per la Fisiologia e la medicina. Iniziò così una vera rivoluzione nella ricerca di nuovi farmaci e molti scienziati cominciarono a dedicarsi allo studio di un gran numero di organismi con il fine di scoprire nuovi antibiotici (Butler, 2004).

Zjawiony, (2004) afferma che approssimativamente il 75% dei funghi poliporoidi studiati hanno mostrato una forte attività antimicrobica, inoltre si sono rivelati importanti per lo sviluppo di nuovi antibiotici; a questi si attribuiscono anche proprietà antivirali, antineoplastiche, cardiovascolari, antinfiammatorie, immunostimolanti e anticancerogene (Stamets, 2002; Zjawiony, 2004).

Anche i microrganismi hanno rivestito un ruolo importante come produttori naturali: è il caso della Vancomicina, un glicopeptide antibiotico prodotto in coltura dal batterio *Amycolatopsis orientalis*, con un'importante attività contro i batteri gram-

positivi come per esempio, quelli appartenenti al genere *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e contro i gram-negativi, micobatteri e funghi; l'uso di questo prodotto è vitale per pazienti ipersensibili alla Penicillina. Un altro esempio è l'Eritromicina, ottenuta *Saccharopolyspora erythraea*, e usata come farmaco antibatterico, in quanto presenta un ampio spettro protettivo contro il gram-positivo cocco-bacillo, e come trattamento delle infezioni respiratorie (Butler, 2004).

L'utilizzazione di piante come importante fonte di prodotti naturali è evidente dal momento che per anni ne sono stati documentati i possibili impieghi medicinali (Kinghorn et al., 2011). La loro evoluzione e i loro adattamenti competitivi contro batteri, insetti, funghi e soprattutto l'adattamento al clima, durante milioni di anni, presuppongono un'importante produzione di metaboliti secondari dalla struttura caratteristica e unica (McRae et al., 2007).

Alcuni degli esempi più conosciuti sono: la sintesi dell'agente antinfiammatorio acido acetilsalicilico (aspirina) che deriva dal prodotto naturale Salicina, isolato dalla corteccia del salice *Salix alba* L. o gli alcaloidi derivati da *Papaver somniferum* L. come la Morfina, l'Eroina e la Codeina. Il Chinino, isolato dalla corteccia di *Chinchona succirubra*, fu approvato in USA nel 2004 come farmaco contro la malaria, con un'ampia attività nella storia, contro sintomi come la febbre, indigestione, infermità della bocca e della gola e nel trattamento del cancro (Dias et al., 2012).

Un altro esempio è l'Acido betulinico, ottenuto dalla corteccia di *Betula pubescens*, che può inibire la topoisomerasi I ed è stato inoltre valutato in Fase I di sperimentazione in studi contro il cancro (Yogeeswari & Sriram, 2005).

Più del 50% dei farmaci sul mercato derivano da prodotti naturali e tradizionalmente questi sono tratti dall'ambiente terrestre. Il fatto che le fonti utilizzate si stiano velocemente sfruttando ed esaurendo ha portato gli scienziati a cercare nell'ambiente marino una nuova sorgente di prodotti naturali (Paniagua Michel, 2009). Lo sviluppo delle tecniche SCUBA (Self Contained Underwater Breathing Apparatus) e più recentemente dei veicoli sommergibili, ha consentito, a partire dagli anni Sessanta, un rapido accesso sia agli organismi che vivono in superficie che a quelli che popolano le acque profonde, rendendoli disponibili alle analisi chimiche. Gli studi condotti hanno già largamente provato che l'habitat marino è una fonte straordinaria di nuovi metaboliti bioattivi (Giordano, 2007).

1.1.3 Prodotti naturali di origine marina

Numerosi studi dimostrano che gli organismi marini sono ricchi di metaboliti bioattivi che in generale presentano una struttura chimica nuova e diversa da quella dei prodotti di origine terrestre (Faulkner, 1995). Questa diversità è stata attribuita alle condizioni fisiche e chimiche caratteristiche dell'ambiente marino, con un ampio range di temperatura (0-350°C), pressione (1-1.000 atm), nutrienti (ambienti oligotrofi ed eutrofici), estese zone fotiche e non fotiche. Questa variabilità ha facilitato una speciazione intensiva a tutti i livelli filogenetici a partire dai microorganismi fino ai mammiferi (Kijjoa & Sawangwong, 2004). Gli ecosistemi marini rappresentano quindi una risorsa abbondante di diversità biologica e chimica, esplorata per la scoperta di nuovi composti bioattivi, e mostrano un importante potenziale nello sviluppo dell'industria farmacologica, medica e alimentare (Kumar & Zi-rong, 2004).

In alcune civiltà antiche, i prodotti naturali marini si utilizzavano nell'ambito della medicina tradizionale per curare diverse patologie, e anche nell'attualità continuano a rivestire un ruolo importante nel sistema terapeutico (Gopal et al., 2008).

Bhakuni & Rawat (2005) esaltano il potenziale dell'oceano come fonte di composti bioattivi molto differenziati e con diverse applicazioni chimiche e mediche nel campo della scienza, come per esempio per la cura del cancro o di malattie infiammatorie (Proksch et al., 2002), e il loro studio è incentrato sui metaboliti bioattivi provenienti da organismi marini come batteri, funghi e microalghe.

Lo sviluppo di composti farmacologici di origine marina, comincia oltre 50 anni fa con la scoperta della spongiotimidina e spongiorudina da parte di Bergmann & Finney, (1951) dalla spugna *Tethya crypta*. Il successivo sviluppo di analoghi sintetici ha fornito due composti di importante rilevanza clinica, l'arabinosil adenina (Ara-A, 3), e l'arabinosil citosina (Ara-C, 4), molecole anticancro per il trattamento della leucemia mielocitica acuta e del linfoma non-Hodgkin's (Bodey et al., 1969).

A partire da quel momento i prodotti naturali marini hanno attirato l'attenzione di biologi e chimici di tutto il mondo, e da allora approssimativamente 16.000 prodotti naturali sono stati isolati a partire da organismi marini e vi si sono dedicate più di 6.500 pubblicazioni. Inoltre circa 9000 pubblicazioni raccolgono sintesi, opinioni, studi sull'attività biologica, di interesse ecologico, e altro, relativi al tema dei prodotti naturali di origine marina (Bhakuni & Rawat, 2005).

Al centro della ricerca di organismi marini produttori di molecole di interesse, si trovano principalmente specie dal corpo blando, sessili e dotate di movimenti primitivi e limitati, che in un ambiente così ostile come quello marino, possono difendersi da competitori e predatori solo attraverso la sintesi di sostanze chimiche (metaboliti secondari). L'intensa pressione evolutiva esercitata su questi organismi da predatori e competitori ha favorito lo sviluppo di un arsenale di potenti composti chimici che costituiscono il loro principale sistema di difesa (Thakur et al., 2005).

Come importanti esempi di composti con applicazioni farmacologiche di origine marina si possono citare la ziconotida, il primo peptide scoperto nella conchiglia di un gasteropode tropicale (*Conus magus*), approvato nel 2004 come trattamento del dolore; la plitidepsina, un depsipeptide isolato dal tunicato mediterraneo (Urdiales et al., 1996), con applicazione nel trattamento del cancro di vari tipi, incluso il melanoma (Henríquez et al., 2005); anche la spisulosina, isolato dalla conchiglia marina di *Spisula polynyma*, esibì un'azione efficace contro le cellule tumorali (Alvarez Miranda et al., 2003).

L'ectinascidina 743, un tipo di alcaloide, fu isolato dall'ascidia *Ecteinascidia turbinata* che vive nei pantani associati con le mangrovie nei Caraibi, presenta un ampio spettro di proprietà citotossiche e studi in laboratorio sono risultati positivi contro la leucemia dei ratti e il cancro al seno degli umani. Un altro esempio è la dolastatina 10, ottenuta da un mollusco dell'Oceano Indico, *Dolabella auricularia*, conosciuto come orecchia di mare, il farmaco è stato sintetizzato chimicamente e si è rivelato promettente contro il cancro della pelle. La curacina A, e analoghi chemiosintetici, rappresenta uno dei casi con esito di ricerca sui prodotti naturali a partire da cianobatteri marini (Paniagua Michel, 2009).

Tra gli organismi marini, le alghe sono state identificate come una risorsa ancora poco sfruttata, malgrado siano state riconosciute come valida fonte di composti bioattivi strutturalmente diversi. Recentemente, molta attenzione è stata rivolta all'attività antiradicalica dei metaboliti presenti nelle alghe marine e lavori importanti sono stati incentrati sulla presenza di antiossidanti non tossici nelle alghe (Vadlapudi, 2012).

1.2 Alghe marine come fonte di composti antiossidanti

1.2.1 Importanza degli antiossidanti esogeni

Lo stress ossidativo indotto da radicali dell'ossigeno è considerato un fattore primario in varie malattie croniche e degenerative come patologie del fegato, invecchiamento e diabete. Specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species) quali il radicale anione-superossido, radicali idrossilici, e altri composti non radicali derivati dall'ossigeno come il perossido di idrogeno, sono costantemente generati dai normali processi metabolici come parte del controllo delle reazioni infiammatorie e come risultato dell'esposizione a fattori ambientali (Halliwell et al., 2012). La generazione e la rimozione di questi composti è fortemente controllata in condizioni omeostatiche, risultando nel mantenimento dell'equilibrio redox cellulare. Molti enzimi sono coinvolti nell'equilibrio redox: NADPH ossidasi, xantina ossidasi, ossido nitrico sintasi, e il citocromo p450 catalizzano la produzione di specie reattive, mentre glutatione perossidasi, superossido dismutasi e catalasi ne facilitano la decomposizione (Curtin et al., 2002). Tuttavia, in situazioni avverse, queste difese antiossidanti non sono sufficienti per eliminare le specie reattive dell'ossigeno. Questo squilibrio tra la generazione di radicali liberi e le difese antiossidanti interne, porta a modificazioni chimiche delle macromolecole di rilevanza biologica come per esempio, proteine, lipidi e carboidrati; si va quindi incontro a stress ossidativo, che può portare allo sviluppo di varie patologie come: arteriosclerosi, diabete mellito, cancro, malattie neurodegenerative, ictus, infertilità, cataratta, malattie autoimmuni, infermità del sistema nervoso centrale e danno per ischemia e riperfusione (Wulf, 2002).

Per queste ragioni è importante la ricerca di antiossidanti naturali, come pure di derivazione sintetica, a supporto delle difese antiossidanti endogene, che in condizioni di stress ossidativo potrebbero non essere sufficienti.

1.2.2 Antiossidanti naturali vs antiossidanti sintetici

L'uso degli antiossidanti risale a tempi antichi, quando erbe e spezie erano utilizzate per la preservazione dei cibi, mentre la moderna tecnologia dedicata alla scoperta di composti antiossidanti si sviluppa a partire da circa 60 anni fa. Dal momento in cui i radicali liberi sono stati riconosciuti come responsabili della perossidazione

lipidica, centinaia di composti naturali e sintetici sono stati valutati per la loro efficacia come agenti anti-radicali liberi, o per altri effetti inibitori (Shahidi & Zhong, 2005).

Studi recenti hanno dimostrato l'importanza degli antiossidanti sintetici nella medicina e nell'industria alimentare, come l'inibizione o il ritardo dell'ossidazione delle biomolecole (Batista González et al., 2009).

In generale, quelli sintetici sono composti con struttura fenolica con differenti gradi di sostituzione alchilica, mentre gli antiossidanti naturali possono essere composti fenolici, nitrogenati, come gli alcaloidi, derivati da clorofilla, aminoacidi e ammine, carotenoidi, e vitamine come l'acido ascorbico e il tocoferolo (Velioglu et al., 1998).

L'applicazione di questi antiossidanti si è estesa a molti prodotti, includendo farmaci, cosmetici e alimenti di consumo umano e animale (Conde Piñeiro, 2009).

Gli antiossidanti sintetici maggiormente commercializzati, sono i composti derivati da struttura fenolica: butilidrossianisolo (BHA), butilidrossitoluene (BHT), e terbutilidrossichinone (TBHQ) (Valenzuela et al., 2003). Questi antiossidanti di derivazione sintetica, presentano numerosi inconvenienti (Maestro Duran & Borja Padilla, 2003).

Diversi studi hanno provato l'effetto tossico degli additivi sintetici, il cui uso è stato regolato e ristretto in molti paesi dal momento che è stato dimostrato che alti livelli di BHT, BHA e TBHQ possono comportarsi come agenti promotori di cancro o teratogeni, produrre un ingrossamento del fegato e una marcata proliferazione del reticolo endoplasmatico (Van Esch, 1996).

Altre alterazioni segnalate sono state una diminuzione della crescita e caduta dei peli nei ratti, iperplasia delle cellule epiteliali delle pieghe stomacali e un effetto tossico nelle cellule di babuino da parte del BHT (Hirose et al., 1986). Ulteriori studi indicano che il BHT può causare danni in altri organi, come i polmoni e la mucosa gastrointestinale. Per queste ragioni è stato eliminato dalla lista degli additivi per alimenti considerati sicuri (GRAS = Generally Recognized As Safe) (Branen et al., 1975).

Per tutti questi motivi, esiste una tendenza sempre più forte a evitare o minimizzare l'utilizzo di sostanze sintetiche come additivi alimentari. I principali vantaggi e svantaggi associati agli antiossidanti sintetici e naturali sono stati riassunti in Tab 1 (Conde Piñeiro, 2009).

Tab 1. Principali vantaggi e svantaggi di antiossidanti sintetici e naturali (Conde Piñeiro, 2009).

Antiossidanti sintetici	Antiossidanti naturali
Economici	Costi maggiori
Diverse applicazioni	Uso ristretto ad alcuni prodotti
Medio-alta attività antiossidante	Ampio margine di attività antiossidante
Uso proibito per alcuni tra questi	Considerate sostanze innocue
Bassa solubilità in acqua	Molto solubili
Interesse decrescente	Interesse crescente

Di fronte alla crescente opposizione all'impiego di antiossidanti sintetici nell'alimentazione (Maestro Duran & Borja Padilla, 2003) e nella medicina, in quanto considerati potenzialmente pericolosi per la salute umana (Vadlapudi, 2012), la ricerca si è orientata verso la scoperta di prodotti naturali ad attività antiossidante (Maestro Duran & Borja Padilla, 2003) che possano essere utilizzati, senza effetti secondari tossici per l'essere umano, al posto di quelli artificiali (Vadlapudi, 2012).

Gli antiossidanti naturali presenti in diverse quantità in verdura e frutta, come pure nelle foglie, nei fiori, in radici, cereali, semi e nelle alghe marine, sono considerati i candidati ideali come alternativa agli antiossidanti sintetici (Valenzuela et al., 2003); questi non si possono sintetizzare a livello endogeno e li deriviamo dalla dieta (Cavia Saiz, 2010). Negli ultimi anni, si sta dedicando un grande sforzo all'identificazione di sostanze di origine naturale con capacità antiossidante, con la finalità di minimizzare il consumo di composti sintetici (Conde Piñeiro, 2009). In questa incessante ricerca, il mare e la sua biodiversità hanno rappresentato una fonte inesauribile di esplorazione (Morales Aguilera et al., 2010).

1.2.3 Attività antiossidante nelle alghe

Tra le fonti naturali le alghe costituiscono una buona opzione per la ricerca di nuovi prodotti bioattivi, specialmente antiossidanti (Harvey, 2000); sono inoltre organismi considerati generalmente poco tossici (Grabley & Thiericke, 1999).

Il loro consumo come parte della dieta di alcune popolazioni umane (Linares, 2005), soprattutto asiatiche, dove sono considerate alimenti tradizionali (Novoa et al., 2006), è stato associato ad una varietà di effetti benefici per la salute, per esempio la riduzione dell'incidenza di alcuni tipi di cancro. Tutto questo suggerisce che le

alghe contengano composti biologicamente attivi capaci di modulare diverse funzioni fisiologiche dell'organismo (Linares, 2005).

Le alghe marine producono una quantità di composti che agiscono come sistemi di difesa chimici facilitando la loro sopravvivenza in ambienti estremamente competitivi (Cardozo et al., 2007). La ricerca svolta negli ultimi 40 anni, nell'ambito della chimica dei prodotti naturali e delle difese chimiche delle alghe, ha portato all'isolamento di più di 15.000 nuovi composti, molti dei quali hanno dimostrato proprietà bioattive (Cardozo et al., 2007; Blunt et al., 2011).

Da un punto di vista generale, si può dire che le alghe siano una fonte di composti bioattivi che presentano carattere rinnovabile, e sono facilmente ottenibili. A questo si aggiunge l'elevata biodiversità che presentano questi organismi, specialmente nelle regioni tropicali (Harvey, 2000).

Le alghe sono esposte a una combinazione di luce e ossigeno che porta alla formazione di radicali liberi. Numerosi studi hanno suggerito che l'assenza di danno ossidativo nei componenti strutturali di questi organismi e la stabilità che le alghe presentano di fronte a condizioni avverse tipiche dell'ambiente marino, siano dovute anche alla presenza di antiossidanti effettivi (Burritt et al., 2002). La ricerca di composti antiossidanti nelle alghe, è stata quindi motivata dal fatto che si presuppone necessaria la loro presenza come difesa nel mezzo ossidativo "ostile" abitato da questi organismi (Linares, 2005).

Durante gli ultimi anni sono stati pubblicati diversi lavori incentrati sull'attività antiossidante nelle macro e microalghe, in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* (Linares, 2005); si è prestata una particolare attenzione allo studio degli effetti antiossidanti di estratti provenienti da diverse macroalghe, appartenenti ai tre grandi raggruppamenti: alghe verdi, rosse e brune (Senthilkumar & Sudha, 2011).

È stata realizzata una tabella (Tab 2) dove vengono riportati i lavori consultati durante la stesura di questa tesi, che indagano e dimostrano le potenzialità antiossidanti di alcune alghe, suddivise per classe di appartenenza (Clorophyceae, Rhodophyceae e Phaeophyceae).

Tab 2. Referenze bibliografiche che riportano attività antiossidante in alcune Clorophyceae, Rhodophyceae e Phaeophyceae.

Macroalghe	Spp.	Bibliografia
Clorophyceae	<i>Caulerpa spp.</i>	Santoso et al., 2004 Kumar et al., 2011 Zhongrui et al., 2012
	<i>Chaetomorpha spp.</i>	Senthilkumar & Sudha, 2011 Kelman et al., 2012 Indu & Seenivasan, 2013 Farasat et al., 2013
	<i>Cladophora spp.</i>	Horincar et al., 2011 Saadatmand et al., 2011 Zbakh et al., 2012
	<i>Halimeda spp.</i>	Linares et al., 2003 Linares et al., 2004 Novoa et al., 2009 Novoa et al., 2009 Farasat et al., 2014
	<i>Thalassia testudinum</i>	Nuñez et al., 2006 Garateix et al., 2011
	<i>Ulva spp.</i>	Hassan & Ghareib, 2009 Meenakshi et al., 2009 Chakraborty & Paulraj, 2010 Horincar et al., 2011 MyoungLae et al., 2011
Rhodophyceae	<i>Acanthophora spicifera</i>	Sachindra et al., 2010
	<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Novoa et al., 2001 Linares et al., 2003 Linares, 2005 Novoa et al., 2006
	<i>Ceramium Rubrum</i>	Horincar et al., 2011
	<i>Gracilaria spp.</i>	Sachindra et al., 2010 De Almeida et al., 2011 Yang et al., 2012
	<i>Kappaphycus alvarez</i>	Sachindra et al., 2010
	<i>Laurencia obtusa</i>	Freile Pelegrín, 2001

	<i>Palmaria palmate</i>	Yuan & Walsh, 2006
	<i>Porphyra spp.</i>	Berge et al., 2002 Zhang et al., 2004 Navnath et al., 2013
	<i>Rhodomela confervoide</i>	Huang & Wang, 2004
	<i>Symphjocladia latiuscula</i>	Huang & Wang, 2004
Phaeophyceae	<i>Cystoseira spp.</i>	Zubia et al., 2009 Ruberto et al., 2001 Sadati et al., 2011 Ferrerres et al., 2012
	<i>Eisenia bicyclis</i>	Kuda et al., 2005
	<i>Eklonia spp.</i>	Lee et al., 1996 Kang et al., 2003 Kang et al., 2005 Lee et al., 1996 Ham et al., 2007
	<i>Fucus spp.</i>	Abdussalam, 1990 Keyrouz et al., 2011 Ruberto G. et al., 2001 Rupérez et al., 2002 Cérantola et al., 2006 Kandaswamy Veena et al., 2007 Zaragozá et al., 2008 Díaz-Rubio et al., 2009 Zubia et al., 2009 Lordan et al., 2013 Thierney et al., 2013 Rodriguez Jasso et al., 2014
	<i>Hijikia fusiformis</i>	Yan et al., 1999
	<i>Padina tetrastomatica</i>	Chandini et al., 2008 Sachindra et al., 2010
	<i>Pelvetia siliquosa</i>	Hwang et al., 2012
	<i>Sargassum spp</i>	Yan et al., 1996 Lim et al., 2002 Jang Kyoung et al., 2005 Chandini et al., 2008

	Sadati et al., 2011 López et al., 2011 Budhiyanti et al., 2012 Suresh et al., 2012 Indu & Seenivasan, 2013 Rattaya et al., 2014
<i>Taonia atomaria</i>	Nahas et al., 2007
<i>Turbinaria spp</i>	Chandini et al., 2008 Ananthi et al., 2010 Sachindra et al., 2010 Kelman et al., 2012 Girija et al., 2013 Rattaya et al., 2014

Studi recenti hanno rivelato che le alghe marine contengono un ampio numero di metaboliti secondari con importanti attività biologiche che non possono essere trovate in piante terrestri (Wang et al., 2012). Questi lavori hanno portato alla scoperta di vari composti con attività antiossidante nelle alghe, tra i quali polisaccaridi, fibre, minerali, proteine, amminoacidi, vitamine, polifenoli, carotenoidi (Burtin, 2003; Yoshiki et al., 2009; Wang et al., 2012).

Tra questi gruppi di metaboliti, i polifenoli hanno dimostrato una maggiore attività antiossidante, sia *in vitro* che *in vivo*, rispetto agli altri composti, questo evidenzia la loro importanza nella dieta, e inoltre hanno anche manifestato proprietà farmacologiche, come attività anticancerogena, antivirale, antimicrobica, antiinfiammatoria, e antitumorale, più effetti contro patologie neurodegenerative (Freile Pelegrín & Robledo, 2014).

1.2.3.1 Polifenoli

In natura esiste un'ampia varietà di composti che presentano una struttura molecolare caratterizzata dalla presenza di uno o vari anelli fenolici, questi composti possiamo denominarli polifenoli (Quiñones et al., 2012).

Da un punto di vista chimico, i composti fenolici sono caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico con un gruppo idrossile e una catena laterale funzionale (Thomson, 1964). I gruppi idrossilici di solito sono in forma acilata o glicosilata, la loro presenza e il loro numero determinano l'attività antiossidante del composto

(Cavia-Saiz, 2010). I polifenoli sono considerati forti antiossidanti (Gumul et al., 2011); la correlazione tra attività antiossidante e struttura molecolare dei composti di natura fenolica, è stata descritta da Cuvelier et al., (1992), che indicano i polifenoli come più attivi rispetto ai monofenoli.

I radicali liberi dell'ossigeno generati nell'organismo come parte integrale del metabolismo, sono altamente reattivi e possono causare disfunzione cellulare e citotossicità (Alviano & Alviano, 2009); in questi casi i polifenoli possono donare un idrogeno ai radicali liberi e produrre radicali non reattivi (Gupta & Abu Ghannam, 2011).

L'efficacia antiossidante di questi composti è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche, e alla geometria della molecola. Condizione fondamentale affinché sia esplicata l'attività antiossidante dei polifenoli è la formazione di radicali fenolici stabili, attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche (Halliwell & Gutteridge, 1990) (Figura 1).

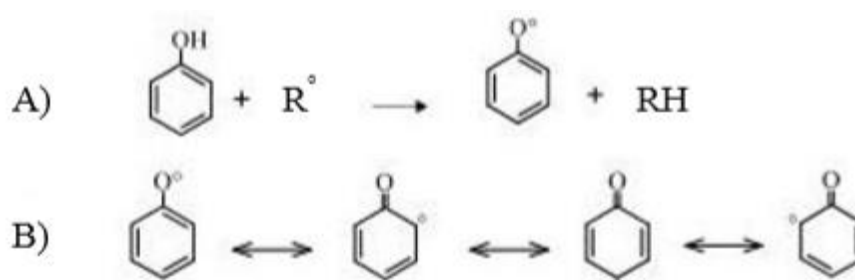


Figura 1. Reazione generica di un composto fenolico con un radicale libero (A); la delocalizzazione dell'elettrone dell'ossigeno sull'anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (B) (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Secondo la classificazione di Harborne & Simmonds, (1964) i polifenoli più importanti sono: gli acidi fenolici, i flavonoidi e i composti fenolici polimerizzati come stilbeni e lignine che si distribuiscono nelle piante e negli alimenti di origine vegetale (Mañach et al., 2004, 2005).

Gli acidi fenolici, anche conosciuti come composti fenolici di basso peso molecolare, contengono un anello benzenico che a seconda dei suoi sostituenti, dà luogo a distinte strutture (Cavia-Saiz, 2010). All'interno di questo gruppo si

distinguono due classi: gli acidi idrossibenzoici (derivati dall'acido benzoico) e gli idrossicinnamici (derivati dall'acido cinnamico) (Figura 2).

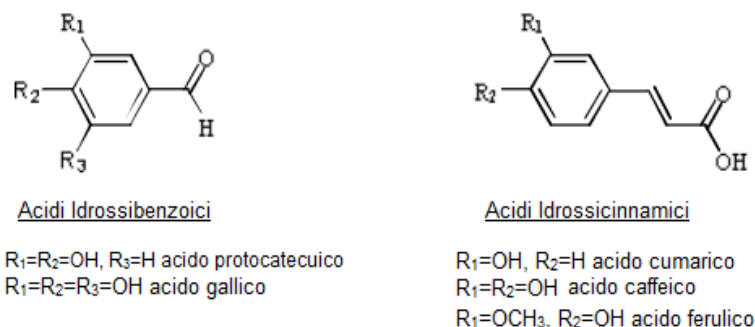


Figura 2. Strutture chimiche degli acidi fenolici più abbondanti in natura (Crisante, 2008).

I flavonoidi costituiscono il gruppo più importante di polifenoli in natura (Robards et al., 1999). Lo scheletro è formato da due anelli (A e B), uniti attraverso un anello pirone o idropirone (C), (Figura 3). Le variazioni strutturali dell'anello C, permettono di suddividere i flavonoidi in sei importanti sottoclassi: flavanoni, flavoni, flavonoli, isoflavonoli, antociani e flavani (Cavia Saiz, 2010).

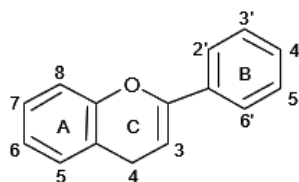


Figura 3. Scheletro base dei flavonoidi (Baccelloni, 2008).

La capacità antiossidante dei flavonoidi e acidi fenolici è in relazione con il numero di gruppi idrossilici costituenti la molecola; un aumento di questi produce un'attività antiossidante maggiore (Cartea et al., 2011).

Numerosi studi hanno dimostrato le capacità antiradicaliche dei flavonoidi, contro specie reattive dell'ossigeno come: anione superossido, radicale idrossile, perossido di idrogeno e radicale perossile, grazie alla loro abilità come donatori di elettroni o atomi di idrogeno (Michalak, 2006).

Wojdylo et al., 2007 hanno studiato l'attività antiradicalica in 32 specie di erbe, e la maggior parte degli estratti analizzati risultano importanti fonti di antiossidanti

naturali in quanto ricchi di acidi fenolici e flavonoidi.

I composti fenolici polimerizzati, includono i tannini e le lignine. I tannini sono fenoli polimerizzati che danno origine a composizioni stabili con le proteine e con i polisaccaridi, grazie al gran numero di gruppi idrossilici che presentano (Cavia Saiz, 2010). Bate Smith & Swain (1962) li definiscono come composti fenolici solubili in acqua, con peso molecolare tra 500 e 400 Da (Dalton), che oltre alle reazioni normali dei polifenoli, presentano proprietà come la capacità di reagire con radicali liberi e ioni metallici (Rivero Perez et al., 2008).

Nonostante i tannini siano molto diffusi sia nelle piante terrestri che acquatiche, i florotannini, come per esempio eckolo e dieckolo (Figura 4), sono stati trovati solo in alghe brune (Antonisamy et al., 2011; Gupta & Abu Ghannam, 2011). Questi composti sono polifenoli formati dalla polimerizzazione del floroglucinolo, rappresentato in Figura 4, per la via dell'acetato-malonato (Wijesinghe & Jeon 2012; Li et al., 2011).

I florotannini svolgono diverse attività biologiche negli organismi, per esempio sono coinvolti nei meccanismi di difesa da ospite; il loro contenuto in alghe brune può costituire fino ad un 20% del peso secco dell'alga (Swanson & Druehl, 2002).

Lo scheletro molecolare dei florotannini può comprendere fino a 8 anelli fenolici (O'Sullivan et al., 2011), mentre le piante terrestri producono tannini costituiti da solo 3 o 4 anelli. Gli anelli fenolici agiscono come trappole per elettroni per i radicali liberi, di conseguenza, questi composti hanno molte proprietà antiossidanti dovute alla loro struttura unica (Antonisamy & Raj, 2011).

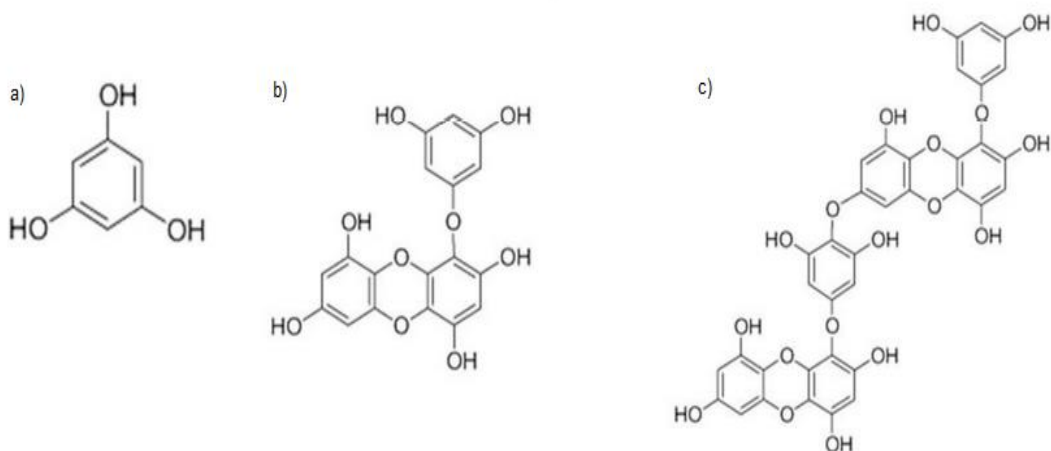


Figura 4. Struttura chimica di: a) floroglucinolo, b) eckolo e c) dieckolo.

I polifenoli e in particolare i flavonoidi, costituiscono uno dei gruppi più numerosi e rappresentativi di sostanze chimiche sintetizzate dalle piante. L'importanza di queste strutture deriva dal loro coinvolgimento in aspetti importanti della vita dei vegetali: la morfologia, la crescita e la riproduzione, oltre a partecipare alla protezione di queste contro piaghe o predatori (Morales Aguilera et al., 2010). Le alghe producono questi composti per proteggersi dalle condizioni estreme come lo stress da erbivori (Li et al., 2011).

In diversi lavori viene esaltata l'attività antiossidante delle alghe brune (Vinayak et al., 2011; Wang et al., 2009) suggerendo che possa essere dovuta all'abbondanza di composti polifenolici che le caratterizza (Nagai & Yukimoto, 2003; Kang et al., 2003; Nakai et al., 2006; Kelman et al., 2012).

1.2.3.2 Attività antiossidante nelle alghe brune (Phaeophyceae)

Le Phaeophyceae sono denominate comunemente alghe brune, dal momento che la ricchezza in xantofille maschera il colore verde delle clorofille. Queste alghe sono considerate le cromofite più evolute, anche per la notevole differenziazione morfologica e per la grandezza dei loro talli nei quali la differenziazione può portare a strutture molto simili a veri tessuti (Gerola, 1997).

Le pareti cellulari delle Phaeophyceae presentano una sezione fibrillare formata da microfibrille di cellulosa, immerse in una matrice amorfa di acidi polisaccaridici, legati l'uno all'altro da proteine; questi sono principalmente composti da fucani solfati (fucoidani) o acidi alginici e conferiscono durezza e flessibilità all'alga (Kloareg & Quatrano, 1988). Queste molecole si sono rivelate molto importanti dal punto di vista economico, dal momento che diversi studi ne dimostrano l'attività contro radicali liberi, nella prevenzione da danno ossidativo negli organismi viventi (Rupérez et al., 2002; Bhakuni & Rawat, 2005; Rocha de Souza et al., 2007; Costa et al., 2010; Rodriguez Jasso et al., 2014).

Secondo Ragan & Glombitza (1986), le alghe brune presentano un contenuto totale di polifenoli pari a un 20-30% del peso secco, facendone, in generale, la classe algale con il maggior potenziale antiossidante (Nagai & Yukimoto, 2003).

Numerosi autori hanno documentato l'attività antiossidante nelle alghe brune e la natura dei composti che ne sono i principali responsabili è ancora oggetto di

discussione.

Viene riscontrato un aumento dell'attività antiossidante in relazione ad un maggiore contenuto polifenolico, in estratti di *Stypocaulon scoparium* (López et al., 2011), *Turbinaria conoides* (Chandini et al., 2008), *Turbinaria ornata* (Rattaya et al., 2014), *Taonia atomaria* (Nahas et al., 2007). Lo stesso si osserva in diversi lavori incentrati su *Sargassum spp.* (Yan et al., 1996; Nakai et al., 2006; Garheib et al., 2010; Sadati et al., 2011; Budhiyanti et al., 2012; Rattaya et al., 2014).

Anche le proprietà antiossidanti di diverse specie appartenenti al genere *Fucus* e *Cystoseira* sono state associate all'abbondanza del loro contenuto polifenolico (Zubia et al., 2009; Thierney et al., 2013) e in particolare alla presenza di alcuni florotannini (Cérantola et al., 2006; Ferreres et al., 2012). Questi composti sono indicati come principali responsabili dell'attività antiossidante di varie specie di alghe brune come *Ecklonia stolonifera* (Lee et al., 1996; Kang et al., 2003; Ham et al., 2007), *Sargassum siliquastrum* (Lim et al., 2002), *Pelvetia siliquosa* (Hwang et al., 2007), *Eisenia bicyclis* (Kuda et al., 2005).

Rupérez et al., (2002), Kandaswamy Veena et al., (2007), Rodriguez Jasso et al., (2014) hanno attribuito l'attività antiossidante di estratti di *Fucus vesiculosus* alla presenza di alcuni polisaccaridi solfatati; mentre in altri studi la capacità antiossidante di quest'alga sembra dipendere dall'abbondanza di polifenoli totali (Koivikko et al., 2007; Díaz Rubio et al., 2009; Parys et al., 2010; Wang et al., 2012) e secondo Zaragoza et al., (2008), dall'interazione tra questi e altri metaboliti, come il carotenoide fucoxantina.

Suresh et al., (2012) ipotizzarono il coinvolgimento di più metaboliti secondari nell'azione antiradicalica riscontrata nei campioni di *Sargassum plagiophyllum*, tra cui: fucoxantina, fucooidani, laminarina, acido alginico e polisaccaridi solfatati.

Yan et al., (1999) suggeriscono che l'attività antiossidante rivelata da estratti di *Hijikia fusiformis* sia dovuta alla presenza del carotenoide fucoxantina. Sempre la fucoxantina viene indicata come potenziale antiossidante in uno studio condotto da Kelman et al., (2012) su *Turbinaria ornata*, mentre Girija et al., (2013) studiando questa specie, hanno evidenziato una corrispondenza tra polifenoli totali degli estratti e attività antiradicalica rilevata. Inoltre Vijayabaskar & Shiyamala (2012), in uno studio su *T.ornata*, sostengono che i polifenoli, più dei carotenoidi siano responsabili del potenziale antiossidante dell'alga.

Sachindra et al., (2010) dimostrarono l'attività antiossidante *in vitro* in alcune alghe rosse e brune, seppure rilevando una maggiore attività in queste ultime, relazionata con il contenuto totale polifenolico degli estratti; la stessa superiorità rispetto ad alghe verdi e rosse viene documentata in altri studi (Nahas et al., 2007; Kelman et al., 2012). In particolare, specie dell'ordine Fucales, a confronto con altre alghe, mostrano un'attività antiossidante maggiore (Zubia et al., 2009).

In base a quanto detto finora è risultato interessante, nell'ambito di questo studio, indagare la natura biochimica dell'attività antiossidante in estratti dell'alga bruna *Fucus vesiculosus*.

. *Fucus vesiculosus*



Dominio	Eukaryota
Regno	Chromista
Pylum	Ochrophyta
Classe	Phaeophyceae
Sottoclasse	Fucophycidae
Ordine	Fucales
Famiglia	Fucaceae
Genere	Fucus
Specie	<i>F.vesiculosus</i>

Figura 5. Illustrazione (Guiry & Dhonncha, 2001) e tassonomia (Guiry & Guiry, 2014) di *Fucus vesiculosus*.

L'alga bruna *Fucus vesiculosus* (Figura 5), appartiene alla famiglia Fucaceae, dell'ordine Fucales, per descrivere la tassonomia di quest'alga (Figura 5), si è fatto riferimento alla banca dati Algae Base (Guiry & Guiry, 2014), costantemente aggiornata e per questo affidabile.

Per quel che riguarda la distribuzione geografica, la troviamo nell'intertidale delle aree costiere temperate del Nord Atlantico, e presenta un ampio margine di tolleranza a variazioni di fattori ambientali quali temperatura, moto ondoso, e salinità (Forsslund, 2012). La morfologia di quest'alga varia in risposta alle condizioni ambientali, inoltre il fatto che possa ibridarsi con altri fucoidi determina la formazione di diverse varietà. Le forme di *F.vesiculosus* caratteristiche di siti esposti a forte moto ondoso, presentano poche vescicole, e sono conosciute come *F.vesiculosus*, forma *linearis* (White, 2008).

Un'importante caratteristica di *F.vesiculosus* è la presenza di vescicole piene d'aria presenti nelle parti membranose, che consentono a questa specie di galleggiare verticalmente (Verhelst, 2010). Il sistema di fissaggio alle rocce è discoidale, le dimensioni del tallo possono variare da 20 a 100 cm di lunghezza, può presentare rami dicotomici appiattiti o foglie pinnate con un nervo centrale. I ricettacoli si trovano agli estremi delle foglie e sono notevolmente sommersi. Una copertura

superficiale di cellule pigmentate avvolge un midollo costituito da una rete di filamenti incolori immersi in una matrice mucillaginosa di cellulosa, alginati e fucoidani. Questi polisaccaridi assorbono acqua contribuendo a mitigare gli effetti prodotti dall'essiccazione. La copertura superficiale cellulare è avvolta da secrezioni di alginati, fucoidani e composti polifenolici, fino a fuori dal tallo (Graham & Wilcox, 2000). In questa specie, vari polisaccaridi solfatati e composti fenolici sono di grande interesse (Truus et al., 2004).

F.vesiculosus è stato al centro di numerosi studi per le sue proprietà farmacologiche, attribuibili ad un alto contenuto di composti bioattivi; in particolare diversi autori documentano le potenzialità antiossidanti dei componenti dell'alga (Abdussalam, 1990; Rupérez et al., 2002; Keyrouz et al., 2011; Kandaswamy Veena et al., 2007; Zaragoza et al., 2008; Diaz Rubio et al., 2009; Wang et al., 2009; Lordan et al., 2013; Rodriguez Jasso et al., 2014), inoltre Zaragoza et al., (2008) dimostrano anche la non tossicità in estratti di *F.vesiculosus*.

Esiste una controversia, tuttora irrisolta, su quale siano i principali composti bioattivi responsabili dell'attività antiossidante di estratti di *F.vesiculosus*, o se quest'ultima possa derivare dall'interazione di più metaboliti secondari.

1.3 Metodologie applicate

1.3.1 Estrazione di composti fenolici

La tecnica più frequentemente utilizzata per ottenere estratti di antiossidanti da matrici di origine vegetale è l'estrazione con solventi. Vengono impiegate diverse combinazioni di solventi tra cui i più comuni sono acqua, etanolo, metanolo, acetone e acetato di etile, usati puri o in miscela (Amin & Mukhrizah, 2006).

La diversità strutturale dei composti fenolici estraibili influenza sia i rendimenti di estrazione sia l'attività degli estratti in relazione al solvente impiegato (Marinova & Yanishlieva, 1997). Anche i protocolli utilizzati per l'estrazione dei composti fenolici sono alquanto differenziati e prevedono condizioni variabili, da temperatura ambiente fino all'ebollizione o al riflusso (Baccelloni, 2008). Poiché l'efficacia antiossidante è legata alla natura dei composti estratti e al tipo di solvente di estrazione impiegato, ne deriva la necessità di sperimentare e selezionare, per ogni campione vegetale di interesse, il solvente e le condizioni più adatte a massimizzare la resa di estrazione e l'attività antiossidante degli estratti ottenuti.

È ben noto che il rendimento dell'estrazione chimica dipenda dal metodo di estrazione, dal tipo di solvente con differenti polarità, dal pH, dal tempo di estrazione e dalla temperatura, così come dalla composizione chimica del campione (López et al., 2011). Tuttavia il tipo di solvente riveste una maggiore importanza ai fini dell'efficienza di reazione. La scelta del solvente si basa sulle caratteristiche chimiche del campione sul quale si vuole effettuare l'estrazione, e ha un forte impatto sulla quantità totale delle sostanze che vengono estratte. In condizioni uguali di tempo e temperatura, i parametri più importanti sono il solvente e la chimica del campione oggetto di studio (López et al., 2011).

Koivikko et al. (2005), affermano che i solventi polari siano i più efficienti nell'estrazione di polifenoli.

Inoltre è documentato che l'uso di acqua in combinazione con altri solventi organici contribuisca alla creazione di un mezzo moderatamente polare che assicura l'estrazione dei polifenoli (Rostagno et al., 2004; Chirinos et al., 2007) e secondo Rostagno et al., (2004) un 30-40% di acqua in aggiunta, ottimizza l'estrazione, mentre se supera il 60%, può comportare una diminuzione della resa.

L'efficienza di estrazione dei fenoli dipende molto anche dal tempo (Rusaka et al., 2008), che risulta determinante ai fini di un miglior rendimento; sono stati riportati tempi di estrazione da 1 minuto a 24 ore (Cork & Krockengerg, 1991; Niknam & Ebrahimzadeh, 2002; Price et al., 2008).

Il solvente ideale per l'estrazione di polifenoli, da *F.vesiculosus* risulta, secondo diversi autori, una miscela di acetone-acqua al 70 % (Kovikko et al., 2005, 2008; Wang et al., 2012; Ferreres et al., 2012), in questi studi i composti estratti con tale solvente mostrano una maggiore attività antiossidante e un contenuto polifenolico totale più alto rispetto ad estratti in metanolo, etanolo, etilacetato e acqua.

1.3.2 Quantificazione dei polifenoli totali

Malgrado la determinazione totale dei polifenoli possa dirsi ostacolata dalla loro complessità strutturale, esistono molti metodi per determinare il totale di composti polifenolici nelle piante (Blainski et al., 2013).

I metodi colorimetrici o biochimici per la quantificazione totale dei polifenoli sono molto utili e affidabili quando è necessaria un'informazione quantitativa dell'insieme dei composti fenolici per intero. La base concettuale del metodo è quantificare la concentrazione totale dei gruppi idrossilici fenolici presenti nell'estratto che si sta analizzando, indipendentemente dalle singole molecole in cui si trovano (Waterman & Mole, 1994). Inoltre sono ampiamente usati nei metodi spettrofotometrici UV/VIS, che sono semplici da effettuare, rapidi e applicabili per uso di routine in laboratorio, ed economici (Pelozo et al., 2008).

Le reazioni chimiche nei metodi colorimetrici non sempre seguono la stechiometria, perciò è importante tenere in considerazione che il rendimento ottenuto rappresenta un'approssimazione del gruppo di composti di interesse (Rohr, 2002).

Tra i diversi metodi disponibili per quantificare i polifenoli totali, quello di Folin-Denis (Folin & Denis, 1912) è uno dei più comunemente usati e si basa su una reazione colorimetrica tra polifenoli o composti aromatici idrossilati e l'acido fosfotungsteno-polimolibdico. Più avanti, Folin e Ciocalteu, (1927) migliorarono questo metodo, allo scopo di aumentarne la sensibilità, con l'aggiunta di solfato di litio al reagente per prevenire la precipitazione nella reazione (Zhang et al., 2006). Ora il reattivo di Folin-Ciocalteu è commercialmente disponibile per la quantificazione dei polifenoli totali e risulta essere il metodo più applicato a questo scopo (Singleton et al., 1999).

Sia il metodo di Folin-Denis che quello di Folin-Ciocalteu, sono stati molto usati per stimare il contenuto totale polifenolico in materiale algale (Zhang et al., 2006). L'efficacia del metodi per la quantificazione dei polifenoli può essere ostacolata dall'interferenza operata da parte di alcune sostanze come: acido ascorbico, zuccheri, ammine aromatiche, acidi organici e sostanze organiche non fenoliche, che possono reagire con il reattivo utilizzato nel metodo (Singleton et al., 1999). Anche escludendo questi composti, i vari fenoli manifestano diverse risposte in reazioni di questo tipo, ad esempio molti flavonoidi presentano una bassa assorbanza il che può portare ad una sottostima dei composti (Zhang et al., 2010). In accordo con Waterman & Mole, (1994) e Le Lann et al., (2008) il metodo di Folin-Ciocalteu è conosciuto come quello meno affetto da questi tipi di intereferenze ed è il più comunemente impiegato per determinare il contenuto polifenolico in alghe brune (Van Alstyne, 1995; Stiger Pouvreau et al., 2014). É importante ricordare che i metodi colorimetrici usano una sostanza di riferimento, per le Phaeophyceae viene comunemente usato il fuoroglucunolo, pertanto il contenuto polifenolico misurato viene espresso in equivalenti di floroglucunolo.

1.3.3 Determinazione dell'attività antiossidante

Un rapido, semplice ed economico metodo per misurare la capacità antiossidante delle alghe, prevede l'utilizzo del radicale libero: 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH). Il saggio con DPPH è ampiamente impiegato per testare l'abilità di composti di interesse, nell'eliminare i radicali liberi, o nell'agire come donatori di idrogeno e per valutare l'attività antiossidante delle alghe. É stato anche usato per quantificare antiossidanti in complessi sistemi biologici negli ultimi anni; questo metodo può essere usato per campioni solidi o liquidi e non è specifico per nessun antiossidante particolare ma quantifica la capacità antiossidante totale presente nel campione (Vadlapudi, 2012). É uno dei test più comunemente applicati per valutare l'attività antiossidante di composti fenolici.

Questo metodo si basa sulla reazione di antiossidanti con il radicale stabile, in una soluzione alcolica (Gerhäuser et al., 2003), in particolare il 2,2-difenil-1-picrilidrazile, reagisce con i composti antiossidanti presenti negli estratti di alga (AH), riducendosi secondo questa reazione: $DPPH + AH \rightarrow DPPH-H + A$.

Le sostanze antiossidanti degli estratti di macroalghe reagiscono con il DPPH, il quale presenta un'intensa colorazione violetta che assorbe la radiazione a 515 nm. Secondo protocollo si determina la concentrazione iniziale del DPPH e la concentrazione risultante una volta che si è aggiunto il potenziale antiossidante, di modo che una diminuzione dell'assorbanza della radiazione si traduca in una diminuzione della concentrazione di DPPH dovuta alla cessione di elettroni dalla specie antiossidante (Rivero Rosales & Betancort Rodriguez, 2006).

Il test DPPH è molto popolare per studi su antiossidanti naturali. Il database PubMed mostra che questo radicale è stato impiegato in più di 890 lavori dal 1969 (Tirzitis & Bartosz, 2010).

1.3.3 Analisi cromatografica

Studi su fenoli nelle piante, tradizionalmente si sono sempre concentrati sul contenuto polifenolico totale dell'estratto, sebbene sia ben noto che questo gruppo consista di un insieme complesso di differenti tipi di composti fenolici individuali (Koivikko et al., 2007), quindi il contenuto totale di polifenoli misurato secondo la procedura di Folin-Ciocalteu, non fornisce un quadro completo sulla quantità e qualità dei costituenti fenolici dell'estratto (López et al., 2011). È interessante perciò integrare l'analisi del contenuto fenolico totale tramite il metodo Folin-Ciocalteu, con l'analisi cromatografica ad alta prestazione (HPLC; High Performance Liquid Chromatography o High pressure Liquid Chromatography), per una caratterizzazione più precisa dei componenti di natura fenolica dell'estratto che si vuole studiare.

L'HPLC si inquadra tra le cromatografie di eluizione, per cui un liquido (fase mobile) circola in intimo contatto con un solido o un altro liquido inscindibile (fase stazionaria). Nella cromatografia liquida ad alta prestazione, il campione che deve essere analizzato, viene introdotto all'interno della fase mobile, dove è solubile e viene trasportato attraverso la colonna cromatografica, contenente la fase stazionaria, grazie al flusso continuo della fase mobile ad alta pressione. La fase stazionaria, è formata da particelle di piccolo diametro, pertanto la superficie di interazione all'interno della colonna è grande. Questo processo cinetico è conosciuto con il nome di eluizione (Hernández Pérez, 2005).

Ognuna delle sostanze introdotte nel sistema, eluirà con un tempo differente, cioè, saranno separate. Il tempo che un composto tarda nell'essere eluito dalla colonna,

si denomina tempo di ritenzione (T_r), e viene considerato una proprietà identificativa caratteristica di un composto in una determinata fase mobile e stazionaria.

Il frammento o grado di separazione è determinato soprattutto dall'opzione di fase mobile che presenta il macchinario, e il criterio alla base di questo metodo di analisi dei composti di una miscela d'interesse, è quello di conseguire la formula (fase mobile/fase stazionaria) che permetta di separare bene i componenti nel minor tempo possibile.

Gli analiti separati, si presentano come una serie di picchi all'interno di un cromatogramma, che permettono di identificare il composto in base al tempo di ritenzione nel quale si formano.

L'analisi HPLC permette di effettuare una valutazione qualitativa e quantitativa della componente polifenolica della miscela d'interesse.

Si distinguono: HPLC in fase diretta, che presenta una fase stazionaria polare e una fase mobile di bassa polarità, e HPLC in fase inversa (RS-HPLC; Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography), con fase stazionaria di polarità bassa e fase mobile di polarità alta.

Diversi metodi sono stati sviluppati per la separazione e la determinazione dei composti fenolici utilizzando la RP-HPLC con rilevatore a serie di diodi (DAD; Diode Array Detector), che consente la rilevazione dell'assorbanza di varie specie chimiche a diverse lunghezze d'onda, simultaneamente (Proestos & Komaitis, 2013). Inoltre, secondo López et al. (2011) questo metodo risulta essere rapido, sensibile e accurato nell'individuare e quantificare 14 polifenoli noti, nell'estratto ottenuto dall'alga bruna *Stypocaulon scoparium*. Anche Truus et al. (2004) riuscirono tramite RP-HPLC, ad identificare alcuni composti polifenolici in *F. vesiculosus*.

2. Obiettivi

É evidente un interesse via via crescente verso i prodotti di origine naturale e negli ultimi decenni il mare è sempre più esplorato come fonte di risorse bioattive, in particolare le alghe risultano ricche di composti antiossidanti che nell'ambito biomedico hanno destato curiosità e interesse per l'applicazione contro lo stress ossidativo e i conseguenti danni e per la prevenzione di varie patologie.

Tra i composti antiossidanti più discussi negli ultimi decenni fino all'attualità, emergono i polifenoli, di cui le alghe brune risultano particolarmente ricche, oltre che mostrare, in studi a confronto con *Clorophyceae* e *Rhodophyceae*, una maggiore attività antiossidante.

In base a quanto finora detto, risulta interessante sviluppare metodi efficaci, economici e rapidi per l'estrazione e la quantificazione di questi composti di natura fenolica, di crescente interesse per il loro potenziale antiossidante, dalle macroalghe marine.

Questo lavoro di tesi è stato svolto presso l'Istituto di ricerca IMEDMAR (Istituto Universitario de Investigación en Medio Ambiente y Ciencia Marina), all'interno dell'Universidad Católica de Valencia, Facultad de Veterinaria y Ciencias experimentales, e si inquadra nell'ambito del progetto: "Estudio del efecto de antioxidantes y antiinflamatorios de origen marino en la prevención del daño por isquemia-reperfusión".

In particolare lo studio presente è incentrato sull'analisi del contenuto polifenolico e della capacità antiradicalica in estratti dell'alga bruna *Fucus vesiculosus*, pertanto si stabiliscono come obiettivi principali l'ottenimento di estratti polifenolici da quest'alga, individuando le condizioni di tempo e temperatura che favoriscono una maggiore concentrazione di polifenoli totali, e una più alta attività antiossidante.

Si pianifica inoltre l'identificazione e la quantificazione di 14 composti di natura fenolica negli estratti ottenuti, con l'utilizzo del sistema RS-HPLC.

In secondo luogo verrà analizzata la correlazione tra l'attività antiossidante rilevata negli estratti, e il contenuto polifenolico totale e individuale, separatamente.

3 Materiali e metodi

3.1 Campioni

Lo studio è stato condotto su campioni in polvere, liofilizzati e triturati, dell'alga bruna *Fucus vesiculosus*, commissionata da Fragon Ibérica SAU, GMP (good manufacturing product).

3.2 Reattivi e macchinari

I reattivi e i macchinari utilizzati in laboratorio per condurre la parte sperimentale di questo studio, sono indicati, rispettivamente, in Tab 3, e Tab 4, con le marche e i modelli di appartenenza.

Tab 3. Tipo e marca dei prodotti reattivi utilizzati ai fini durante questo studio.

Tipo di Reattivo	Nome	Marca
<i>Composti fenolici Standard per HPLC</i>	Phloroglucinol	Acros organic
	Chlorogenic acid	HWI ANALYTIK GMBH
	Myrcetin	Fluka
	Vanilic Acid	Fluka analytical
	Catechin	Fluka
	Gallic acid	Merck
	Rutin	Sigma aldrich
	Epicatechin	Sigma
	p-Coumaric acid	Sigma
	Caffeic acid	Sigma
	Gentisic acid	Sigma
	Protocatechuic acid	Aldrich
	Trans-ferulic acid	Aldrich
Acido quercetinico	Sigma aldrich	
<i>Reattivo per il metodo di Folin-Ciocalteu</i>	Reattivo di Folin Ciocalteu	Pancreac
<i>Reattivo per il metodo DPPH</i>	2,2-Difenil-1-picrilidranzile	Aldrich
<i>Solventi utilizzati in laboratorio</i>	Metanolo (CH ₃ OH) (UHPLC – supergradiente)	Applichem, pancreac, itw companies
	Etanolo 96% (CH ₂ H ₅ OH), extra puro	Sharlau
<i>Solvente impiegato per l'estrazione</i>	Acetone (CH ₃ COCH ₃) Pro analisi	Merck, KGoA, Germany
<i>Acqua distillata e bidistillata</i>	Type II e Type I, ultra pura, acqua per reagenti	Wasserlab, sistema di purificazione dell'acqua. ULTRAMATIC

Tab 4. Tipo, marca e modello dei macchinari utilizzati durante questo studio.

Tipo di macchinario	Marca	Modello
Bilancia analitica	Ohaus	Pioneer PA 214 C
Incubatore orbitale con agitatore	SARTORIUS	Certomat IS
Centrifuga	Thermo Scientific	Heraeus Megafuge 16
Spettrofotometro	Macherey Nagel	NANOCOLOR VIS
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	HITACHI	LaChrom Elite L-2480.

3.3 Ottenimento degli estratti

Con l'obiettivo di massimizzare la concentrazione di polifenoli totali al momento dell'estrazione, è stato studiato l'effetto delle variabili di estrazione che influenzano maggiormente la resa di polifenoli totali: solvente, tempo e temperatura di estrazione. Dal momento che, come già menzionato nel paragrafo dedicato alle metodologie applicate, il solvente ideale per l'estrazione di polifenoli da *F.vesiculosus*, risulta secondo diversi autori, costituito dalla miscela acetone:acqua (70:30), in questo studio si considerano le variabili tempo e temperatura. Concretamente sono state applicate tre temperature: 25, 45 e 60° C, e tre tempi 1, 2 e 4 ore, combinando le diverse opzioni possibili di estrazione (Tab 5).

Tab 5. Campioni studiati per l'ottimizzazione dell'estrazione di polifenoli da *F.vesiculosus*.

Campione	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	1h	25°C
2	1h	45°C
3	1h	60°C
4	2h	25°C
5	2h	45°C
6	2h	60°C
7	4h	25°C
8	4h	45°C
9	4h	60°C

Si pesano 5 g del campione servendosi della bilancia analitica e si introducono in contenitori del tipo Erlenmeyer. In seguito si aggiungono 30 mL di soluzione estraente (acetone-acqua 70:30), e si completa l'estrazione collocando gli Erlenmeyer contenenti l'alga in soluzione con acetone-acqua, nell'incubatore orbitale, applicando differenti condizioni di temperatura e tempo di estrazione.

Una volta terminata l'estrazione si trasferiscono gli estratti in tubi di plastica (50 mL), per la centrifugazione a 2000 xg (relative centrifugal force) per un tempo pari a 20 minuti, dopo di che gli estratti vengono filtrati, per eliminare i solidi in sospensione, mediante filtri da siringa (Syringe Filters: 0,45 µm, e 25 mm di diametro) e trasferiti in altri tubi in plastica da 15 mL; dopo filtrazione gli estratti si conservano a 4°C di temperatura in attesa di essere utilizzati per la determinazione totale dei polifenoli, della valutazione della capacità antiossidante e per l'analisi con HPLC.

3.4 Determinazione del contenuto totale di polifenoli

Con l'obiettivo di determinare il contenuto totale di polifenoli in estratti dell'alga *Fucus vesiculosus*, si applica il metodo di Folin-Ciocalteu (1927). Questo saggio colorimetrico consiste nell'utilizzo del reattivo Folin-Ciocalteu, composto da tungstato di sodio e molibdato di sodio, che ha la capacità di reagire con composti fenolici in un mezzo alcalino (il controllo del pH è ad opera di una soluzione tampone a base di carbonato di sodio), provocando un cambio di colorazione proporzionale alla concentrazione dei composti fenolici nel campione.

La determinazione dei polifenoli totali si esprime in equivalenti di floroglucino, a questo proposito si realizza una curva di calibrazione con uno standard di floroglucino (Fig. 6) e dopo la reazione con Folin-Ciocalteu, si misura l'assorbanza degli estratti tramite spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda pari a 765 nm.

3.4.1 Preparazione della curva di calibrazione

Si utilizzano 100 mg dello standard (Floroglucino) per 100 mL di acqua bidistillata, a partire da questa soluzione (soluzione madre) si ottengono diverse concentrazioni (range 900, 700, 500, 100, 80, 50 ppm) in soluzione con metanolo.

Si misura l'assorbanza allo spettrofotometro, delle concentrazioni degli standard preparati, con i valori ottenuti si può costruire la curva di calibrazione (Figura 6) e ricavare l'equazione della retta che utilizzeremo per la quantificazione dei polifenoli totali dell'estratto analizzato.

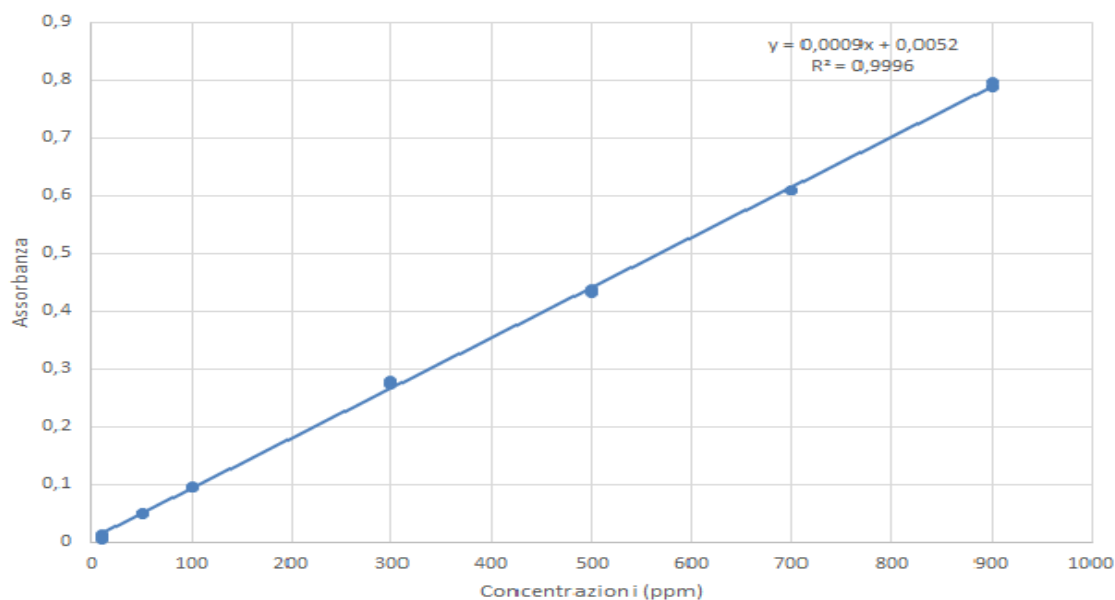


Figura 6. Curva di calibrazione del Floroglucinol.

3.4.2 Procedimento dettagliato per l'analisi quantitativa dei polifenoli totali

Una quantità pari a 0,10 mL da ciascun estratto viene inserita in provette da 10 mL, insieme a 8,4 mL di acqua distillata, in seguito si aggiungono 0,50 mL del reattivo Folin-Ciocalteau, si tappano le provette con l'utilizzo di parafilm, si agitano per tre volte e si lasciano per 5 minuti in oscurità; dopo di che si rimuove il parafilm e si aggiunge alla soluzione 1 mL di carbonato di sodio (20%), si richiude la provetta con parafilm, e il tutto viene lasciato in oscurità per un'ora.

Trascorso questo tempo, si misura l'assorbanza dei campioni allo spettrofotometro; i valori ottenuti vengono utilizzati insieme all'equazione della retta di calibrazione realizzata con lo standard, allo scopo di determinare le concentrazioni di fenoli totali, in floroglucinol equivalenti (Phloroglucinol Equivalent, PE).

3.5 Determinazione dell'attività antiossidante

Con il fine di studiare l'attività antiossidante si applica il metodo DPPH (Blois, 1958). Per prima cosa si procede alla preparazione del reattivo: vengono pesati 0,039 mg di DPPH, che saranno diluiti in 100 mL di metanolo.

Si prelevano 0,5 mL da ogni campione e si distribuiscono in provette da 25 mL, nella provetta del controllo e in quella del Bianco non si inserirà l'estratto. In seguito si aggiungono 5 mL della soluzione con DPPH in tutte le provette, eccetto il Bianco che conterrà solo metanolo, poi si chiudono tutti con il parafilm, si agitano e si conservano in oscurità per 20 minuti.

Dopo l'attesa si misura l'assorbanza nello spettrofotometro, a 515 nm; tutti i campioni si inseriscono nello spettrofotometro, solo dopo aver misurato l'assorbanza del controllo, che rappresenta l'assorbanza del DPPH.

Per determinare la capacità antiossidante di ciascun campione, si applica la seguente equazione (Figura 7) (Blois, 1958):

$$A.A.(%) = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

Figura 7. Formula per misurare l'attività antiossidante di un campione, essendo "A.A." l'attività antiossidante in percentuale, "Abs. control", l'assorbanza del controllo, "Abs muestra", l'assorbanza del campione.

3.6 Analisi HPLC

L'analisi cromatografica è stata effettuata tramite RS-HPLC, la strumentazione è costituita da un sistema di depressione, una bomba binaria, colonna termostato con compartimento e rilevatore di diodi (DAD, Diodes Array Detector), collegato con un software, Chemstation.

Si è utilizzato un sistema di gradiente che implica 2 fasi mobili: eluente A, costituito da acqua bidistillata e acido formico all'1%, e eluente B, composto esclusivamente da metanolo; si tratta di cromatografia ad alta prestazione in fase inversa dove la fase mobile (eluente A e B), sono composti polari, mentre la fase stazionaria è apolare.

La portata del flusso prevista era di 1,0 mL/min, e il volume di iniezione nel sistema HPLC, pari a 60 µL dagli estratti crudi dell'alga. Il sistema opera a 27 °C. Le condizioni di eluizione applicate, furono: 0-5 minuti (min), 20% B isocratico; 5-30 min, gradiente lineare da 20% a 60% B; 30-35 min, 60% B isocratico; 35-40 min, gradiente lineare da 60%-20% e per finire purgare e ricondizionare la colonna.

Gli standard in questo studio (14 composti fenolici, indicati nella Tab 3), furono analizzati a diverse lunghezze d'onda: a 270 nm (floroglucinolo, acido gallico, acido vanillico, epicatechina, acido protocatecuico, catechina, rutina), a 324 nm (acido gentisico, acido clorogenico, acido cafeico, acido cumarico, acido ferulico) e a 373 nm (miricetina e acido quercetinico). La separazione si realizzò con una colonna di fase inversa Pursuit XR_s C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) e una precolonna Pursuit XR_s C18 colonna (10 mm x 4,6 mm, 5µm) (Varian, Barcelona).

3.6.1 Preparazione curva di calibrazione

Le curve di calibrazione dei polifenoli standard commerciali, si ricavano secondo il seguente procedimento: viene preparata inizialmente una soluzione madre per ogni standard, di 500 ppm (mg/L), dopo di che, si ottengono sette concentrazioni, a partire dalla madre, dentro un range prestabilito (0,05-50 mg/L).

È stato utilizzato lo stesso range di concentrazioni per tutti gli standard, a eccezione della catechina, per la quale è stata preparata una soluzione madre 5 mg/50mL, dalla quale sono state ottenute sette concentrazioni comprese tra 0,5 e 50 mg/L, lavori precedenti hanno fornito il range di concentrazioni ideali per costruire le curve di calibrazione dei composti scelti. Si iniettarono le concentrazioni di ciascuno standard nel sistema HPLC, per reagire con la fase mobile e stazionaria.

Le rette di calibrazione si realizzano valutando i tempi di uscita dei picchi per i singoli composti (Tempi di ritenzione), contro le concentrazioni prestabilite.

In Tab 6 sono indicate le equazioni delle rette di calibrazione per ogni standard, si osserva che nessuno degli R^2 è inferiore a 0,999.

Tab 6. Equazioni delle rette di calibrazione ottenute per i 14 standard, con relativo R².

Polifenolo standard	Equazione di regressione	R ²
<i>floroglucinolo</i>	$y = 10632x - 4593,2$	0,9995
<i>acido clorogenico</i>	$y = 47459x - 6524,4$	0,9990
<i>Acido cumarico</i>	$y = 549879x - 164635$	0,9992
<i>miricetina</i>	$y = 138933x - 103878$	0,9990
<i>acido caffeico</i>	$y = 486827x - 70964$	0,9992
<i>acido gallico</i>	$y = 21053x - 1697,4$	0,9994
<i>acido protocatecuico</i>	$y = 267069x + 175621$	0,9992
<i>acido quercetinico</i>	$y = 692563x - 220941$	0,9991
<i>acido gentisico</i>	$y = 205322x + 265898$	0,9992
<i>catechina</i>	$y = 34553x - 13217$	0,9991
<i>epicatechina</i>	$y = 33049x + 3782,4$	0,9991
<i>acido ferulico</i>	$y = 407199x - 82177$	0,9996
<i>rutina</i>	$y = 85351x + 9957,4$	0,9992
<i>acido vanillico</i>	$y = 232325x - 10020$	0,9995

3.6.2 Procedimento per l'identificazione dei singoli polifenoli

L'identificazione dei singoli composti fenolici negli estratti, è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione separati all'interno dei campioni con quelli degli standard, nei diversi spettri di assorbimento.

Le quantità individuali vengono calcolate utilizzando l'equazione della curva di calibrazione del profilo fenolico identificato, dove il dato di concentrazione corrisponderà all'area del picco del composto da quantificare nell'estratto in analisi.

3.7 Analisi statistica

Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato ed i risultati sono riportati come media \pm d.s. (deviazione standard). I dati sperimentali sono stati elaborati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) a due fattori ortogonali fissi (tempo e temperatura) con tre livelli ciascuno; i confronti tra le medie sono stati effettuati con il test post-hoc SNK (Student–Newman–Keuls), con $\alpha=0,05$, utilizzando il foglio di calcolo Excel.

4 Risultati e discussione

4.1 Determinazione dei polifenoli totali

Come si può osservare dai dati in Tab 7 e dal grafico in Figura 8, tutte le condizioni di temperatura e tempo applicate permettono l'estrazione dei composti fenolici totali, in un range di concentrazioni comprese tra 13,32 (2h, 25°C) e 17,79 (2h, 60°C) mg floroglucinolo equivalenti (PE) su grammi di alga secca.

Tab 7. Contenuto totale medio \pm deviazione standard, dei polifenoli estratti nelle condizioni di temperatura e tempo applicate; i dati son espressi in mg PE/g; N=3.

<i>Tempo (h)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>		
	<i>25°C</i>	<i>45°C</i>	<i>60°C</i>
<i>1h</i>	13,61 \pm 0,535	13,62 \pm 0,844	15,79 \pm 0,677
<i>2h</i>	13,32 \pm 0,188	13,67 \pm 0,511	17,79 \pm 0,094
<i>4h</i>	13,65 \pm 0,371	13,59 \pm 0,176	14,72 \pm 0,353

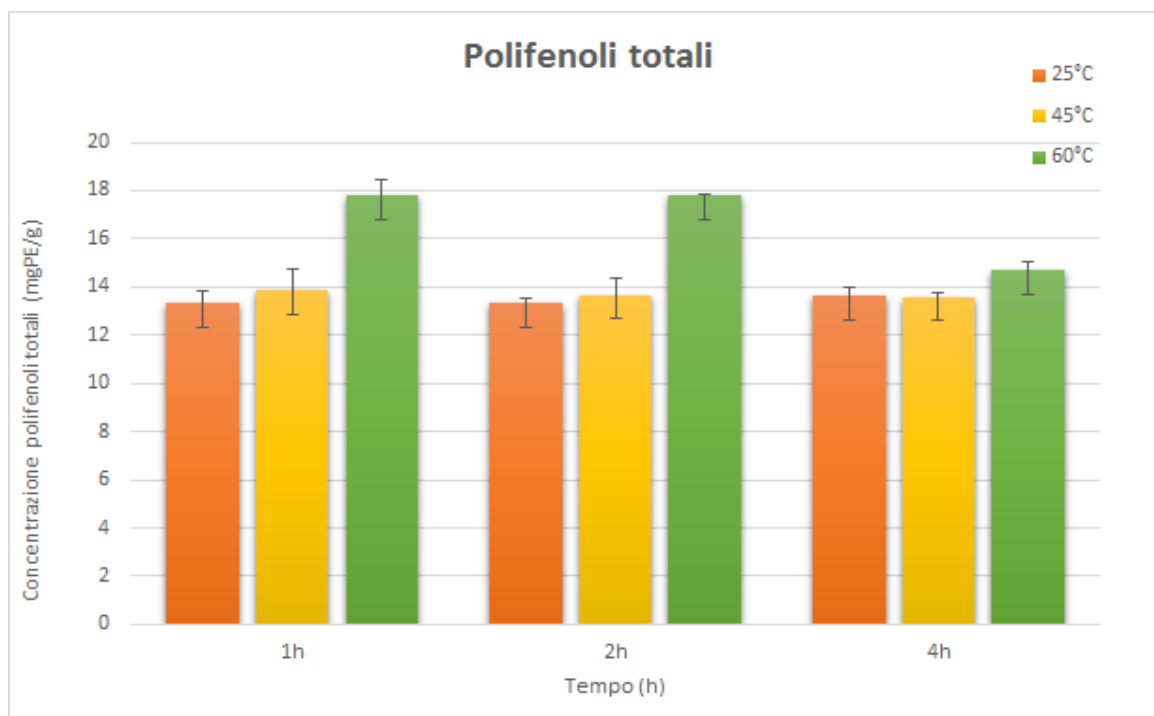


Figura 8. Variazione delle concentrazioni (Valori medi \pm d.s.) dei polifenoli totali (mg PE/g) nelle condizioni di estrazione applicate: Tempo (h); Temperatura (°C)); N=3.

Tab 8. Risultati dell' ANOVA condotta, sul contenuto di polifenoli totali, con disegno a due fattori ortogonali, fissi:
T=temperatura(°C) e t=tempo(h).

Source	SS	DF	MS	F	P
T	23,746	2	11,873	14,84	0
t	4,115	2	2,058	2,57	0,104
T x t	4,218	4	1,054	1,32	0,301
RES	14,399	18	0,800		
TOT	46,477	26			

Da un esame del grafico (Figura 8), risulta evidente una variazione nel contenuto polifenolico totale, determinata specialmente dal variare della temperatura; questa osservazione è confermata dai risultati Anova (Tab 8) che riportano un effetto significativo per il fattore temperatura sulla resa degli estratti, e non per il tempo. Le differenze fra le medie alle diverse temperature sono state analizzate tramite il test post-hoc SNK, con $\alpha=0,05$. Gli estratti ottenuti a 60°C rivelano le concentrazioni di polifenoli più alte (vedi Tab 8) e si distanziano significativamente dai valori medi calcolati per gli estratti a 45°C e 25°C che invece non differiscono.

In accordo con Hwang & Thi, (2014) dopo il solvente, la temperatura ricopre un ruolo fondamentale nell'ottimizzazione dell'estrazione di composti di natura fenolica. Anche questi autori riportano infatti concentrazioni maggiori di polifenoli a temperature elevate (100°C). In uno studio dedicato all'ottimizzazione del metodo di estrazione di antiossidanti dalle foglie del maté, le condizioni di tempo e di temperatura più efficaci per l'estrazione dei polifenoli totali sono risultate, rispettivamente: 30 minuti e 60°C (Hartwig et al., 2013) e Zhang et al., (2014) riportano come condizioni ottimali per l'estrazione di polifenoli da estratti di *Areca catechu L.* (della famiglia delle Palmaceae), etanolo al 70%, 70°C di temperatura per 120 minuti di tempo.

In base a tutte queste osservazioni, si suggerisce per analisi posteriori su *Fucus vesiculosus*, di effettuare estrazioni in tempi brevi e a temperature alte in modo da ottenere estratti polifenolici più concentrati, nel minore tempo; sarebbe interessante oltretutto, testare tempi anche inferiori a un'ora, per vedere se è possibile ottenere sempre una buona quantità di composti polifenolici in tempi rapidi, e effettuare estrazioni anche a temperature superiori ai 60 °C.

A confronto con alcuni studi su alghe verdi rosse e brune, le concentrazioni di polifenoli rilevate negli estratti risultano abbastanza alte, ad esempio Echavarria et

al., (2009) analizzando il contenuto polifenolico totale di alghe brune, verdi e rosse: *Sargassum Cymosum*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.*, e *Laurencia sp.* e *Caulerpa mexicana* riportano le concentrazioni più alte, pari 0,469-0,822 mg acido gallico equivalenti (Gallic Acid Equivalent, GAE) su g di alga, per le alghe appartenenti al genere *Sargassum*, mentre per le altre: tra 0,207 (*C. mexicana*) e 0,258-0,302 mgGAE/g (rispettivamente *Laurencia sp.*, *Dictyota sp.*). Risultati ottenuti da diversi autori (Novoa et al., 2001; Wong & Cheung, 2001; Jimenez Escrig et al., 2001) sulla composizione totale polifenolica di alcune alghe rosse, rientrano in un range di polifenoli totali compreso tra 5 e 8,44 mg di sostanza fenolica su grammi di alga. Horincar et al., (2011), ottengono estratti da due alghe verdi e un'alga rossa (rispettivamente: *Cladophora sp.*, *Enteromorpha sp.* e *Ceramium*), il contenuto polifenolico valutato sempre con il metodo di Folin-Ciocalteu, oscilla entro un range compreso tra 0,281 e 2,4 mg GAE/g. Girija et al., (2013) in uno studio sull'attività antiossidante di *Turbinaria ornata*, riportano come concentrazione maggiore di polifenoli totali rilevata: 1,13 mg GAE/g. Bambang et al., (2013) studiarono gli estratti, ottenuti con diversi solventi, di alghe brune appartenenti al genere *Sargassum*, riferendo come concentrazione maggiore quella rilevata in estratti etanoliche di *Sargassum filipendula*, pari a: 12,87 mg GAE/g.

Thierney et al. 2013, riportano concentrazioni di polifenoli totali maggiori rispetto a quelle rilevate in questo studio (37,03-39,04 mg PE/g di alga) in estratti di *Fucus spiralis*, ottenuti attraverso la tecnica di estrazione accelerata con solvente (ASE, Accelerated Solvent Extraction). In uno studio comparativo su 6 alghe brune e 2 alghe rosse (Wang et al., 2009), estratti acetoniche di *Fucus vesiculosus* presentano il contenuto totale polifenolico più elevato: 242 mg PE/g. Sempre Wang et al., in uno studio del 2012, provando diversi solventi per estratti di *F.vesiculosus*, hanno osservato che l'estrazione con acetone al 70% permetteva la resa maggiore di composti polifenolici totali, pari a 390 mg PE/g. Risultati simili furono ottenuti da Jormalainen et al., (2005) e Zhang et al., (2006); questi valori risultano molto più elevati rispetto a quelli riportati in questo studio.

In confronti di questo tipo bisogna tener conto del fatto che l'abbondanza dei polifenoli è strettamente legata ai metodi di estrazione (Craigie, 2011), quindi ogni tecnica applicata avrà un effetto diverso sulla resa.

4.2 Determinazione dell'attività antiossidante

In Tab 9 sono riportate le percentuali medie di attività antiossidante per gli estratti analizzati. Tutti i campioni mostrano un'elevata capacità antiossidante compresa tra un minimo di 79,39% (2h, 60°C) e un massimo pari a 89,38% (1h, 25°C).

Tab 9. Valore medio \pm deviazione standard, delle percentuali di attività antiossidante nelle condizioni di temperatura e tempo applicate; N=3.

Tempo(h)	Temperatura (°C)		
	25°C	45°C	60°C
1h	89,38% \pm 0,575	87,52% \pm 0,195	86,62% \pm 0,195
2h	87,37% \pm 0,128	83,67% \pm 0,242	79,39% \pm 0,680
4h	82,93% \pm 0,1403	84,51% \pm 0,174	80,52% \pm 0,175

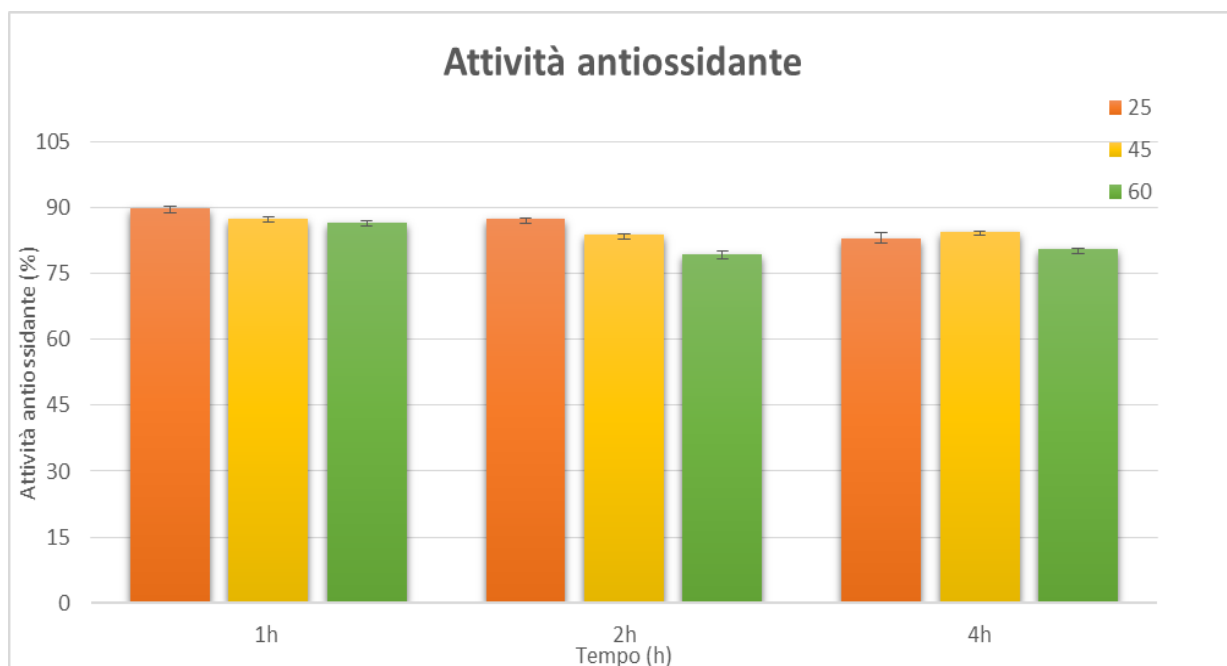


Figura 9. Variazione dell'attività antiossidante (%), (valori medi \pm d.s.) nelle condizioni di estrazioni applicate: Tempo (h); Temperatura (°C); N=3.

Tab 10. Risultati dell' ANOVA condotta, sulle percentuali di attività antiossidante, con disegno a due fattori ortogonali fissi: T=temperatura(°C) e t=tempo(h).

Source	SS	DF	MS	F	P
T	95,238	2	47,619	146,06	0
t	146,694	2	73,347	224,97	0
T x t	40,164	4	10,041	30,8	0
RES	5,869	18	0,326		
TOT	287,965	26			

L'analisi Anova a due vie (Tab 10) mette in evidenza differenze significative attribuite all'interazione dei due fattori considerati, rivelando come l'attività antiossidante vari al cambiare della temperatura a seconda del tempo e viceversa. I risultati del test post hoc SNK ($\alpha=0,05$), indicano differenze significative tra tutti i campioni estratti in diverse condizioni di tempo e temperatura.

Come si può dedurre da un semplice esame del grafico in Figura 9, la differenza maggiore è quella tra estratti a 1h-25°C e estratti a 2h-60°C; inoltre l'istogramma realizzato mette in evidenza un pattern di variazione dell'attività antiossidante che si mantiene per campioni sottoposti a tempi di estrazione di una e due ore, con percentuali in calo in corrispondenza dell'aumento della temperatura. Passando a quattro ore di estrazione, la resa migliore si osserva alla temperatura intermedia (45°C), un chiaro effetto dell'interazione del fattore tempo con il fattore temperatura sui campioni analizzati.

Queste osservazioni suggeriscono che la valutazione della capacità antiossidante può dare ottimi risultati su estratti ottenibili in tempi brevi a temperatura ambiente, condizioni semplici da applicare e meno dispersive soprattutto in termini di tempo.

I risultati raccolti, si trovano in accordo con quanto documentato da Wang et al., (2009, 2012) dove estratti di *Fucus vesiculosus* ottenuti utilizzando come solvente acetone al 70%, presentano una percentuale di attività antiradicalica elevata, compresa tra 90,8-93,9%, risultando, tra le alghe a confronto, gli estratti con maggiore attività antiossidante. Suresh et al., (2012) che applicarono il test del DPPH ad estratti ottenuti con diversi solventi dall'alga bruna *Sargassum plagiophyllum*, osservarono che l'estratto acetone riportava i valori di attività antiradicalica più elevati.

Diversi studi su alghe brune hanno riportato percentuali di attività antiossidante superiori a 50% (Indu & Seeenevisan, 2013).

Indu & Seenivasan, (2013) hanno condotto uno studio sull'attività di alcune alghe verdi rosse e brune riportando valori più alti per queste ultime (79.1%). Horincar et al., (2011) ottengono misure di attività antiossidante in tre alghe verdi, comprese in un range tra 11,2 e 37,2%, dove gli estratti con attività maggiore sono quelli ottenuti con l'acetone come solvente; i risultati del DPPH riportati da Farasat et al., (2014) su estratti di alcune Ulvaceae, riferiscono valori compresi tra 10.60 e 28.43 %.

Estratti metanolici delle alghe brune *Turbinaria conoides*, *Padina tetrastomatica* e *Sargassum marginatum* mostrano un' attività antiossidante rispettivamente di: 17,35, 14,78, 11,00 % (Chandini et al., 2008). In un altro studio l'attività antiossidante rilevata in estratti di *Turbinaria ornata* oscilla tra un massimo di 74.66 a un minimo di 43 % (Girija et al., 2013).

Molti metodi vengono utilizzati per valutare l'attività antiossidante negli alimenti e nei vari complessi biologici (Janaszewska & Bartosz, 2002; Bauzaite et al., 2003; Rodriguez Jasso et al., 2014), differenti metodologie hanno un'influenza diversa sui risultati, questo complica un confronto tra dati di attività antiossidante provenienti da più lavori dove non sono impiegati gli stessi test; pertanto, in accordo con diversi autori (Schlesier et al., 2002; Moon & Shinamoto, 2009; Rodriguez Jasso et al., 2014), risulta conveniente, per un prossimo studio, basare le proprie conclusioni su dati forniti da almeno due test.

Inoltre in molti lavori il valore di attività antiossidante viene espresso come IC50 (concentrazione dell'estratto necessaria per inibire il 50% del DPPH) e per posteriori analisi sarebbe interessante, ricavare anche questo indice col fine di ampliare la gamma di possibili confronti per i nostri dati.

4.3 Attività antiossidante e polifenoli totali

Tramite un grafico a dispersione è stata valutata l'esistenza di una correlazione tra attività antiossidante e contenuto polifenolico totale degli estratti (Figura 10).

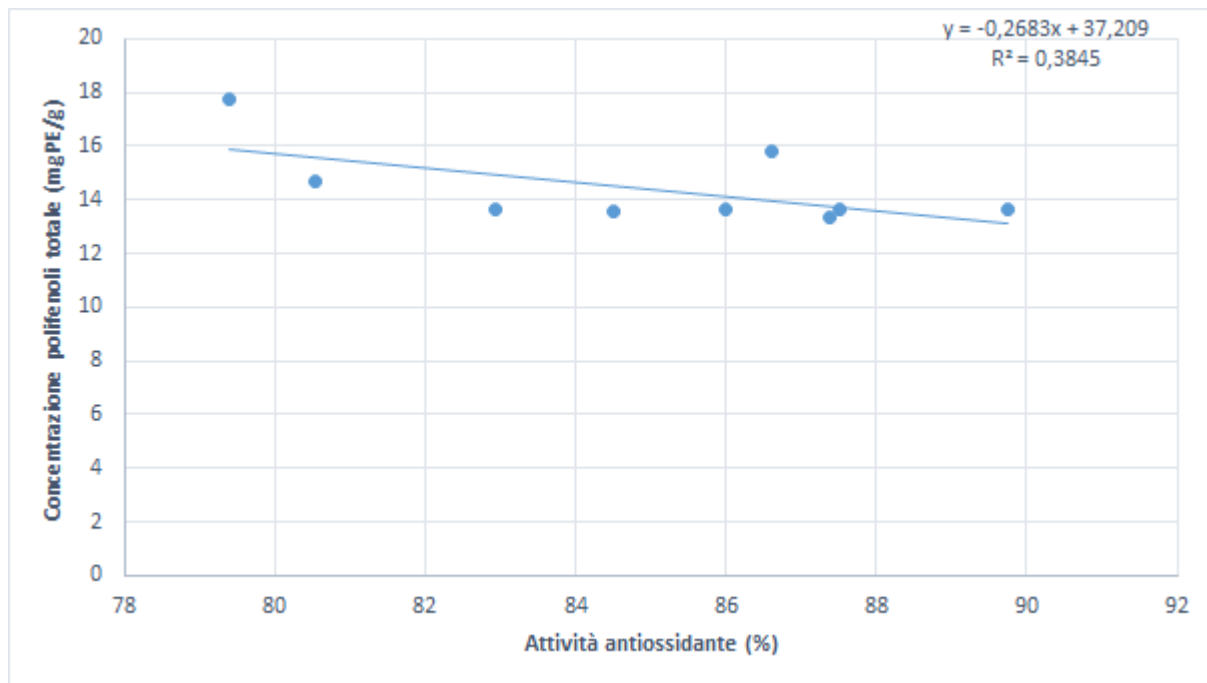


Figura 10. Correlazione tra l'attività antiossidante (%) e i polifenoli totali (mgPE/g)

Dal grafico si osserva l'assenza di correlazione tra le due variabili. Come già discusso precedentemente, i valori più alti di attività antiossidante si ottengono in condizioni di basse temperature e tempi brevi, mentre estratti sottoposti a una temperatura di 60°C mostrano il contenuto polifenolico maggiore.

Questi risultati sono coerenti con quanto documentato da altri autori, secondo cui l'attività antiossidante in estratti algali non sembra corrispondere al contenuto polifenolico totale rilevato (Ganesan et al., 2008; Patthamakanokporn et al. 2008; Rapisarda et al. 2008; Lim et al. 2002). Thierney et al., (2013) riportano una debole correlazione tra contenuto polifenolico in *Fucus spiralis*, e attività antiossidante (R^2 : 0,594), ed è spesso concordato che se il valore di R^2 calcolato da questa correlazione è basso, indica che composti non-fenolici presenti sono maggiormente responsabili dell'attività antiossidante degli estratti (Babbar et al., 2011; Patthamakanokporn et al., 2008).

Tuttavia, in contrasto con quanto dimostrato in questo studio, numerosi autori riportano una stretta relazione tra contenuto polifenolico totale e attività antiossidante in estratti di *Fucus vesiculosus* (Abdussalam, 1990; Jiménez Escrig et al., 2001; Keyrouz et al., 2011; O'sullivan et al., 2011; Lordan et al., 2013; Girija et al., 2013). Wang et al., (2009) documentano un'alta correlazione tra attività antiossidante e contenuto polifenolico totale negli estratti analizzati (tra cui *Fucus vesiculosus*), con un R^2 pari a 0,990.

Considerando i risultati controversi esistenti riguardo la relazione tra attività antiossidante e contenuto polifenolico in estratti di macroalghe marine, tra cui *Fucus vesiculosus* e vista la debole correlazione tra questi due parametri rilevata nel presente studio, si suppone che la capacità antiossidante in *Fucus vesiculosus* e più in generale nelle macroalghe marine, non possa essere dovuta esclusivamente al contenuto polifenolico. In studi effettuati in questo ambito, è stato riscontrato che l'attività antiossidante si manifesta in parti dell'alga caratterizzate da una composizione chimica varia, si ipotizza quindi un possibile effetto additivo e/o sinergico di tutti i composti (Yan et al., 1999). Zaragoza et al., (2008) suggeriscono che l'attività antiossidante di estratti di *Fucus vesiculosus* possa essere dovuta ad un'interazione tra diversi metaboliti secondari, come polifenoli e carotenoidi (fucoxantina).

Bisogna però tenere in considerazione, come riportato da altri autori (Velazquez & Cisneros Zevallos, 2009; López et al., 2011; Tierney et al., 2013), che la controversia esistente nel sostenere una correlazione tra attività antiossidante e polifenoli totali, in estratti algali, possa essere causata dal non tener conto dei differenti profili polifenolici del campione analizzato che potrebbero presentare un diverso potenziale antiossidante, il che richiederebbe uno studio più specifico del tipo e della quantità di ognuno di questi. Inoltre occorre tenere in considerazione eventuali interazioni sinergiche o antagonistiche tra composti fenolici e non, che possono influenzare la bioattività in analisi (Babbar et al., 2011). Come suggerito anche nel paragrafo precedente, un limite nell'interpretazione di questi risultati può essere rappresentato anche dal tener conto di un solo metodo per la valutazione dell'attività antiossidante.

4.4 Analisi HPLC

Il metodo di cromatografia liquida in fase inversa (RS-HPLC), in cui viene utilizzata come fase mobile una miscela di acqua/metanolo e acido formico all'1%, ha permesso di conseguire in tempi rapidi e con una buona risoluzione, la determinazione dei tempi di ritenzione caratteristici dei 14 polifenoli standard rilevati a diverse lunghezze d'onda (Tab 11).

Tab 11. Tempi di ritenzioni rilevati alle rispettive lunghezze d'onda, per i composti polifenolici standard analizzati

Composti	Tempo di ritenzione (min)	Lunghezza d'onda (λ)
<i>floroglucinolo</i>	4,020	270
<i>acido gallico</i>	5,224	270
<i>acido vanillico</i>	14,287	270
<i>epicatechina</i>	15,490	270
<i>acido protocatecuico</i>	18,499	270
<i>rutina</i>	19,202	270
<i>catechina</i>	12,660	270
<i>acido gentisico</i>	11,862	324
<i>acido clorogenico</i>	13,808	324
<i>acido caffeico</i>	14,638	324
<i>acido cumarico</i>	16,841	324
<i>acido ferulico</i>	17,420	324
<i>miricetina</i>	20,478	373
<i>acido quercetinico</i>	24,180	373

In Figura 11 osserviamo il cromatogramma ottenuto per ogni lunghezza d'onda, con i picchi corrispondenti ai tempi di ritenzioni dei polifenoli standard analizzati con HPLC.

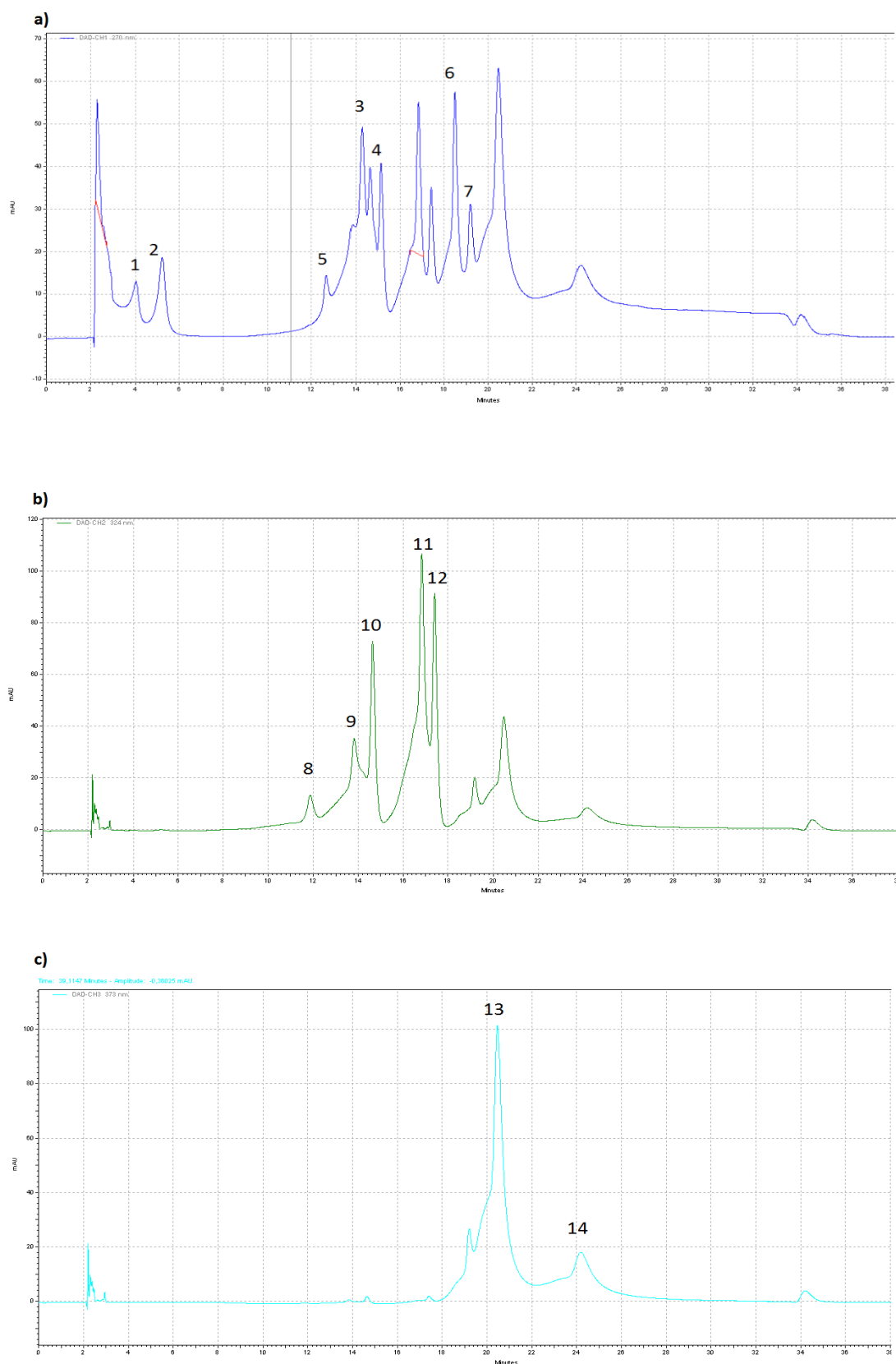


Figura 11. Analisi cromatografica dei polifenoli commerciali: (a) 270 nm: 1 = floroglucunolo, 2= acido gallico, 3= acido vanillico, 4= epicatechina, 5=catechina, 6= acido protocatecuico, 7=rutina. (b) 324 nm: 8= acido gentisico, 9= acido clorogenico, 10= acido caffeico, 11= acido cumarico, 12= acido ferulico. (c) 373 nm: 13 = miricetina e 14 = acido quercetinico.

Solo tre dei composti analizzati sono stati identificati in tutti gli estratti ottenuti in questo studio su *Fucus vesiculosus*: miricetina, acido ferulico e catechina (Figura 12).

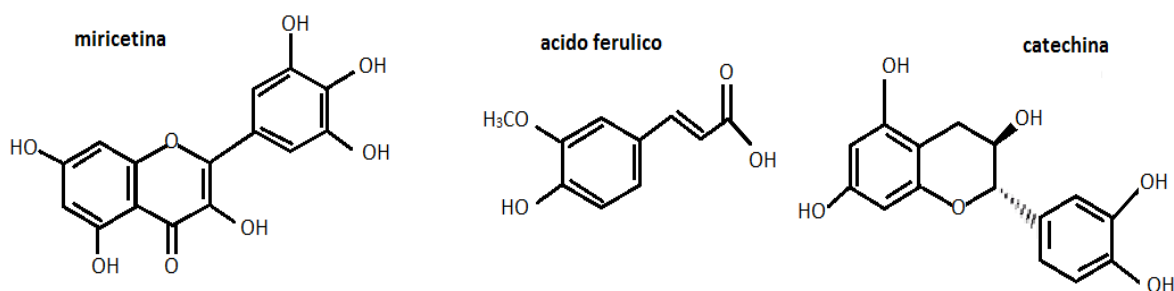


Figura 12. Struttura chimica dei composti fenolici identificati negli estratti (miricetina, acido ferulico, e catechina).

Vengono identificati anche i polifenoli rutina e epicatechina, che sono però quantificabili solo negli estratti ricavati ad un'ora. I dati ottenuti per questi due polifenoli sono stati considerati poco affidabili e quindi non analizzati.

In Tab 13, dove sono riportate le concentrazioni medie calcolate con le curve di calibrazione di miricetina, acido ferulico e catechina, vengono indicati per conoscenza anche i valori ottenuti per rutina ed epicatechina negli estratti dove sono state individuate.

Non è stato possibile identificare e quantificare il floroglucinolo, in quanto il suo tempo di ritenzione coincideva con quello dell'acetone, utilizzato come solvente di estrazione, il cui picco ha interferito nella corretta analisi cromatografica di questo fenolo. Gli estratti di *Fucus vesiculosus* ottenuti utilizzando come solvente acetone al 70%, da Koivikko et al., (2007) sono stati lasciati ad evaporare sotto cappa a temperatura ambiente, mentre Ghareib et al., (2010) hanno sottoposto ad evaporazione tramite Rotavapor, estratti acetonicici dell'alga bruna *Sargassum virgatum*, che dopo evaporazione sono stati diluiti in 20 μ L di metanolo prima di essere iniettati in HPLC.

Risulta quindi opportuno, per analisi future con questo metodo, su estratti di *Fucus vesiculosus* ottenuti con una miscela di acetone:acqua (70:30), lasciare evaporare il solvente, prima dell'analisi cromatografica, ad esempio tramite Rotavapor, in modo da evitare interferenze sull'identificazione dei composti fenolici.

Tab 13. Concentrazione media \pm deviazione standard, nelle condizioni di temperatura (T) e tempo (t) applicate; i dati sono espressi in mg/100g; N=3.

<i>t(h) – T(°C)</i>	<i>miricetina</i>	<i>acido ferulico</i>	<i>catechina</i>	<i>epicatechina</i>	<i>rutina</i>
1h-25°C	5,444 \pm 0,260	0,237 \pm 0,004	4,366 \pm 2,568	0,933 \pm 0,078	54,18 \pm 1,313
1h-45°C	5,280 \pm 0,157	0,245 \pm 0,006	2,499 \pm 0,245	0,431 \pm 0,034	345,14 \pm 12,668
1h-60°C	5,776 \pm 0,231	0,256 \pm 0,001	3,288 \pm 1,178	-	29,933 \pm 2,417
2h-25°C	5,652 \pm 0,015	0,252 \pm 0,007	3,300 \pm 0,055	-	-
2h-45°C	6,173 \pm 0,067	0,259 \pm 0,003	2,587 \pm 0,100	-	-
2h-60°C	6,609 \pm 0,402	0,253 \pm 0,003	2,285 \pm 0,069	-	-
4h-25°C	5,799 \pm 0,046	0,256 \pm 0,006	3,280 \pm 0,107	-	-
4h-45°C	6,025 \pm 0,062	0,248 \pm 0,004	1,411 \pm 1,370	-	-
4h-60°C	6,216 \pm 0,259	0,241 \pm 0,002	2,705 \pm 0,068	-	-

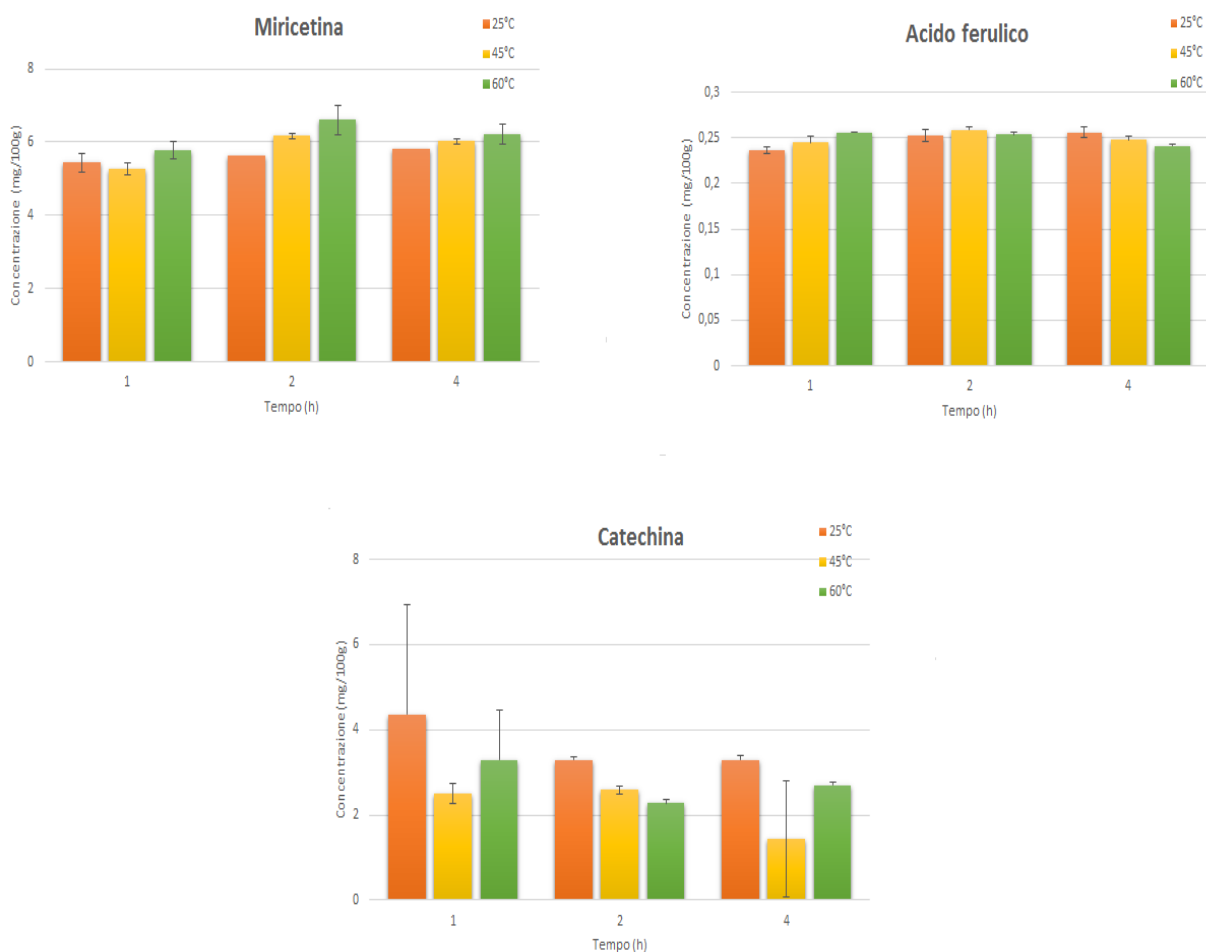


Figura 13. Variazione delle concentrazioni (valori medi \pm d.s.) dei singoli polifenoli (mg/100g), nelle condizioni di estrazione applicate: Tempo (h); Temperatura (°C); N=3.

Tab 14. Risultati dell' ANOVA condotta, sulle concentrazioni dei polifenoli individuali: a) miricetina; b) acido ferulico; c) catechina, con disegno a due fattori ortogonali, fissi: T=temperatura(°C) e t=tempo(h).

a)

Source	SS	DF	MS	F	P
T	6,851	2	3,426	3,760	0,043
t	0,419	2	0,210	0,230	0,797
T x t	2,013	4	0,503	0,550	0,700
RES	16,398	18	0,911		
TOT	25,682	26			

b)

Source	SS	DF	MS	F	P
T	0,002	2	0,001	1,510	0,247
t	0,002	2	0,001	1,520	0,245
T x t	0,001	4	0,000	0,320	0,861
RES	0,013	18	0,001		
TOT	0,018	26			

c)

Source	SS	DF	MS	F	P
T	10,678	2	5,339	6,76	0,007
t	4,833	2	2,417	3,06	0,072
T x t	4,316	4	1,079	1,37	0,285
RES	14,222	18	0,790		
TOT	34,049	26			

Esaminando i dati rappresentati in Figura 13, risulta evidente che le concentrazioni di ogni composto identificato, presentano un profilo individuale di variazione nelle differenti condizioni di estrazione applicate. A supporto di queste osservazioni, i risultati dell'Anova (Tab 14) e del test post-hoc SNK, mettono in evidenza un effetto diverso dei fattori (tempo e temperatura) sui polifenoli identificati: le concentrazioni di acido ferulico non variano significativamente tra gli estratti, si osserva quindi la possibilità di estrarre tale composto in tutte le condizioni di tempo e temperatura applicate senza che la resa cambi.

Per miricetina e catechina risulta invece significativo l'effetto determinato dalla temperatura, con concentrazioni significativamente maggiori a 60°C rispetto a 25°C per miricetina, e differenze non significative tra 25°C e 45°C e tra 45°C e 60°C; mentre per la catechina le concentrazioni rilevate a 25°C sono significativamente superiori sia a quelle corrispondenti a temperature di 45°C che di 60°C, non essendoci invece differenze tra 45°C e 60°C.

Questi risultati dimostrano che non tutti i composti di natura fenolica variano nella stessa maniera se sottoposti alle stesse condizioni di estrazione, supportando, in accordo con altri autori (Koivikko et al., 2007; López et al., 2011) l'utilità di una valutazione del contenuto polifenolico totale integrata con l'analisi dei singoli profili fenolici dell'estratto in esame.

López et al., (2011) saggiarono l'efficacia di quattro solventi diversi (etanolo, metanolo, metanolo:acqua, acqua) per l'estrazione di polifenoli da *Stypocaulon scoparium*; gli estratti etanolici mostrarono le concentrazioni di miricetina, acido ferulico e catechina più accostabili ai valori ottenuti in questi studio (rispettivamente: 2.076, 1.188 e 4.995 mg/100g).

Yoshie et al., (2002), hanno verificato la presenza di miricetina, in estratti di *Halimeda macroloba* e *Halimeda opuntia*, in quantità maggiori rispetto a quelle calcolate per i campioni qui analizzati (41,4 e 14,7 mg/100g, rispettivamente). Ghareib et al., (2010) identificarono acido ferulico, acido vanillico, cumarico e protocatecuico, in estratti metanolici di *Sargassum virgatum*, esaltando i primi due come i più abbondanti. In diversi studi è stata documentata la presenza di catechina e epicatechina in estratti di alghe rosse e brune (Yoshie et al., 2000, 2003; Santoso et al., 2002).

Secondo più autori il metodo RS-HPLC applicato in questo studio, si rivela rapido, sensibile e accurato per l'identificazione e la quantificazione di composti di natura fenolica in estratti algali (Ghareib et al., 2010; López et al., 2011; Zhongrui et al., 2012), mentre Koivikko et al, (2007) osservano che questa tecnica di analisi colorimetrica non consente una sufficiente separazione dei picchi di florotannini, e a confronto con la NP-HPLC (normal phase HPLC) risulta meno efficiente per l'analisi qualitativa e quantitativa di questi composti polifenolici.

4.5 Attività antiossidante e polifenoli individuali

Dalle osservazioni precedenti sono emersi differenti profili di variazione dei polifenoli individuali identificati in relazione alle diverse combinazioni di tempo e temperatura applicate; è risultato perciò interessante valutare anche la correlazione tra le concentrazioni dei singoli polifenoli e l'attività antiossidante dei campioni nelle condizioni di estrazioni applicate.

Dai grafici riportati in Figura 14 si osserva che mentre le concentrazioni di miricetina e acido ferulico mostrano un andamento inverso all'attività antiossidante, la catechina, seppure con un R^2 molto basso, sembra invece correlata positivamente.

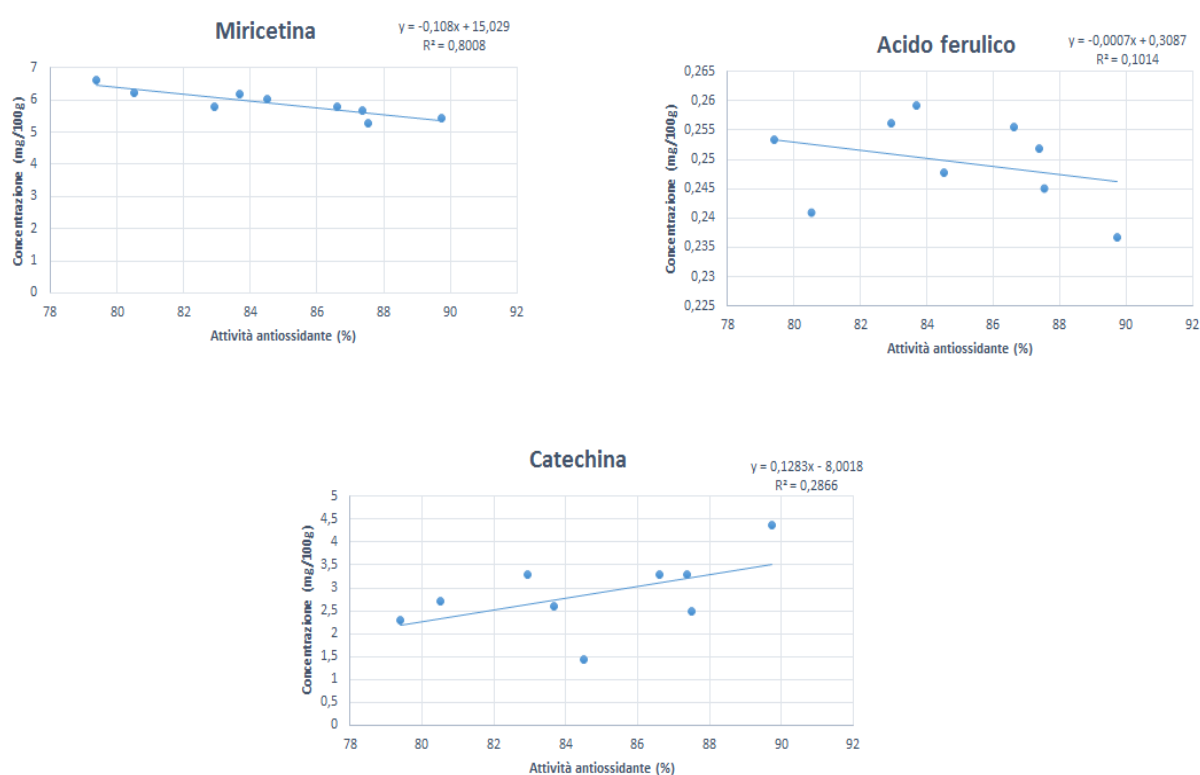


Figura 14. Correlazione tra le concentrazioni (mg/100g) dei singoli polifenoli (miricetina, acido ferulico e catechina) e l'attività antiossidante (%).

Diversi studi hanno dimostrato le proprietà farmacologiche della miricetina (Kian et al., 1997; Morel et al., 1998; Aherne & O'Brien, 1999) e in particolare Morel et al., (1998) hanno dimostrato un'elevata attività di inibizione della perossidazione lipidica in culture di epatociti di ratto ad opera di questo flavonoide. Dalla presente analisi

sulla correlazione con l'attività antiossidante, invece, la miricetina non sembrerebbe coinvolta nell'azione antiradicalica degli estratti.

Gli acidi fenolici, tra cui l'acido ferulico, identificati in estratti di *Vetiveria zizanioides*, da Prajna et al., (2013) hanno manifestato una correlazione molto alta con l'attività antiossidante (R^2 : 0.988), che in questa analisi non risulta, e nello stesso studio, questi composti fenolici mostrano un'importante attività antibatterica. Diversi autori hanno identificato l'acido ferulico in micro e macroalghe, associato ad attività antiradicalica (Linares et al., 2006; Garheib et al., 2010). Novoa et al., (2011) attribuiscono il potere antiossidante rilevato in estratti di *Halimeda incrassata* alla presenza di acidi fenolici, tra i quali l'acido ferulico.

Le catechine, identificate in vari tipi di frutta, nel té e nel vino, hanno dimostrato effetti biologici importanti come per esempio: attività anticancerogena, antiallergica e antiossidante (De Pascual Teresa et al., 2000; Kurinara et al., 2000) e Iacopini et al., (2008) esaltano l'elevato potere antiossidante *in vitro* dei composti fenolici: catechina, epicatechina e rutina.

Dal grafico che rappresenta la correlazione tra catechina e risultati del test DPPH (Figura 14), si osserva una corrispondenza tra percentuali maggiori di attività antiossidante e concentrazioni del polifenolo più alte. Inoltre la catechina presenta valori significativamente più elevati in campioni estratti a 1 ora di tempo e 25°C di temperatura (vedi Tab 13 e Figura 13), questo si trova in accordo con quanto osservato nello studio dell'attività antiossidante, dove valori significativamente superiori di attività si riscontrano in estratti a 25°C durante 1 ora (vedi Figura 9 e Tab 9), suggerendo che la catechina abbia un ruolo nel determinare l'elevato potere antiossidante riscontrato negli estratti di *Fucus vesiculosus* ottenuti in questo studio. Tuttavia la scarsa correlazione rilevata porta a considerare che l'attività antiossidante determinata negli estratti attraverso il saggio del DPPH, sia dovuta principalmente ad altri composti non identificati; inoltre, come già detto, sarebbe meglio effettuare l'analisi di correlazione con risultati provenienti da almeno due test di attività antiossidante.

In accordo con queste osservazioni Bröhan et al., (2011) analizzando tramite RP-HPLC-online TEAC il contenuto polifenolico di *Sorghum* rosso e bianco insieme all'attività antiossidante, riportano una debole correlazione tra questa e i flavonoidi identificati, tra cui catechina e epicatechina, evidenziando come maggiori

responsabili dell'alto potere antiossidante degli estratti di questo vegetale, alcuni composti non identificati corrispondenti a tempi di ritenzione superiori ai 60 minuti. Attualmente non sono disponibili in letteratura molti lavori in cui sia stata valutata l'attività antiossidante di polifenoli individuali, o dove si analizzi la correlazione tra i singoli composti fenolici identificati e l'attività antiossidante in campioni algali; non è facile perciò confrontare i nostri risultati. Sarebbe utile integrare studi di questo tipo con test dell'attività antiossidante sui singoli polifenoli che vengono individuati negli estratti analizzati.

I risultati ottenuti dall'analisi cromatografica sono importanti in quanto ci permettono di confermare la presenza di alcuni polifenoli comuni in vegetali terrestri, come la catechina, miricetina e acido ferulico, la cui capacità antiossidante *in vitro* è già stata dimostrata in altri organismi, all'interno degli estratti di *Fucus vesiculosus* presi in esame. L'analisi effettuata della correlazione tra questi composti identificati e l'attività antiossidante riscontrata nei campioni analizzati, porta a ipotizzare che, malgrado la risaputa capacità antiossidante di acidi fenolici e flavonoidi, questi non siano i principali antiossidanti presenti in *Fucus vesiculosus*.

5 Conclusioni

-Alla luce dei risultati ottenuti, si può affermare che tutte le condizioni di tempo e temperatura applicate consentano un'efficiente estrazione dei composti fenolici. Le concentrazioni dei polifenoli totali misurate negli estratti analizzati sono più basse di quelle riportate in altri lavori su *Fucus vesiculosus*, ma risultano comunque abbastanza alte rispetto ai dati documentati per altre specie algali (verdi, rosse e brune).

Quantità di polifenoli totali significativamente maggiori rispetto alle altre, si osservano in estratti ottenuti a temperature di 60°C. Si conferma come solvente ottimale per estrazioni di questo tipo, la miscela acetone-acqua (70:30), in accordo con quanto già affermato da parte di altri autori.

-Tutti gli estratti di *Fucus vesiculosus*, analizzati in questo studio tramite il test DPPH, riportano percentuali molto alte di attività antiradicalica, seppure si distingue un'attività significativamente superiore in estratti ottenuti a 1 ora e 25°C, essendo queste le condizioni più convenienti da applicare. Questi risultati forniscono ottimi presupposti per prossimi studi su *Fucus vesiculosus*, in merito alle proprietà antiossidanti presenti nei suoi estratti, anche se si sottolinea la necessità di basare le proprie conclusioni sui risultati di attività antiossidante provenienti almeno da due metodi.

In disaccordo con diversi studi che mettono in luce una stretta corrispondenza tra attività antiossidante e contenuto fenolico totale, dall'analisi effettuata sulla correlazione tra questi due parametri, non emerge alcuna correlazione, suggerendo che l'attività antiossidante rilevata sia dovuta ad altri metaboliti, o all'interazione di alcuni polifenoli con altri composti.

-Attraverso l'analisi cromatografica è stato possibile identificare cinque polifenoli, di cui tre: miricetina, acido ferulico e catechina, sono individuabili in tutti gli estratti, mentre due: rutina e epicatechina, si identificano solo in estratti ottenuti in 1 ora di tempo.

Per posteriori analisi si propone, in accordo con quanto suggerito in altri lavori, di lasciare evaporare gli estratti prima di iniettarli nel sistema HPLC, vista l'interferenza causata dal solvente utilizzato (acetone-acqua) nell'identificazione del Floroglucinolo.

Dall'analisi dei singoli polifenoli identificati in tutti gli estratti (miricetina, acido ferulico e catechina) si osserva che esiste per ognuno un profilo di variazione diverso nelle condizioni di temperatura e tempo applicate. In base a questo si conferma la necessità di associare ai risultati ottenuti dal test di Folin-Ciocalteu, quelli provenienti da un'analisi cromatografica dei composti fenolici individuali.

-è stata valutata la correlazione tra attività antiossidante e i singoli polifenoli identificati, riferendo una minima correlazione (R^2 : 0,2866), tra percentuali fornite dal test DPPH e concentrazioni di catechina nei diversi estratti, al contrario non è stata riscontrata una correlazione dell'attività antiossidante con miricetina e acido ferulico.

Le alghe rappresentano una fonte di interessanti composti bioattivi di importanza alimentare e farmacologica, in particolare i risultati di questo esperimento mostrano le potenzialità antiossidanti dell'alga bruna *Fucus vesiculosus* e rivelano la presenza di alcuni composti antiossidanti noti, come la catechina, all'interno dei suoi campioni analizzati. Ulteriori studi sono necessari per caratterizzare i componenti polifenolici di quest'alga, e poter capirne il coinvolgimento nell'attività antiradicalica dei suoi estratti.

Dal momento che l'attività antiossidante non sembra correlata con i polifenoli, ne deriva che altri metaboliti di natura non fenolica, presenti negli estratti, ne siano i principali responsabili, portando a rivolgere l'attenzione verso una più ampia gamma di composti, come possono essere i polisaccaridi solfatati, già al centro di diversi studi, o i carotenoidi, oppure altri metaboliti che aspettano solo di essere scoperti.

Tutte queste osservazioni forniscono i presupposti per il proseguimento di un'analisi più approfondita dell'attività antiossidante in estratti di *Fucus vesiculosus* e dei composti che ne sono responsabili, con l'obiettivo di una futura applicabilità in casi di ischemia e riperfusione, come previsto dal progetto in cui si inserisce questo lavoro di tesi.

6 Bibliografia

Abdussalam S, 1990. Drugs from Seaweeds. *Med. Hypoth.*; vol. 32, pp. 33-35.

Alvarez Miranda M, Rodriguez-Gonzalez A, Ptero G, Lacal JC, 2003. Characterization of the mechanism of action of ES-285, a novel antitumor drug from *Mactomeris polynyma*. *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, abstract C17.

Alviano DS & Alviano CS, 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.*; vol. 10, pp. 106-121.

Amin I & Mukhrizah F, 2006. Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *J. Sci. Food Agric.*; vol. 86, pp. 778-784.

Ananthi S, Raghavendran HRB, Sunil AG, Gayathri V, Ramakrishnan G, Vasanthi HR, 2010. *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (marine brown alga). *Food Chem. Toxicol.*; vol. 48, n. 1, pp. 187-192.

Antonisamy MJ & Raj EDS, 2011. UV–VIS and HPLC studies on *Amphiroa anceps* (Lamarck) Decaisne. *Arabian J. Chem.*; DOI:10.1016/j.arabjc.2011.09.005.

Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT, 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res. Int.*, vol. 44, pp. 391-396.

Baccelloni S, 2008. Recupero di antiossidanti naturali dai sottoprodotti di trasformazione dell'industria agroalimentare: noccioli di oliva (*Olea europaea* L.) gusci e perisperma di nocciole (*Corylus avellana* L.). Tesi di dottorato, dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, università degli studi della Tuscia.

Bambang BS, Kumalaningsih S, Susinggih W, Hardoko. 2013. Polyphenol Content and Antioxidant Activities of Crude Extract from Brown Algae by Various Solvents *J. Life Sci. Biomed.* 3(6):439-443.

Bate Smith EC & Swain T, 1962. Flavonoid compounds; Comparative biochemistry, pp. 755-809. Mason HS & Florkin AM (Ed.) *Comparative biochemistry*. Academic Press, New York.

Batista González AE, Charles MB, Mancini-Filho J, Vidal-Novoa A, Charles M, 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Rev. Cubana Plant Med.*; vol. 14, n.2, pp. 1-17.

Bauzaite R, Venscutonis PR, Gruzdiene D, Tirzite D, Tirzitis G, 2003. Radical scavenging and antioxidant activity of various plants grown in Lithuania; *Food Technology and Quality Evaluation*, pp. 183–193. Dris R, Sharma A (Ed.). Science Publishers, Inc. Enfield, USA.

Berge JP, Debiton E, Dumay J, Durand P and Barthomeuf C, 2002. *In vitro* anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. J. Agric. Food Chem.; vol. 50, n. 21, pp. 6227-6232.

Bhakuni S & Rawat S, 2005. Bioactive marine natural products. Anamaya Publishers. New Delhi, India. ISBN: 1-4020-3484-9.

Bergmann W & Feeney R, 1951. Contribution to the study of marine sponge—The nucleosides of sponges. J. Org. Chem; vol. 16, pp. 981-987.

Blois MS, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature; vol. 181, pp. 1199-1200.

Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR, 2007. Marine natural products. Nat. Prod. Rep.; vol. 24, pp. 31-86.

Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR, 2011. Marine natural products. Nat. Prod. Rep.; vol. 28, pp. 196–268.

Bodey GP, Freireich EJ, Monto RW, Hewlett JS, 1969. Cytosine arabinoside (NSC-63878) therapy for acute leukemia in adults. Cancer Chemotherapy Rep.; vol. 53, pp. 59–66.

Bhadury P & Wright PC, 2004. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. Planta; vol. 219, pp. 561–578.

Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mello JC, 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. Molecules; vol.18, pp. 6852-6865.

Branen AL, 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyl anisole and butylatedhydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc., vol.52, pp. 59-63.

Bröhan M, JerkoviVc, Wilmotte R, S. Collin, 2011. Catechins and Derived Procyanidins in Red and White Sorghum: Their Contributions to Antioxidant Activity. J. Inst. Brew.; vol. 117, n. 4, pp. 600–607.

Budhiyanti SA, Raharjo S, Marseno DV, Lelana IYB, 2012. Antioxidant activity of Brown algae *Sargassum spp.* extract from the coastline of Java Island. Am. J. of Agric. and Bio. Sc.; vol. 7, n. 3, pp. 337-346.

Butler MS, 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. J. Nat. Prod.; vol. 67, pp. 12.

Burritt D, Rkindale J, Hurd CL, 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. Planta; vol. 215, n. 5, pp. 829-838.

Burtin P, 2003. Nutritional value of seaweeds. Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.; vol. 2, n. 4, pp. 498-503.

Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falcao VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E, **2007**. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol.*; vol. 146, pp. 60–78.

Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P, **2011**. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*; volu. 16, pp. 251-280.

Cavalier Smith T, **1992**. Origins of secondary metabolism. *Ciba Found Symp*; vol. 171, pp. 64-80.

Cavia Saiz M, **2010**. Características antioxidantes y efecto sobre biomarcadores de estrés oxidativo del zumo de pometlo desamargado por tecnología enzimática y tratamiento con resinas de intercambio. Tesi di dottorato, dipartimento di biotecnologia e scienza degli alimenti, area di biochimica e biologia molecolare, università di Burgos.

Chakraborty K & Paulraj R, **2010**. Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata Delile*. *Food.Chem.*; vol.122, pp. 31–41.

Cérantola S, Breton F, Gall EA, Deslandes E, **2006**. Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Bot. Mar.*; vol. 49, n. 4, pp. 347-351.

Chandini SK, Ganesan P, Bhaskar N, **2008**. In vitro antioxidant activities of three selected Brown seaweeds of India. *Food Chem.*; vol.107, pp. 707-713.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y, **2007**. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. *Separ. and Purific. Technol.*; vol. 55, pp. 217-225.

Conde Piñeiro E, **2009**. Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Tesi di dottorato, dipartimento di ingegneria chimica, facoltà di scienze di Ourense, università di Vigo.

Cork, SJ, & Krockenberger AK, **1991**. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on Eucalyptus leaves. *J. of chem. ecol.*, vol.17, n. 1, pp. 123-134.

Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, Oliveira RM, Sabry DA, Câmara RBG, Nobre LTDB, Costa MSSP, Almeida-Lima J, Farias EHC, Leite EL, Rocha HAO, **2010**. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacotherapy*; vol., 64, pp. 21–28.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM, **1997**. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat Prod.*; vol. 60, pp. 52-60.

Cragg GM & Newman DJ, **2005**. Plants as source of anticancer agents. *J. Ethnopharm.*; vol. 100, pp. 72-79.

- Craige JS, 2011.** Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. J. Appl. Phycol.; vol. 23, pp. 371-393.
- Crisante F, 2008.** Preparazione di antiossidanti a struttura catecolica e di prodotti di interesse biologico di ossifunzionalizzazione benzilica da sostanze fenoliche naturali con sistemi biomimetici (IBX) ed enzimatici (laccasi/HBT). Tesi di dottorato, dipartimento di agrobiologia e agrochimica, Università della Tuscia di Viterbo.
- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG, 2002.** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. J. Immunol. Methods; vol. 265, pp. 49-72.
- Cuvelier ME, Richard H, Berset C, 1992.** Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. Biosci. Biotech. Biochem.; vol. 56, n. 2; pp. 324-325.
- De Almeida CLF, Falcao HS, Lima GRM, Montenegro CA, Lira NS, Athayde-Filho PF, Rodrigues LC, De souza MFV, Barbosa-Filho JM, Batista LM, 2011.** Bioactivities from marine algae of the Genus *Gracilaria*. Int. J. Mol. Sci., vol.12, n.7, pp. 4550-4573.
- De Pascual Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, 2000.** Quantitative analysis of flavan-3ols in Spanish foodstuffs and beverages. J. Agric. Food Chem.; vol. 48, pp. 5331-5337.
- Dewick PM, 2002.** Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd ed.; John Wiley and Son: West Sussex, UK; pp. 520.
- Dias DA, Urban S, Roessner U, 2012.** A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. Metabolites; vol. 2, pp. 303-336.
- Diaz Rubio ME, Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F, 2009.** Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. Internat. J. of Food Sc. and Nutr.; vol. 60, pp. 23-34.
- Echavarria B, Franco A, Martinez A, 2009.** Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. Vitae, Rev. la Fac. Química Farm.; vol.16, pp. 126-131.
- Farasat M, Khavari-Nejadl RA; Bagher Nabavi SM; Namjooyan F, 2013.** Antioxidant properties of some filamentous green algae (*Chaetomorpha* Genus). Braz. arch. biol. Technol.; vol.56, n. 6, pp. 921-927.
- Farasat M, Khavari-Nejad RA, Bagher Nabavi SM, Namjooyan F, 2014.** Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. Iran J. Pharm. Res.; vol. 13, n. 1, pp. 163-170.
- Faulkner DJ, 1995.** Marine Natural products. Nat. Prod. Rep.; vol. 11, pp. 223-269.

Ferreres F, Lopes G, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Sousa C, Mouga T, Valentão V, 2012. Phlorotannin Extracts from Fucales Characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to Hyaluronidase Inhibitory Capacity and Antioxidant Properties. *Mar. Drugs*; vol. 10, n. 12, pp. 2766-2781.

Folin O & Ciocalteu V, 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*; vol. 73, pp. 627-650.

Folin O and Denis W, 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*; vol. 12, pp. 239-243.

Forslund H, 2012 Herbivory, phenotypic variation, and reproductive barriers in fucoids. Tesi di dottorato, dipartimento di botanica, università di Stoccolma.

Freile Pelegrín Y, 2001. Algas en la “botica”. *Avance y Prespectiva*; vol. 20, pp. 283-292.

Freile Pelegrin Y & Robledo D, 2014. Bioactive Phenolic Compounds from Algae; Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources, 1st ed, cap. 6, pp. 113-129. J Blanca Hernández-Ledesma & Miguel Herrero (Ed.). John Wiley & Sons, ISBN: 978-1-118-41284-8.

Ganesan P, Kumar CS, Bhaskar N, 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Biores. Technol.*; vol. 99, pp. 2717–2723.

Garateix A, Salceda E, Menéndez R, Regalado EL, López O, García T, Morales RA, Laguna A, Thomas OP, Soto E, 2011. Antinociception produced by *Thalassia testudinum* extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. *Mol Pain.*; vol. 24, n. 7, pp. 1-15.

Gerhäuser C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J, Liu GY, Sitthimonchai S, Frank N, 2003. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.*; vol. 523, pp. 163–172.

Gerola FM, 1997. *Biologia vegetale sistematica filogenetica*. 3° ed. UTET. Torino.

Ghareib HR, 2010. Effect of methanol extract of *Sargassum virgatum* AG (MERT.) – A marine brown macroalga on seed germination and seedling growth of some agricultural crops. *Thalassas*; vol. 26, n. 1, pp. 13-21.

Giordano A, 2007. Nuove molecole bioattive da organismi marini: isolamento, caratterizzazione e chimica farmacologica. Tesi di dottorato, facoltà di Farmacia, Università degli studi di Napoli.

Girija K, Hemalatha A, Saranya C, Parthiban C, Anantharaman P, 2013. Extraction and isolation of phlorotannins from brown seaweed *Turbinaria ornata*(Turner) J.Agardh and its antioxidant activity. *Int. J. Bioassays*; vol. 2, n. 9, pp. 1185-1189.

Gopal R, Vijayakumaran M, Venkatesan R, Kathioli S, 2008. Marine organisms in Indian medicine and their future prospects. *Nat. Prod. Rad.*; vol. 7, n. 2, pp. 139-145.

Graham LE & Wilcox LW, 2000. *Algae*. Prentice-Hall (ed.), p.340. Upper Saddle River, NJ.

Guiry MD & Dhonncha NE, 2001. AlgaeBase. World Wide Web electronic publication www.algaebase.org (December 10, 2001).

Guiry MD & Guiry GM, 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on (22/12/2014).

Gumul D, Ziobro R, Zięba T, Rój E, 2011. The influence of addition of defeated blackcurrant seeds on pro-health constituents and texture of cereal extrudates. *J. Food Qual.*; vol. 34, pp. 395-402.

Gupta S & Abu Ghannam N, 2011. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innov. Food Sc. Emerg. Technol.*; vol. 12, pp. 600-609.

Halliwell B & Gutteridge JMC, 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Met. in Enzymol.*; vol. 186, pp. 1-85.

Halliwell B, 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nut. Rev.*; vol. 70(5), pp. 257-265.

Ham YM, Baik JS, Hyun JW and Lee NH, 2007. Isolation of a new phlorotannin, fucodiphlorethol G, from a brown alga *Ecklonia cava*. *Bull. Korean Chem. Soc.*; vol. 28, n. 9, pp. 1595-1597.

Harborne JB & Simmonds NW, 1964. The natural distribution of the phenolic aglycones; *Biochemistry of Phenolic Compounds*, pp. 77–127, Harborne J (Ed.), Academic Press, New York.

Hartwig VG, Schmalko ME, Alzamora Stella M, Brumovsky LA, 2013. Optimization of the extraction of antioxidants and caffeine from maté (*Ilex paraguariensis*) leaves by response surface methodology. *Int. J. of Food Stud.*; vol. 2, pp. 69–80.

Harvey A, 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug. Discov. Toda*; vol. 5, pp. 294-300.

Hassan SM & Ghareib HR, 2009. Bioactivity of *Ulva lactuca* L. acetone extract on germination and growth of lettuce and tomato plants. *Afr. J. of Biotechnol.*, vol. 8, n.16, pp. 3832-3838.

Henriquez R, Faircloth G, Cuevas C, 2005. Ecteinascidin 743 (ET-743™; Yondelis™), aplidin, and kahalalide F; Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ (eds) Anticancer agents from natural products; pp. 215–240. Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ (Ed.). Taylor and Francis, Boca Raton.

Hernández Pérez JM, 2005. Cromatografía líquida de alta eficacia. Ed. Cont. Lab. Clin.; vol. 8, pp. 49-62.

Hirose M, Hagiwara A, Hasui T, Inoue K, Ito N, 1986. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. *Cancer Lett.*; vol. 30, n. 2, pp. 169-74.

Horincar VB, Parfene P, Bahrim G, 2011. Evaluation of bioactive compounds in extracts obtained from three Romanian marine algae species. *Rom. Biotechnol. Lett.*; vol. 16, pp. 1-8.

Huang HL & Wang BG, 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. *J. Agric.*; vol. 52, num. 16, pp. 4993-4997.

Hwang SW, Jang JM, Lim SS, 2012. Isolation of Fucosterol from *Pelvetia siliquosa* by High-speed Countercurrent Chromatography. The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science, 2012. *Fish. Aquat. Sc.*; vol. 15, n. 3, pp. 191-195.

Hwang ES & Thi ND, 2014. Compound contents and radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Prev. Nutr. Food Sci.*; vol. 19, n.1, pp. 40-48.

Iacopini P, Baldi B, Storchi P, Sebastiani L, 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. of Food Comp. and Anal.*; vol. 21. pp. 589–598.

Indu H & Seenivasan R, 2013. *In vitro* antioxidant activity of selected seaweeds from southeast coast of India. *Int. J. Of Pharm. Sc.*; vol. 5, n. 2, pp. 474-484.

Janaszewska A & Bartosz G, 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*; vol. 62, pp. 231–236.

Jang Kyoung H, Lee-Bong H, Choi-Byoung W, Lee-Hyi S, Shin-Jong H, 2005. Chromenes from the brown alga *Sargassum siliquastrum*. *J. Nat. Prod.*; vol. 68, n. 5, pp. 716-723.

Jimenez Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Pulido R, Saura-Calixto F, 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sc. Food Agric.*; vol. 81, pp. 530-534.

Jimenez Escrig A, Gomez-ordoñez E, Rupérez P, 2011. Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *J. of Appl.of Phycol.*; vol. 24, pp. 1123-1132.

Jormalainen V, Honkanen T, Vesakoski O, Koivikko R, **2005**. Polar extracts of the brown alga *Fucus vesiculosus* (L.) reduce assimilation efficiency but do not deter the herbivorous isopod *Idotea baltica* (Pallas). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*; vol. 317, n. 143–157.

Kandaswamy Veena C, Josephine A, Preetha SP, Varalakshmi P, **2007**. Beneficial role of sulfated polysaccharides from edible seaweed *Fucus vesiculosus* in experimental hyperoxaluria. *Food Chem.*; vol. 100, n. 4, pp. 1552-1559.

Kang KA, Park Y, Hwang HJ, Kim SH, Lee JG and Shin HC, **2003**. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch. Pharm. Res.*; vol. 26, n. 4, pp. 286-293.

Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Lee Y, Kim SY, Kim HS, Joo HG, Park JW, Ham YM, Lee NH and Hyun JW, **2005**. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *Febs Lett.*; vol. 579, n. 28, pp. 6295-6304.

Kelman D, Kromkowski Posner E, McDermid KJ, Tabandera NK, Wright PR., and Wright AD, **2012**. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Mar. Drugs.*; vol. 10, n. 2, pp. 403–416.

Keyrouz R, Abasq ML, Le Bourvellec C, Blanc N, Audibert L, Argall E, Hauchard D, **2011**. Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chem.*; vol. 126, pp. 831-836.

Kijjoa A, Sawangwong P, **2004**. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Mar. Drugs*; vol. 2, n. 2, pp. 73-82.

Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H, **2011**. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod.*; vol. 74, pp. 1539–1555.

Kloareg B & Quatrano RS, **1988**. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*; vol. 26, pp. 259–315.

Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen, **2005**. V. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J. of Chem. Ecol.*; vol. 31, pp. 195-212.

Koivikko R, Loponen J, Pihlaja K, Jormalainen V, **2007**. High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Phlorotannins from the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*. *Phytochem. Anal.*; vol. 18, pp. 326-332.

Koivikko R, **2008**. Brown algal phlorotannins improving and applying Chemical Methods. Tesi di dottorato, dipartimento di chimica. Università di Turku.

Kuda T, Tsunekawa M, Goto H and Araki Y, **2005**. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J. Food Compos.*; vol. 18, n. 7, pp. 625-633.

- Kumar R & Zi-rong X, 2004.** Biomedical Compounds from Marine organisms. Review. Mar. Drugs; vol. 2, pp. 123-146.
- Kumar R; Gupta V, Kumari P, Reddy CRK, JHA B, 2011.** Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of Caulerpaceae seaweeds. J. of Food Compos. And An.; vol. 24, n. 2, pp. 270-278.
- Le Lann K, Jégou C, Stiger Pouvrea V, 2008.** Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. Phycol. Res.; vol. 56, pp. 238–245.
- Lee JH, Park JC, Choi JS, 1996.** The antioxidant activity of *Ecklonia stolonifera*. Arch. of Pharm. Res.; vol. 19, n. 3, pp. 223-227.
- Li YX, Wijesekara I, Li Y, Kim SK, 2011.** Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. Proc. Biochem.; vol. 46, pp. 2219–2224.
- Lim SN, Cheung P, Ooi V, Ang P, 2002.** Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. J. Agric. Food Chem.; vol. 50, n. 13, pp. 3862-3866.
- Linares AF, Loikkanen JJ, Männistö PT, Castañeda O, Novoa AV, 2003.** Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. Phytomed.; vol. 10, n. 2, pp. 270-278.
- Linares AF, Loikkanen J, Jorge MF, Soria RB, Novoa AV, 2004.** Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against *in vitro* and *in vivo* toxicity induced by methyl-mercury. Vet. Hum. Toxicol.; vol. 46, n. 1, pp. 1-5.
- Linares AF, 2005.** Actividad antioxidante y neuroprotectora *in vitro* del extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetrum* (Ceramilales, Rhodomelaceae). Tesi di dottorato, facoltà di biologia, Università della Habana.
- Linares AF, Tammela P, Loikkanen J, Novoa Av, Vuorela P, 2006.** Are cinnamic acids responsible for *in vitro* neuroprotection exerted by *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe aqueous extract? Planta Med.; vol. 72, n 191. DOI: 10.1055/s-2006-94999.
- López A, Rico M, Rivero A, Suárez de Tangil M, 2011.** The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chem.; vol. 125, pp. 1104-1109.
- Lordan S, Ross RP, Stanton C, 2011.** Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. A Review: J. Mar. drugs; vol. 9, pp. 1056-1100.

- Maestro Duran R & Borja Padilla R, 1993.** Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. 1993. Grasas y Aceites; vol. 44, n. 2, pp. 102-106.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L, 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. of Clin. Nutr.; vol. 79, n. 5, pp. 727-747.
- Manach C, Scalbert A, Remesy C, 2005.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Am. J. of Clin. Nutr.; vol. 81, n. 1, pp. 230S-242S.
- Maplestone RA, Stone MJ Williams, DH, 1992.** The evolutionary role of secondary metabolites - A review. Gene; vol.115, pp.151–157.
- Marinova EM & Yanishlieva NV, 1997.** Antioxidant activity of extracts from selected species of the family Laminaceae in sunflower oil. Food Chem.; vol. 58, pp. 245-248.
- McRae J, Yang Q, Crawford R, Palombo W, 2007.** Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. Environmentalist; vol. 27, pp. 165–174.
- Meenakshi S, Gnanambigai DM, Mozhi ST, Arumugam M, Balasubramanian, 2009.** Total flavanoid and *in vitro* antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. Glob. J Pharmacol.; vol. 3, n. 2, pp. 59–62.
- Mikail HG, 2011.** From Nutrition to Health: The Role of Natural Products – A Review, Phytochemicals – Bioactivities and Impact on Health, 2011. Prof. Iraj Rasooli (Ed.). ISBN: 978-953-307-424-5.
- Michalak A, 2006.** Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish J. of Environ. Stud.; vol. 15, n. 4, pp. 523-530
- Mishra BB & Tiwari VK, 2011.** Natural products: An evolving role in future drug discovery. Eur. J. Med. Chem.; vol.46, pp. 4769–4807.
- Moon JK, Shinamoto T, 2009.** Antioxidant assays for plant and food components. J. Agric. Food Chem.; vol. 57, pp. 1655–1666.
- Morales Aguilera RA, Fernández-Pérez MD, Menéndez-Soto del Valle R, 2010.** Antioxidantes de origen marino; Medio Ambiente y Desarrollo. Rev. elect. de la Agencia de Med. Amb.; anno 10, n. 19, ISSN-1683-8904.
- MyoungLae C, Hyi-Seung L, Il-jun K, Moo-Ho W, SangGuan Y, 2011.** Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*. Food Chem.; vol. 127, n.3, pp. 999-1006.
- Nagai T & Yukimoto T, 2003.** Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. Food Chem.; vol. 81, n.3, pp. 327-332.

Nahas R, Abatis D, Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Vagias C, Roussis V, **2007**. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Food Chem.*; vol. 102, pp. 577–581.

Nakai M, Kageyama N, Nakahara K., Miki W, **2006**. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringoldianum*. *Mar. Biotechnol.*; vol. 8, pp. 409–414.

Navnath MP, Dattatry KG, Tanaji G.J, **2013**. Oxidative stress and antioxidant indices of the marine red alga *Porphyra vietnamensis*. *ActaBot. Croat.*; vol. 72, n. 2, pp. 197–209.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM, **2000**. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*; vol.17; pp. 215–234.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM, **2003**. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.*; vol. 66, pp.1022–1037.

Niknam V & Ebrahimzadeh H, **2002**. Phenolic content in *Astragalus* species. *Pak. J. Bot.*; vol. 34. n. 3, pp- 283-289.

Novoa AV, Motidome M, Mancini-Filho J, Linares AF, Midori M, Brandao LM, Lapa AJ, **2001**. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelin) Howe. *Brazilian J. Pharm. Sci.*; vol. 37, n. 3, pp. 373-382.

Novoa AV, Linares AF, de Andrade-Wartha ER, Andrade-Wartha ER, de Oliveira e Silva AM, Pavan R, Lima A, Vuorela P, Mancini-Filho J, **2006**. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Bras. J. Of Pharm. Sci.*; vol. 42, n. 4, pp. 590-600.

Novoa AV, Silva de Andrade-Wartha ER, de Oliveira e Silva AM, Pavan R, Lima A, Linares AF, Batista AE, Mancini-Filho J, **2009**. Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. *Ars. Pharm.*, vol. 50, n. 1, pp. 24-31.

Novoa AV, Andrade-Wartha ERS, Linares AF, de O. e Silva AM, Genovese MI, B. González AE, Vuorela P, Costa A, Mancini-Filho J, **2010**. Antioxidant activity and possible bioactive components in hydrophilic and lipophilic fractions from the seaweed *Halimeda incrassata* J.V.Lamouroux, Halimedaceae. *Rev. bras. Farmacogn.*; vol. 21, n.1, pp. 53-57.

Novoa AV, Andrade-Wartha ERS, Linares AF, de O. e Silva AM, Genovese MI, González AEB, Vuorela P, Costa A, Mancini-Filho J, **2011**. Antioxidant activity and possible bioactive components in hydrophilic and lipophilic fractions from the seaweed *Halimeda incrassata*. *Rev. Bras. De Farmacol.*; vol. 21, n. 1, pp. 53-57.

Núñez R, Garateix A, Laguna A, Fernandez MD, Ortiz E, LLanio M, Valdés O, Rodríguez A, **2006**. Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications. *Pharmacol. Online*; vol.3, pp.111-119.

O'Sullivan AM, O'Callaghan YC, O'Grady MN, Queguineur B, Hanniffy D, Troy DJ, Kerry JP, O'Brien NM, **2011**. *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chem.*; vol. 126, pp. 1064-1070.

Paniagua Michel JJ, **2009**. *Bioteconología Marina*. AGT (Ed.), S.A. 1ªEd.; Cap.6 pp. 147-152; ISBN: 978-607-7551-16-4.

Parys S, Hehraus S, Krick A, Glombitza KW, Carmeli S, Gerhäuser C, König GM, **2010**. *In vitro* chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochem.*; vol. 71, pp. 221-229.

Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Prapaisri PS, **2008**. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J. Food Comp. Anal.*, vol. 21, pp. 241-248.

Phillipson JD, **2001**. *Phytochemistry and medicinal plants*. *Phytochemistry*; vol. 56, pp. 237-243.

Pelozo MIG, Cardoso MLC, Mello JCP, **2008**. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*; vol. 51, pp. 447–451.

Prajna J, Richa J, Dipjyoti C, **2013**. HPLC Quantification of Phenolic Acids from *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash and Its Antioxidant and Antimicrobial Activity; Hindawi Publishing Corporation. *J. Of Pharmac.*; vol. 2013, Article ID 270472, pp. 6.

Price RK, Welch RW, Lee-Manion AM, Bradbury I, Strain JJ, **2008**. Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. *Cereal Chem.*; vol. 85, n. 2, pp. 152-157.

Proestos C & Komaitis M, **2013**. Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation . *Foods*; vol. 2, pp. 90-99

Proksch P, Edrada RA, Ebel R, **2002**. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Technology*; vol. 59, pp.125-134.

Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A, **2012**. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.*; vol. 27, n.1, pp. 76-89.

Ragan MA & Glombitza KW, **1986**. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.*; vol. 4, pp. 129–241.

Rapisarda P, Lo Bianco M, Pannuzzo P, Timpanaro N, 2008. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes (*Citrus sinensis*). Postharvest bio. and technol.; vol. 49, pp. 348-354.

Rattaya S, Benjakul S, Prodpran T, 2014. Extraction, antioxidative, and antimicrobial activities of brown seaweed extracts, *Turbinaria ornata* and *Sargassum polycystum*, grown in Thailand. Int. Aq. Res.; DOI: 10.1007/s40071-014-0085-3.

Rivero Pérez MD, Muñiz P, González-Sanjosé ML, 2008. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. Food Chem. Toxicol.; vol. 46, n. 8, pp. 2815-2822.

Rivero Rosales A & Betancort Rodriguez JR, 2006. Evaluacion de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. Practica de laboratorio VI.3. Università de Las Palma, Gran Canarie.

Robards K, Prenzler PD, Tucke G, Swatsitang P, Glover W, 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem.; vol. 66, pp. 401–436.

Rocha de Souza MC, Teixeira Marques C, Guerra Dore CM, Roberto F, da Silva F, Oliveira Rocha HA, Leite EL, 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. J. Appl. Phycol.; vol. 19, n. 2, pp. 153-160.

Rodriguez Jasso RM, Mussatto SI, Pastrana L, Aguilar CN, Teixeira JA, 2014. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. Chem. Pap.; vol. 68, n. 2, pp. 203–209.

Rohr UP, Wulf MA, Stahn S, Steidl U, Haas R, Kronenwett R, 2002. Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. J. Virol. Meth.; vol. 106, pp. 81–88.

Rostagno M, Palma M, Barroso C, 2004. Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. Anal. Chim. Acta; vol. 522, n. 2, pp. 169–177.

Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V, 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. J. Appl. Phycol.; vol. 13, pp. 403-407.

Rupérez P, Ahrazem O, Lea JA, 2002. Potential Antioxidant Capacity of Sulfated polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed *Fucus vesiculosus*. J. Agric. FoodChem.; vol. 50, n. 4, pp. 840-845.

Rusaka G, Komesb D, Likića S, Horžićb D, Kovačb M, 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. Food Chem.; vol. 110, n. 4, pp. 852–858.

Saadatmand S, Khavarinejad K, Nejdattari T, Soltani S, **2011**. Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. in Caspian Sea Coast, Iran. Afr. J. of Biotechnol.; vol.10, n 39, pp. 7684-7689.

Sachindra NM, Airanthi MKWA, Hosokawa M, Miyashita K, **2010**. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. J.Food Sc. Technol.; vol. 47, n. 1, pp. 94–99.

Sadati N, Khanavi M, Mahrokh A, Nabavi SMB, Sohrabipour J and Hadjiakhoondi A, **2011**. Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of some Persian Gulf Marine Algae. J. of Med. Plants; vol. 10, n. 37, pp. 73-79.

Santoso J, Yoshie-StarkY, Suzuki T, **2004**. Antioxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. Fish. Sc., vol.70, n. 1, pp. 183-188.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI, **2006**. Methods in Biotechnology: Natural Product Isolation. Satyajit D (Ed.); Human Press Inc: Totowa, NJ, USA; p. 528.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R, **2002**. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Rad. Res.; vol. 36, pp. 177-187.

Senthilkumar P & Sudha S, **2011**. Antioxidant and Antibacterial Properties of Methanolic Extract of Green Seaweed *Chaetomorpha linum* From Gulf of Mannar: Southeast Coast of India. Jundishapur J. Of Microbiol.; vol. 5, n. 2 (s.n. 16), pp. 411-415.

Shahidi F & Zhong Y, **2005**. Antioxidants: Regulatory Status; Canada Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6th ed., vol. 6th. Shahidi F (ed.). Copyright # 2005 John Wiley & Sons, Inc.

Shibata T, Ishimaru K, Kawaguchi S, Yoshikawa H, Hama Y, **2008**. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. J. of Appl. Phycol.; vol. 20, n. 5, pp. 705-711.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM, **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol.; vol. 299, pp. 152-178.

Stamets P, **2002** Novel Antimicrobials from mushrooms. Herbal Gram; vol. 54, pp. 28–33.

Stiger Pouvreau V, Jégou G, Cérantola S, Guérard F, Lann K, **2014**. Phlorotannins in sargassaceae species from brittany (France): Interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes. *Adv. in Bot. Res.*, Elsevier; vol. 71, pp. 379-411.

Suresh V, Senthil Kumar N, Murugan P, Palani P, Rengasamy R, Anbazhagan C, 2012. Antioxidant properties of sequential extracts from brown seaweed, *Sargassum plagiophyllum*, C. Agardh. As. Pacific J. of Tr. Dis.; vol. 2, n. 2, pp. 937–939.

Swanson AK & Druehl LD, 2002. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. Aquat. Bot.; vol. 73, n. 3, pp. 241-253.

Thakur NL, Thakur AN, Müller WEG, 2005. Marine natural products in drug discover. Nat. Prod. Rad.; vol. 4, n. 6, pp. 471-477.

Thomson RH, 1964. Structure and reactivity of phenolic compounds; Biochemistry of Phenolic Compounds, pp. 1-32. Harborne (Ed.), JB. Academic Press 1964. New York.

Tierney M, Soler-vila A, Croft AK, Hayes M, 2013. Antioxidant Activity of the Brown Macroalgae *Fucus spiralis* Linnaeus Harvested from the West Coast of Ireland. Curr. Res. J. of Bio. Sci.; vol. 5, n. 3, pp. 81-90.

Tirzitis G & Bartosz G, 2010. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. Acta Biochim. Polonica; vol. 57, n. 1, pp. 139–142.

Truus K, Vaher M, Koel M, Mahär A, Taure I, 2004. Analysis of bioactive ingredients in the brown alga *Fucus vesiculosus* by capillary electrophoresis and neutron activation analysis. Anal. Bioanal. Chem.; vol. 379, pp. 849–852.

Urdiales JL, Morata P, De Castro IN, Sanchez-Jimenez F, 1996. Anti-proliferative effect of dehydrodidemnin B (DDB), a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates. Cancer Lett.; vol. 102, pp. 31–37.

Vadlapudi V, 2012. Antioxidant activities of marine algae: A review; Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy; pp. 189-203. Anna Capasso (Ed.). Research Signpost. ISBN: 978-81-308-0509-2.

Valenzuela AB, Sanhueza J, Nieto S, 2003. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. Grasas y Aceites, vol. 54, n. 3, pp. 295-303.

Van Alstyne KL, 1995. Comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds. J. of Chem. Ecol., vol. 21, n. 1, pp. 45-58.

Van Esch GJ, 1996. Toxicology of tert-butyl hydroquinone (TBHQ). Food and chemical Toxicology 1996. Food Chem. Toxicol.; vol. 24, n.10-11, pp.1063-1065.

Velazquez JDA & Cisneros Zevallos L, 2009. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants. J. of Food Sc.; vol. 74, pp. R107-R113.

Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B, 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, pp. 4113–4117.

Verhelst G, 2010. *Groot Handboek Geneeskrachtige Planten*, 4th ed.; BVBA Mannavita, pp. 262-264 [Dutch].

Vijayabaskar P & Shiyamala V, 2012. Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pacific J. of Tropical Biomed.*; pp. S90-S98.

Vinayak RC, Sabu AS, Chatterji A, 2011. Bioprospecting of a few brown seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Volume 2011, Article ID 673083, pp. 9, DOI:10.1093/ecam/neaq024.

Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G, 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.*; vol. 116, pp. 240-248.

Wang T, Jónsdóttir R, Liu H, Hu Liwei, Kristinsson HG, Raghavan S, Ólafsdóttir G, 2012. Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from brown algae *Fucus vesiculosus*. *J. of Agric. Food Chem.*; vol. 60, pp. 5874-5883.

Waterman PG & Mole S, 1994. Analysis of phenolic plant metabolites; *Ecological Methods and Concepts*; ed. Illustrata; pp. 248; Wiley (Ed.). ISBN 0632029692.

White N, 2008. *Fucus vesiculosus*. Bladder wrack. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. [cited 22/12/2014]. Available from: <http://www.marlin.ac.uk/generalbiology.php?speciesID=3348>.

Wijesinghe WAJP & Jeon YJ, 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*; vol. 88, pp. 13–20.

Wong K & Cheung PC, 2001. Influence of drying treatment on three *Sargassum* species 2. Protein extractability, in vivo protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *J. Appl. Phycol.*; vol.13, pp. 51–8.

Wulf D, 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Rev.*; vol. 82, pp. 47-95.

Yan XJ, Li XC, Zhou CX, Fan X, 1996. Prevention of fishoil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J. of Appl. Phycol.*; vol. 8, n. 3, pp. 201-203.

Yan XJ, Chuda Y, Suzuki M and Nagata T., Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. 1999. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; vol. 63, n. 3, pp. 605-607.

Yang JI, Yeh CC, Lee JC, Yi SC, Huang HW, Tseng CN, and Chang HW, **2012**. Aqueous Extracts of the Edible *Gracilaria tenuistipitata* are Protective Against H₂O₂-Induced DNA Damage, Growth Inhibition, and Cell Cycle Arrest. *Molecules*; vol. 17, n. 6, pp. 7241-7254.

Yogeeswari P & **Sriram** D, **2005**. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Curr. Med. Chem*; vol. 12, pp. 763–771.

Yoshie Y, Wang W, Petillo D, Suzuki T, **2000**. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fish. Sci.*; vol. 66, n. 5, pp. 998–1000.

Yoshie Y, Wang W, Hsieh YP, Suzuki T, **2002**. Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *J. Tokyo Univ. Fish.*; vol. 88, pp. 21-24.

Yoshie Y, Hsieh YP, Suzuki T, **2003**. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J. Tokyo Univ. Fish.*; vol. 89, pp. 1–6.

Yoshiki M, Tsuge K, Tsuruta Y, Yoshimura T, Kognemaru K, Sumi T, Matsui T, Matsumoto K, **2009**. Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, por-phyra-334 by heat treatment. *Food Chem.*; vol. 113, pp. 1127–1132.

Yuan YV & **Walsh** NA, **2006**. Antioxidative and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.*; vol. 44, pp. 1144-1150.

Zaragozá MC, López D, Sáiz MP, Poquet M, Pérez J, Puig-Parellada P, Mármol F, Simonetti P, Gardana C, Lerat Y, Burtin P, Inisan C, Rousseau I, Besnard M, Mitjavila MT, **2008**. Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. *J. Agric. Food Chem.*; vol. 56, pp. 7773–7780.

Zbakh H, Chiheb I, Motilva V, Riadi H, **2012**. Antibacterial activity of benthic marine algae extracts from the mediterranean coast of morocco. *J. of Microbiol, biotechnol., and food sc.*; vol. 2, n.1, pp. 219-228.

Zhang L, Chen J, Wang Y, Wu D, Xu M, **2010**. Phenolic Extracts from *Acacia mangium* Bark and Their Antioxidant Activities. *Molecules*; vol. 15, pp. 3567-3577;

Zhang Q, Li N, Liu X, Zhao Z, Li Z, Xu Z, **2004**. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. *Carbohydr. Res.*; vol. 339, n. 1, pp. 105-111.

Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ, **2006**. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. of Appl. Phycol.*; vol. 18, pp. 445–450.

Zhang WM, Huang WH, Chen WX, Han L, Zhang HD, **2014**. Optimization of Extraction Conditions of Areca Seed Polyphenols and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *Molecules*; vol. 19, pp. 16416-16427.

Zhongrui L, Bin W, Qihong Z, Youle Q, Huanzhi X, Guoqiang L, 2012. Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. *J. of app. Phycol.*; vol. 24, n.6, pp. 1527-1536.

Zjawiony JK, 2004. Biologically active compounds from aphylophorales (Polypore) fungi. *J. Nat. Prod.*; vol. 67, pp. 300–310.

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann K, Stiger Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E, 2009. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Britany coasts. *Food Chem.*; vol. 116, n. 3, pp. 693-701.

-Ringraziamenti-

Prima di tutto vorrei ringraziare la mia Famiglia per avermi sempre sostenuto durante questo percorso e Daniele, per essermi stato vicino in ogni momento.

Ringrazio per la collaborazione e la gentile disponibilità che mi hanno sempre dimostrato:

la professoressa Carolina Padrón, in quanto mia tutor di tesi e di tirocinio a Valencia,

la professoressa Rossella Pistocchi, in quanto mia relatrice di tesi,

Elena, che mi ha seguito durante il periodo di tirocinio, insieme alle altre ragazze del dottorato, Desi e Mariola,

I miei compagni di laboratorio, Sergio e Sarah con i quali ho condiviso questa esperienza

e la professoressa Marina Antonia Colangelo.

Grazie agli Amici, per avermi regalato un pò di spensieratezza nei momenti di tensione e per esserci stati.

Infine voglio ringraziare Benedetta, Chiara e Silvia, le mie compagne di avventura senza le quali questo Erasmus sarebbe stato tutto un'altra cosa.