



UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” GALAȚI



FACULTATEA ”ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR”

Teză de doctorat

Rezumat

**Extracția și caracterizarea compușilor bioactivi
din alge marine**

**Conducător științific,
prof. dr. ing. Gabriela Bahrim**

**Doctorand,
ing. Horincar Vicențiu Bogdan**

Galați, 2012



ROMÂNIA
UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS”
DIN GALAȚI



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

C 12355/22. 11. 2012

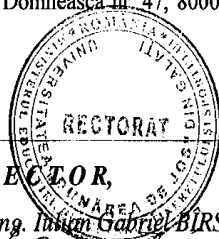
C ă t r e

Universitatea “ Dunărea de Jos “ din Galați vă face cunoscut că în data de 17.12.2012, ora 10.30, în sala F103 a Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: ”EXTRACTIA ȘI CARACTERIZAREA COMPUȘILOR BIOACTIVI DIN ALGE MARINE”, elaborată de domnul/doamna HORINCAR VICENTIU-BOGDAN, în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- 1. Presedinte:** Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați
- 2. Conducător de doctorat:** Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHIRM
Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați
- 3. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Francisc PETER
Universitatea ”Politehnica” din Timișoara
- 4. Referent oficial:** Prof.univ.dr. Cătălin TĂNASE
Universitatea ”Alexandru Ioan Cuza” din Iași
- 5. Referent oficial:** Conf.univ.dr. Rodica-Mihaela DINICĂ
Universitatea ”Dunărea de Jos” din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 / 461353.



RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. Ilie Gabriel BÎRSAN

Str. Domnească nr.47, cod poștal 800008, Galați, România, Tel.: +40 336. 130. 109, Fax: +40 236. 461. 353

Web: www.ugal.ro e-mail: rectorat@ugal.ro

Mulțumiri,

Port un deosebit respect pentru conducătorul științific al tezei de doctorat, prof. dr. ing. Gabriela Bahrim, căruia îi mulțumesc pentru că timp de trei ani a avut o contribuție majoră în formarea mea profesională. Deasemenea, le mulțumesc domnilor profesori, conf. univ. dr. Rodica Dinică, conf. dr. ing. chim. Ștefan Dima, conf. univ. dr. Luminița Georgescu, membri în comisia de îndrumare a tezei de doctorat, pentru contribuția domniilor lor la evoluția studiilor doctorale.

Mulțumesc domnilor profesori prof. dr. Francisc Peter și prof. dr. Cătălin Tănase pentru atenția acordată analizării tezei de doctorat în calitate de referenți oficiali.

Mulțumesc pe această cale doamnei prof. dr. ing. Elisabetta Maria Guerzoni și colectivului de la Facolta di Scienze degli Alimenti, Universita di Bologna, pentru găzduirea în cadrul acestei instituții și suportul științific și material acordat pe perioada stagiului extern.

Am o deosebită considerație pentru familia mea care mi-a format o conduită morală aleasă și în sa le mulțumesc pentru tot sprijinul acordat de-a lungul timpului și pentru ceea ce sunt în prezent.

Mulțumesc prietenei mele, Parfene Georgiana, pentru sprijinul necondiționat pe care mi l-a oferit de-a lungul timpului și pentru susținerea motivațiilor întemeiate de a ajunge la finalul acestei perioade de pregătire avansată.

Mulțumesc colegilor și tuturor celor care mi-au fost aproape în tot acest timp și au creat premisele unui mediu de lucru atractiv.

Nu în ultimul rând, mulțumesc proiectului POSDRU – 88/1.5/S/61445 - Sistem de Management al Burselor Acordate Doctoranzilor - ID 61445, acronim EFICIENT, pentru sprijinul financiar acordat pe perioada celor trei ani de pregătire doctorală.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITAS
GALATIENSIS

Teza de doctorat a fost elaborată cu sprijinul financiar al Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (**POSDRU**) – **88/1.5/S/61445 - Sistem de Management al Burselor Acordate Doctoranzilor - ID 61445**, acronim **EFICIENT**.

Mulțumesc pe această cale pentru suportul financiar acordat de-a lungul celor 3 ani de pregătire doctorală și pentru oportunitatea desfășurării activităților științifice în cadrul Universita di Bologna, Faculta di Scienze degli Alimenti.

Motivația temei și obiectivele științifice

În prezent există o tendință mondială în a exploata cât mai multe surse naturale de compuși bioactivi cu scopul de a-i utiliza în alimentație, în industria farmaceutică sau în produsele cosmetice. Sursele vegetale nu mai par o rețută greu de cucerit pentru că, de-a lungul anilor, s-au colectat multe informații care au contribuit la îmbunătățirea substanțială a bazelor de date privind compoziția în compuși bioactivi și rolul acestora pentru creșterea calității vieții. În ultimii ani, o atenție sporită se acordă studiului algelor marine datorită multiplelor beneficii pe care le oferă aceste resurse acvatice, cu impact economic, pentru sănătate, pentru diversificarea resurselor de hrană și energetice și nu în ultimul rând pentru protecția mediului înconjurător. Algele, în decursul evoluției, s-au adaptat la cele mai diverse condiții fizico-chimice din mediile acvatice acumulând intracelular prin biosinteza a numeroși compuși bioactivi prin metabolizarea substanțelor nutritive din mediile în care se dezvoltă.

În biomasa algelor se acumulează o multitudine de substanțe organice cu importanță vitală pentru celule și cu rol de aditivi cu valoare economică, când sunt extrași din alge sau biomasa este utilizată ca atare, cu influență benefică pentru creșterea calității vieții. Acești compuși au în celule rolul de metaboliți primari sau secundari, fiind localizați în diferite părți anatomice ale celulei algelor, și pot exercita efecte similare asupra altor tipuri de celule, *in vitro* sau *in vivo*.

Datorită numeroaselor aplicații industriale și terapeutice, în calitate de materii prime, aditivi și ingrediente, compușii bioactivi din alge au fost intens cercetați din punct de vedere chimic, dar au constituit prea puțin obiectul unor cercetări privind efectul fiziologic. Deși unele efecte *in vivo* au fost demonstrate sau previzionate, specialiștii consideră, ca și în cazul compușilor vegetali, că rămân încă multe aspecte de studiat. În ultimul timp, s-a încercat să se reconstituie geneza lor în celulă, pe baza comportamentului fiziologic și metabolic al celulelor, în diferite condiții de mediu.

La fel ca în plante, principalele grupe de compuși bioactivi cu importanță practică din alge sunt considerați: compușii fenolici, pigmentii, glicozidele, lipidele, uleiurile eterice, rășinile, alcaloizii, antibioticele și alți compuși cu acțiune antimicrobiană sau efect pesticid.

În acest context științific și aplicativ teza de doctorat intitulată: „*Extracția și caracterizarea compușilor bioactivi din alge marine*” a vizat ca obiectiv principal studiul potențialului bioactiv al unor specii de macroalge marine care cresc abundent și frecvent în Marea Neagră, din categoriile algelor verzi, speciile *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și alge roșii, specia *Ceramium rubrum*. Studiile realizate în cadrul programului de doctorat au vizat următoarele obiective specifice:

- Extracția compușilor bioactivi din biomasa algelor în condiții care să nu afecteze integritatea și concentrația acestor metaboliți.
- Identificarea și caracterizarea fizico-chimică a compușilor bioactivi extrași din macroalge marine.
- Identificarea potențialului bioactiv (activitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană) a extractelor din macroalge marine.
- Studiul potențialului fiziologic al compușilor bioactivi din algele marine asupra activității fiziologice a unor culturi de drojdii.

Teza de doctorat este structurată în două părți, după cum urmează:

I. STUDIUL DOCUMENTAR, structurat în trei capitole care fac referire la:

Capitolul 1, intitulat *Algele, bioresurse cu valoare economică*, este structurat în trei subcapitole și prezintă date din literatura de specialitate cu referire la importanța economică a algelor marine, tendințele moderne de cercetare a algelor marine și principii generale de taxonomie a principalelor grupe de alge.

Capitolul 2, intitulat *Compușii bioactivi din macroalgele marine* este structurat în cinci subcapitole în care sunt prezentați principalii compuși bioactivi sintetizați de alge: polifenoli, flavonoide, carotenoide, clorofilă, lipide, caracterizarea acestora din punct de vedere chimic și a efectelor biologice

Capitolul 3, intitulat *Tehnici de extracție și caracterizare a compușilor bioactivi din algele marine*, este structurat în patru subcapitole. Primele două fac referire la tehnicile de extracție a compușilor bioactivi, atât cele clasice (cu solvenți), cât și cele moderne, precum și tehnicile moderne de separare și identificare a compușilor bioactivi din extractele macroalgelor marine.

PARTEA EXPERIMENTALĂ, care cuprinde rezultatele investigațiilor originale, realizate pe parcursul stagiului de doctorat este structurată în șase capitole, după cum urmează:

Capitolul 4, intitulat *Obținerea și caracterizarea chimică și funcțională a extractelor din algele marine*, prezintă rezultatele obținute în determinările care au vizat extracția și caracterizarea chimică a principalelor grupe de compuși bioactivi sintetizați de cele trei specii de alge studiate, din categoriile alge verzi și roșii, *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum*. S-a determinat conținutul de polifenoli totali, flavonoide, carotenoizi, clorofilă, compuși volatili, acizi grași și microelemente, în extractele în mediu apos și cu solvenți organici (etanol, metanol, acetonă și hexan). Compoziția în compuși polifenolici s-a determinat prin cromatografie HPLC. Pentru separarea compușilor volatili s-a folosit tehnică modernă de microextracție în fază solidă (SPME), iar pentru identificarea acestora, gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS). S-au identificat grupări funcționale din compoziția compușilor bioactivi din extracte prin metoda FTIR și s-a studiat profilul mineral al biomasei celor trei specii de alge marine prin tehnica de fluorescență de raze X (XRF). S-a demonstrat că biomasa celor trei alge analizate conține, în cantități apreciabile, polifenoli, clorofilă, carotenoide, lipide și compuși volatili, compuși cu importanță practică și valoare economică.

Capitolul 5, intitulat *Testarea potențialului bioactiv al extractelor obținute din alge marine*, prezintă rezultatele obținute după evaluarea capacității antioxidante și a activității antimicrobiene a extractelor din biomasa macroalgelor marine. Activitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda DPPH. S-a testat potențialul antimicrobian al extractelor lipidice din algele studiate împotriva a patru tipuri de bacterii potențial patogene, speciile *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, prin determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) și a concentrației minime bactericide (CMB).

Capitolul 6, intitulat *Testarea potențialului fiziologic al compușilor bioactivi din macroalgele marine asupra activității fiziologice și a viabilității unor culturi de drojdii*, prezintă rezultatele obținute privind comportamentul metabolic și fiziologic al unor culturi de drojdii, speciile *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* și *Rhodotorula glutinis*, privind înmulțirea, capacitatea fermentativă, biosinteza de compuși cu valoare economică (proteine, pigmenți carotenoidici) și viabilitatea celulelor cultivate în medii suplimentate cu biomasă de alge. S-a demonstrat că în prezența

biomasei celor trei alge studiate, se obține o stimulare a activității metabolice și se îmbunătățește stabilitatea celulelor față de procesul de autoliză.

Capitolul 7 prezintă *Concluziile generale* rezultate în urma cercetărilor realizate, care scot în evidență date cu valoare științifică și aplicativă privind obținerea, caracterizarea și evaluarea potențialului biologic activ al unor alge marine frecvent întâlnite în Marea Neagră.

În final, se prezintă contribuțiile originale ale tezei de doctorat, cu impact în dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspectivele de continuare a cercetărilor, precum și diseminarea rezultatelor cercetărilor.

Pentru realizarea activităților de cercetare prevăzute în programul de studii de doctorat, în acord cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, s-au utilizat infrastructurile moderne de cercetare ale laboratoarelor:

- *Centrul integrat de cercetare și formare pentru biotehnologie aplicată în industria alimentară-Platforma Bioaliment* (www.bioaliment.ugal.ro), Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea *Dunărea de Jos* din Galați.
- *Laboratorul de microbiologie* al Facolta di Scienze degli Alimenti, Cesena Universita di Bologna, Italia.

Studiile doctorale au fost susținute financiar de proiectul finanțat de **Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane (POSDRU) - /88/1.5/S/61445**, cu titlul *Sistem de management al burselor acordate doctoranzilor*, acronim EFICIENT.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor doctorale au fost diseminate prin elaborarea și publicarea, în acord strict cu tematica tezei de doctorat, a **3 lucrări științifice**: 2 articole în reviste cotate ISI, 1 articol publicat în revista *Romanian Biotechnological Letters* și 1 articol submit la revista *Journal of Applied Phycology*; 1 articol publicat în *Annals of Dunărea de Jos University of Galați*, revistă indexată în baze de date internaționale. Totodată, pe parcursul celor trei ani ai stagiului doctoral, rezultatele cercetării au fost comunicate prin participare la 2 conferințe cu participare internațională.

Teza de doctorat conține 160 pagini, în care sunt incluse 37 figuri și 22 tabele. Studiul documentar reprezintă 25 % iar partea experimentală 75 %.

Capitolul 4. Obținerea și caracterizarea chimică și funcțională a extractelor din macroalge marine

4.1 Introducere

Obiectivul principal al studiilor prezentate în acest capitol a vizat analiza pe criterii calitative și cantitative a principalilor compuși chimici cu valoare terapeutică și economică din compoziția bioamsei a trei macroalge care se dezvoltă abundent pe țărmul românesc al Mării Negre, două alge verzi, speciile *Cladophora vagabunda* și *Entoromorpha intestinalis* și o algă roșie, specia *Ceramium rubrum*.

Cercetările realizate demonstrează rolul macroalgelor *Cladophora vagabunda* și *Entoromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* ca importante surse de compuși chimici valoroși, precum: compuși fenolici, pigmenți (carotenoide, clorofile), acizi grași, compuși volatili și microelemente. S-a demonstrat activitatea antioxidantă și antimicrobiană a extractelor din macroalgele marine studiate. Pentru caracterizarea chimică și funcțională a compușilor bioactivi s-au abordat metode moderne de investigare (extracția în fază solidă, cromatografia HPLC, gaz cromatografia, spectrometria de masă, spectrometrie de absorbție în infraroșu, tehnica fluorescență de raze X), prelucrare și interpretare statistică a datelor experimentale.

4.2 Materiale și metode

4.2.1 Macroalge marine

Ceramium rubrum

Taxonomie: Alga *Ceramium rubrum* este clasificată în regnul Plantae, încregătura Rhodophyta, subîncregătura Eurhodophytina, clasa Florideophyceae, subclasa Rhodymeniophycidae, ordinul Ceramiales, familia Ceramiaceae, subfamilia Ceramioideae, tribul Ceramieae, genul *Ceramium*.

Răspândire: *Ceramium rubrum* este o specie anuală, care colonizează substraturi stâncoase în mijlocul etajului infralitoral și în zonele expuse la acțiunea valurilor. *Ceramium* este un gen cosmopolit, caracterizată printr-o largă diversitate biologică, care include mai mult de 191 de specii, descrise în toată lumea. Pe litoralul românesc al Mării Negre poate fi întâlnită pe tot parcursul anului, cu o dezvoltare abundentă primăvara și vara.

Caractere morfologice: Sub aspect macroscopic alga *Ceramium rubrum* se prezintă sub forma unor filamente care pornesc din zona de bază (zona de prindere de sol, pietre), dispuse uniform, cu un aspect de rădăcină. Prinderea de substrat se realizează cu o rețea de discuri adezive. Sub aspect microscopic (preparat umed cu obiectiv cu grosime 40x), celulele sunt alungite, ramificate care la capete se unesc prin prisma unor noduri. Talusul algei este acoperit pe toată suprafața de un strat de celule mici periaxiale (figura 4.1).



Figura 4.1 Caractere morfologice ale speciei *Ceramium rubrum*
a)aspect macroscopic; b)aspect microscopic

Caracterele fiziologice: Speciile genului *Ceramium*, la fel ca cele mai multe alge roșii, sintetizează pigmentii clorofila *a*, ficocianina și ficoeritina, cu rol în fotosinteză. Ficocianina și ficoeritina sunt proteine solubile în apă care absorb puternic în spectrul de lumina verde, galben, portocaliu. Clorofila *a* absoarbe puternic în domeniul lungimilor de undă roșu și albastru-violet. În plus, unele specii de *Ceramium* spp. sintetizează o concentrație mare de pigmenti carotenoidici. Ikawa et al. (1973) au demonstrat efectul antimicrobian al speciei *Ceramium rubrum* asupra tulpinilor de *Bacillus subtilis*. Efectul a fost explicat prin conținutul în cantități mari de cristale de sulf liber conținute în celulele de *Ceramium rubrum*, cu proprietăți bacteriostatice asupra bacteriilor Gram-pozitive. Efectul nu a fost similar asupra bacteriilor Gram-negative.

Enteromorpha intestinalis

Taxonomie: Alga verde *Enteromorpha intestinalis* este clasificată în regnul Plantae, subregnul Viridiplantae, încrengătura Chlorophyta, subîncrengătura Tetraphytina, clasa Ulvophyceae, ordinul Ulvales, familia Ulvaceae, genul *Enteromorpha*.

Răspândire: Crește în habitaturi diverse, în medii marine și cu apă dulce și se dezvoltă abundent pe pietre, stânci, nisip, sedimente etc. Biomasa este abundentă în zonele de apă salmastră, în cazul în care există un flux apreciabil de apă proaspătă și în

zonele umede de pe stânci, din zona de stropire a valurilor. Este, de asemenea, un microorganism epifit comun, pe alte alge și scoici. *Enteromorpha intestinalis* se poate desprinde de substrat și, alimentate în continuare cu dioxid de carbon, se ridică la suprafață și continuă să crească în mase plutitoare. În condiții favorabile privind conținutul de nutrienți, salinitate, timp și temperatura, *Enteromorpha intestinalis* poate ocupa orice spațiu liber în zonele litorale. Are abilitatea de a crește abundent și pe mediile artificiale, cum ar fi construcțiile marine aflate în contact cu apa. De asemenea, *Enteromorpha intestinalis* este una din speciile care cauzează marea verde (aparitiile într-o masă compactă a macro-algelor), cu grave repercursiuni asupra echilibrului ecologic și poluării estetice a tărmlui și plajelor în zonele în care se dezvoltă abundent.

Caractere morfologice: Este o alga verde cu tal lamelar, în mod obișnuit neramificat sau slab ramificat; cromatoforul nu umple celula, are un singur pirenoid, atinge lungimea de până la 40 cm, are o creștere foarte rapidă și are capacitatea de a se reproduce cu o viteză mare.



Figura 4.2 Caractere morfologice ale speciei *Enteromorpha intestinalis*
a) aspect macroscopic, b) aspect microscopic

Celulele sunt distribuite uniform în thalul algei formând rânduri cu grosimea unei singure celule. Dimensiunile celulelor variază între 10-28 μm lațime și 8-30 μm lungime (figura 4.2). Alga verde *Enteromorpha intestinalis* este o specie cosmopolită cu o strategie de viață oportunistă. Aceasta algă are abilitatea de a se reproduce prin spori, zigoți sau gameți.

Caractere fiziologice: Alga verde *Enteromorpha intestinalis* a fost des studiată pentru compușii bioactivi pe care îi sintetizează intracelular. În cazul algei verzi *Enteromorpha intestinalis* recoltată din Golful Gdansk, conținutul de lipide a variat între 3,47 – 4,36 %, și conținutul de proteine între 9,42-20,6%. Cercetătorii au stabilit

ca cel mai mare conținut de proteine și lipide se stochează în biomasa algelor la începutul și la sfârșitul ciclului de creștere. Akkoz et al. (2011) au evidențiat o activitate antioxidantă de 39,6 IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de extract) și un conținut de compuși fenolici totali de 0,025 mg g^{-1} extract din biomasa algei verzi *Enteromorpha intestinalis*. Jiao et al. (2009) au demonstrat că polizaharidele din alga verde *Enteromorpha intestinalis* posedă un puternic efect antitumoral. Rata de inhibiție a celulelor tumorale a fost de 61,17%, 67,65% și 70,59%, în doze de 100, 200 și respectiv 400 mg/kg. Acest efect antitumoral a fost asociat cu un puternic efect imunostimulator indus de polizaharidele din alge.

Cladophora vagabunda

Taxonomie: Specia *Cladophora vagabunda* (algă verde) este clasificată în regnul Plantae, subregnul Viridiplantae, încregătura Chlorophyta, subîncregătura Tetrphytina, clasa Siphonocladophyceae, ordinul Cladophorales, familia Cladophoraceae, genul *Cladophora*.

Răspîndire: Speciile algei verzi *Cladophora* sunt răspîndite peste tot în lume, în zonele riverane, atât de apă dulce cât și în mediile marine. Cresc adesea fixate permanent la un anumit tip de substrat, mai ales atunci când acestea cresc în apele în care sunt curenți puternici, cum ar fi râurile și zonele litorale ale lacurilor și mărilor. În apele liniștite, biomasa se asociază în grupuri plutitoare formând adevărate covorașe de alge la suprafața apei (Fritsch, 1965). Existența ei în pâlcuri mici și restrânse o face foarte rezistentă la acțiunea valurilor puternice, iar morfologia ei compactă inhibă, de asemenea, colonizarea invazivă.

Caractere morfologice: Aspectul macroscopic al biomasei este compact, vătuit-spongios, stufos și conferă o senzație de lipicios-uleios la atingere. Forma sa cu foarte multe filamente îi permite, chiar dacă este foarte densă, să capteze foarte ușor lumina și să producă fotosinteză. Prezintă un tal filamentos și spongios care poate ajunge până la 50 de cm. Ramificațiile principale variază între 1 și 4, foarte rar 5, iar ramificațiile mici, secundare, se dezvoltă doar pe o singură parte a ramificației principale. Celulele au formă cilindrică, un diametru cuprins între 80-140 μm și o lungime cuprinsă între 2-12 μm (figura 4.3). Formele celulelor sunt diferite, cilindrice

sau cubice. Extremitățile celulelor cilindrice sunt ascuțite și pot fi asemănate ușor cu o conformație binecunoscută de spini.



Figura 4.3 Caractere morfologice ale speciei *Cladophora vagabunda*

a) aspect macroscopic, b) aspect microscopic

Caractere fiziologice: Anumite specii ale genului *Cladophora* au fost și sunt utilizate în alimentație, încă din antichitate, în Asia, pentru conținutul foarte bogat de proteine, fibre și vitamine. Fahprathanchai et al. (2006) au studiat toxicitatea algelor *Cladophora glomerata* și *Microspora floccosa*. Rezultatele acestui studiu au confirmat lipsa toxicității și a riscurilor pentru siguranța în alimentație.

Akkoz et al., (2011) a evidențiat un conținut de proteine de 14,13% în alga verde *Cladophora glomerata* și un conținut de lipide de 2,48 %, valoare destul de ridicată comparativ cu alga verde *Enteromorpha intestinalis* (1,63% lipide în biomasă). Tot acest studiu relevat faptul că alga verde *Cladophora glomerata* are un conținut de 0,047 mg compuși fenolici totali/g substanță uscată biomasă, cu o activitate antioxidantă de 33,9 IC₅₀ (μg/mL de extract). De asemenea, s-a evidențiat și un conținut ridicat de microelemente precum Ca (35630 ppm), S(40237 ppm), Mg (10267 ppm) și K (50230 ppm).

Algele studiate au fost recoltate manual din zonele litorale ale stațiunilor Olimp, Neptun și Costinești, de pe litoralul Românesc al Mării Negre, în luna iunie a anului 2010. Fiecare algă a fost identificată sub îndrumarea specialiștilor de la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Marină „Grigore Antipa”

S-a verificat puritatea speciilor și apoi biomasă s-a spălat de mai multe ori cu ser fiziologic steril, pentru îndepărtarea impurităților. Întreaga cantitate de biomasă utilizată în aceste studii a provenit dintr-o singură probă, care s-a conservat prin liofilizare.

4.2.2 Extracția compușilor bioactivi din algele marine

Prelucrarea biomasei pentru extracția compușilor bioactivi

După colectarea algelor de pe litoralul Marii Negre, probele au fost transportate și menținute până în momentul prelucrării lor în apă de mare. Algele au fost apoi spălate cu apă dulce pentru desalinizare și congelate pentru 24 de ore la -70°C în vederea liofilizării. După congelare, algele au fost supuse procesului de liofilizare timp de 72 de ore. Când s-a constatat îndepărtarea totală a conținutului de apă, probele liofilizate au fost marunțite până în stadiul de pudră. Probele au fost astfel păstrate până în momentul analizării la o temperatură de 4°C , în recipiente închise ermetic pentru a nu favoriza absorbția vaporilor de apă din atmosferă.

Extracția compușilor bioactivi

Pentru extracția compușilor bioactivi din alge s-a folosit extracția chimică clasică în apă și solvenți organici, metanol, etanol, acetonă, hexan și eter de petrol:benzen (1:1). S-a urmărit extracția compușilor hidrosolubili (polifenoli totali, flavonoide), liposolubili (compuși carotenoidici și clorofilieni) și a lipidelor, în condiții nednaturante și cât mai puțin costisitoare din punct de vedere economic.

4.2.3 Metoda de dozare a compușilor fenolici totali (metoda Folin-Ciocalteu)

Metoda Folin-Ciocalteu are la bază oxidarea compușilor fenolici în prezență de molibdowolfram (Na₂WO₄/Na₂MoO₄). Din această reacție rezultă O²⁻, care reacționează cu molibdatul, formând ionul (Mo⁴⁺) (albastru), a cărui absorbantă a fost determinată spectrofotometric la lungimea de undă $\lambda = 765 \text{ nm}$. Reacția are loc în mediu bazic. Metoda Folin Ciocalteu este simplă, specifică și rapidă. pH-ul de lucru trebuie să nu fie acid, pentru că ar cauza reacții lente și nespecifice. O limitare a metodei este lipsa specificității față de polifenoli, fiind detectați, în egală măsură, monofenolii și alte tipuri de compuși fenolici ce pot fi reduși.

4.2.4 Dozarea flavonoidelor prin metoda spectrofotometrică

Determinarea se bazează pe formarea unui complex galben, prin reacția flavone-aluminiu și citirea absorbantei la lungimea de undă $\lambda = 420 \text{ nm}$.

4.2.5 Metoda de dozare spectrofotometrică a compușilor carotenoidici

O probă de 1 g de biomasă liofilizată de alge s-a mojarat într-un mojar de porțelan cu circa 5 g nisip de cuarț. S-a adăugat un volum redus dintr-un amestec eter de

petrol:benzen (1:1) și s-a continuat mojararea. Pentru separarea pigmentilor carotenoidici de cei clorofilieni și xantofilici, proba astfel pregătită s-a trecut printr-o coloană de adsorbție, cu Al_2O_3 (4 – 7 cm înălțime). Proba s-a spălat cantitativ cu amestec eter de petrol:benzen, extractul rezultat trecându-se în continuare pe coloană. La trecerea prin coloană au fost reținuți pigmentii clorofilieni și xantofilele, iar carotenoidele s-au colectat în eluentul de culoare galbenă. S-a continuat procedura de separare până când faza mobilă care s-a colectat a fost incoloră. S-a notat volumul de extract (V_{ex}) care conține compușii carotenoidici colectați.

4.2.6 Metoda de dozare spectrofotometrică a clorofilei

Pentru extracția clorofilei, 1 g din biomasa liofilizată s-a mojarat cu nisip de cuarț, după care s-a omogenizat cu soluție 85% acetonă și s-a continuat mojararea până la extracția completă a pigmentilor. Conținutul din mojar s-a transferat în pâlnia Buchner și s-a filtrat sub vid. Procedura s-a repetat până când solventul a fost incolor. Este recomandabil să se reia reziduul cel puțin o dată cu acetonă nediluată, și apoi să se adauge la sfârșit apă suficientă pentru a aduce concentrația de acetonă la 85%. Atunci când extracția a fost completă, din filtrat s-au transfera 50mL de extract într-o pâlnie de separare ce a conținut 50 mL eter. S-a adăugat cu atenție H_2O până când a fost vizibilă separarea pigmentilor în cele două. S-a îndepărtat stratul apos. Stratul eteric din pâlnie s-a spălat cu cca 100 mL H_2O . S-a continuat spălarea soluției de eter, până când toată acetona a fost eliminată (5-10 spălări), apoi s-a transferat soluția de eter într-un balon cotat de 100 mL și s-a adus la semn cu eter etilic.

Un volum de 60 mL din soluția de eter care conținea pigmentul s-a amestecat într-un pahar Berzelius cu o cantitate redusă de Na_2SO_4 anhidru (un vârf de spatulă). După limpezire, s-a decantat soluția eterică și s-a citit extincția la lungimile de undă $\lambda=660$ nm și $\lambda=642$ nm. Dacă este necesar, soluția eterică se diluează cu eter anhidru astfel încât extincția să aibă valori cuprinse între 0,2-0,8, la lungimea de undă utilizată (valoarea optimă este aproximativ 0.6 la $\lambda=660$ nm). Se etalonează aparatul cu solventul folosit pentru fiecare lungime de undă ($\lambda=660\text{nm}$ și $\lambda=642$ nm).

4.2.7 Identificarea polifenolilor prin cromatografie de lichide de înaltă performanță

Pentru identificarea polifenolilor din extracte s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Analizele au

fost efectuate folosind un cromatograf de lichide Surveyor (Thermo Fischer, USA) echipat cu pompă, autosampler și detector UV-VIS – DAD. Integrarea picurilor cromatografice a fost realizată cu softul X Calibur (Thermo Fischer).

Toate probele au fost realizate în triplicat. Identificarea compușilor fenolici s-a realizat prin comparație cu standardele specifice în stare pură.

4.2.8 Identificarea acizilor grași din compoziția lipidelor prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă

Acizii grași liberi s-au identificat din extractele lipidice realizate cu hexan, respectând protocolul de extracție descris anterior. Pentru a avea o mai bună perspectivă asupra concentrațiilor de acizi grași, a fost determinată concentrația de masă lipidică din probele luate în calcul. Pentru analiza gaz-cromatografică, acizii grași au fost metilați cu obținerea esterilor metilici. Pentru obținerea esterilor metilici ai acizilor grași s-a utilizat derivatizarea în prezența diazometanului.

Separarea și identificarea esterilor metilici ai acizilor grași s-a realizat prin gaz – cromatografie (cromatograf Agilent Technologies 6890N, echipat cu injector split/splitless, detector cu ionizare în flacără) cuplat cu spectroscopia de masă HP 5973) (Palo Alto, CĂ, US). S-a utilizat o coloană tip SPB -5 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm (Supelco Inc., Bellefonte, PA, US). Acizii grași au fost identificați prin compararea timpului de retenție al acestora cu standardul intern C11:0 Met 99% (Sigma-Aldrich, Milan, Italy)

4.2.9 Identificarea compușilor volatili prin tehnica de microextracție în fază solidă cuplată cu gaz-cromatografie și spectrometrie de masă

Identificarea compușilor volatili s-a realizat după o etapă de microextracție în fază solidă (SPME – Solid Phase Micro Extraction), prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry), după metoda dezvoltată de Iucci (2007). În conformitate cu pick-urile formate, compușii volatili au fost identificați automat cu ajutorul programului de calcul asociat echipamentului, prin compararea spectrelor rezultate cu spectrele compușilor standard din bazele de date Agilent Hewlett – Packard NIST 98 și Wiley versiunea 6.

4.2.10 Analiza compușilor bioactivi prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR) este o metodă folosită analiza calitativă și cantitativă a compușilor organici și pentru determinarea structurii chimice a unor substanțe anorganice. Analiza FTIR s-a realizat în pentru biomasa uscată a algelor, utilizând echipamentul Magna-IR Spectrometer 350, prin înregistrarea spectrelor de la 4000 la 1000 cm^{-1} cu o rezoluție spectrală de 2 cm^{-1} , utilizând tehnica Atenuării Reflexiei Totale (ATR – *Attenuator Total Reflectance*). Pentru interpretarea rezultatelor s-au avut în vedere frecvențele caracteristice ale principalelor substanțelor organice.

4.2.11 Determinarea profilului mineral prin tehnica de fluorescență de raze X

Această metodă este utilizată pe scară largă pentru determinarea calitativă și cantitativă a compoziției chimice elementare a unei probe, mai ales pentru substanțe anorganice (minerale, ceramice, metale, soluri etc.). Tehnica se deosebește fundamental de difracția cu raze X. Aceasta din urmă se bazează pe faptul că lungimea de unda a radiației X este de același ordin de mărime cu distanțele dintre nodurile rețelelor cristaline (atomice, metalice, ionice sau moleculare) și, ca o consecință a difracției și interferenței, apar maxime ale intensității razelor emergente, la anumite unghiuri.

4.2.12 Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

Experimentele au fost efectuate în triplicat, iar datele prezentate reprezintă medie a celor trei determinări. Datele au analizate statistic prin analiza de varianță (ANOVA), testul Duncan folosind programul de calcul SPSS (versiunea 10). Diferențele cu $p < 0,05$ au fost considerate semnificative.

4.3 Rezultate și discuții

4.3.1 Evaluarea conținutului de compuși fenolici totali din macroalge

Compușii fenolici din biomasa algelor marine se extract cu randamente diferite în diferiți solvenți. În figura 4.8 este prezentat randamentul extracției polifenolilor totali, exprimat în mg acid galic/100 g substanța uscată biomasă, prin extracție cu solvenții organici: etanol 70%, metanol 70%, acetona 70%, hexan 70% și apă.

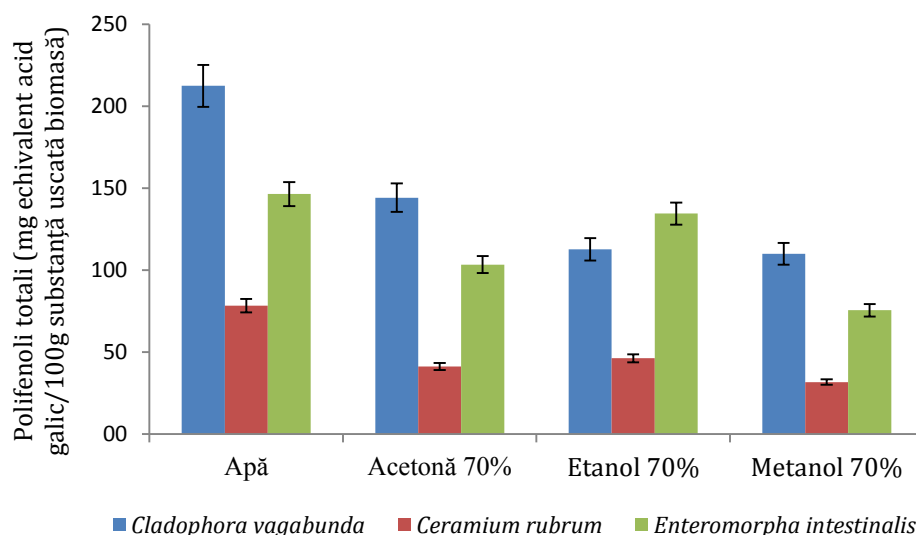


Figura 4.8 Variația randamentului de extracție în diferiți solvenți a compușilor fenolici sintetizați de algele marine *Cladophora vagabunda*, *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis*

Așa cum se observă din figura 4.8 cel mai bun randament de extracție a polifenolilor s-a obținut prin extracție în apă, cu valori de 212,4 mg acid galic/100 g substanța uscată biomasă, în cazul algei *Cladophora vagabunda*. Și în cazul celorlalte specii de alge, *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis*, polifenolii s-au extras cel mai bine în apă, respectiv 146,4 mg acid galic/100 g substanța uscată biomasă, pentru *Enteromorpha intestinalis* și 78,3 mg acid galic/100 g substanță uscată biomasă, pentru alga roșie *Ceramium rubrum*.

4.3.2 Identificarea compușilor fenolici sintetizați de macroalge prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Extractele în apă au fost supuse analizei de cromatografie de lichide de înaltă performanță pentru a evidenția compoziția în compuși fenolici din biomasa algelor studiate, comparativ cu standarde de referință pentru cei mai importanți compuși cu importanță practică. Datele obținute demonstrează că în extractul din alga roșie *Ceramium rubrum* compușii fenolici predominanți sunt acidul protocatehic și acidul clorogenic. Acesta din urmă reprezintă peste 10% din totalul polifenolilor totali evidențiați în extract. În cazul algei verzi *Cladophora vagabunda*, compușii fenolici predominanți sunt acidul 2,3-dihidroxibenzoic și p-hidroxibenzaldehida. Toate cele trei specii de alge sintetizează acid cafeic, vanilină și acid p-cumaric, în concentrații similare.

Tabelul 4.1 Principalii compuși fenolici sintetizați de macroalgele marine

Compusul fenolic	Spectrul compozițional în biomasa algelor*		
	<i>Ceramium rubrum</i>	<i>Cladophora vagabunda</i>	<i>Enteromorpha intestinalis</i>
Acid protocatehic	8,96	5,62	9,68
3-4 dihidroxibenzaldehidă	3,48	15,58	23,69
Acid p-dihidroxibenzoic	6,32	3,36	5,85
2-3 acid dihidroxibenzoic	6,52	11,46	6,61
Acid clorogenic	11,65	4,01	4,77
Acid vanilic	5,21	3,07	7,49
Acid cafeic	2,76	3,33	3,22
p-hidroxibenzaldehidă	5,12	12,95	4,33
Vanilină	1,95	4,17	4,83
Acid p-cumaric	1,11	5,84	5,55
Acid salicilic	1,85	1,32	4,56

*Valorile sunt exprimate în procente, raportat la conținutul total de compuși fenolici

Alga *Enteromorpha intestinalis*, sintetizează un profil al compușilor fenolici total diferit, comparativ cu celelalte două specii, în care predomină 3,4 - dihidroxibenzaldehida, acidul protocatehic și acidul vanilic.

4.3.3 Evaluarea conținutului de flavonoide din macroalgele verzi și roșii

În urma extracției s-a reliefat faptul că algele marine conțin cantități importante de flavonoide fapt ce le crește valoarea nutritivă și economică. Analizând rezultatele studiilor moderne din domeniul cercetării, investigării epidemiologice și al studiilor clinice s-a demonstrat faptul că flavonoidele au o acțiune de prevenire a instalării cancerului dar și un efect dovedit antitumoral. S-a observat că solvenții au un grad de selectivitate diferit pentru extracția flavonoidelor. Cele mai bune randamente de extracție au fost obținute prin extracția cu metanol 70%, când s-au obținut concentrații de flavonoide de 120,1 μg/g substanță uscată biomasă în cazul algei *Ceramium rubrum*, 80,26 μg/g biomasă substanță uscată, în cazul algei *Cladophora vagabunda*, și 70,55 μg/g substanță uscată biomasă, în cazul algei *Enteromorpha intestinalis*. În general, randamentele de extracție se modifică în ordine descrescătoare în funcție de tipul de solvent folosit, după cum urmează, metanol, etanol, acetonă și apă.

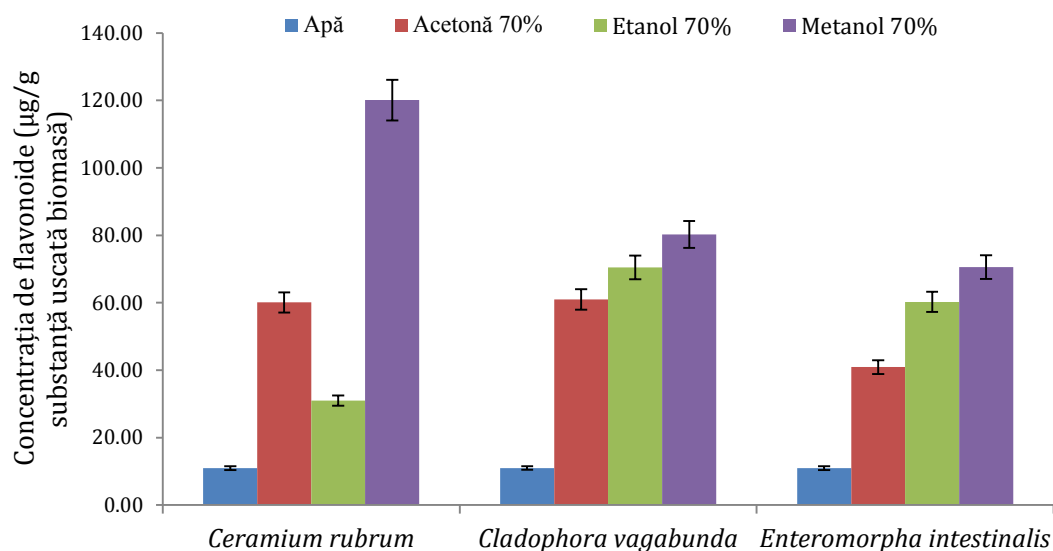


Figura 4.10 Variația randamentului de extracție a flavonoidelor din biomasa algelor marine în funcție de specia algei și solventul de extracție

4.3.4 Conținutul de carotenoide sintetizate de macroalge marine

Prin analiza comparativă a compușilor carotenoidici din extractele celor trei alge marine, extracția realizată cu amestec de solvenți eter de petrol:benzen (1:1) s-au obținut rezultatele prezentate în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2 Conținutul de carotenoide extrase în eter de petrol:benzen (1:1) din biomasa macroalgelor marine

Specia de alge marine	Carotenoide, mg/100 g substanță uscată biomasă
<i>Cladophora vagabunda</i>	35,47 ± 0,39
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	51,57 ± 0.3
<i>Ceranium rubrum</i>	75,37 ± 0.22

În urma determinării spectrofotometrice a compușilor carotenoidici extrași în eter de petrol:benzen (1:1), cea mai mare concentrație de 75,37 mg/100 g substanță uscată biomasă a fost evidențiată în cazul algei brune *Ceranium rubrum*. Această concentrație este dublă față de concentrația de carotenoizi extrași din biomasa algei verzi *Cladophora vagabunda*, la care s-a evidențiat în extract o concentrație de carotenoizi de 35,47 mg/100 g substanță uscată biomasă. În alga verde *Enteromorpha intestinalis* se acumulează prin biosinteză o concentrație de carotenoizi 57,57 mg/100g biomasă liofilizată, valoare care se situează între celelalte două evidențiate anterior.

4.3.5 Analiza conținutului de compuși clorofilieni în biomasa macroalgelor marine

Așa cum se estima, după determinarea spectrofotometrică a compușilor clorofilieni, cele mai mari randamente de extracție s-au obținut în cazul algelor verzi. În extractul din biomasa algei verzi *Enteromorpha intestinalis* s-au evidențiat concentrații de 3,37 mg clorofilă totală /g substanță uscată biomasă, 1,84 mg clorofila *a*/g substanță uscată biomasă și 1,53 mg clorofila *b* /g substanță uscată biomasă (figura 4.11).

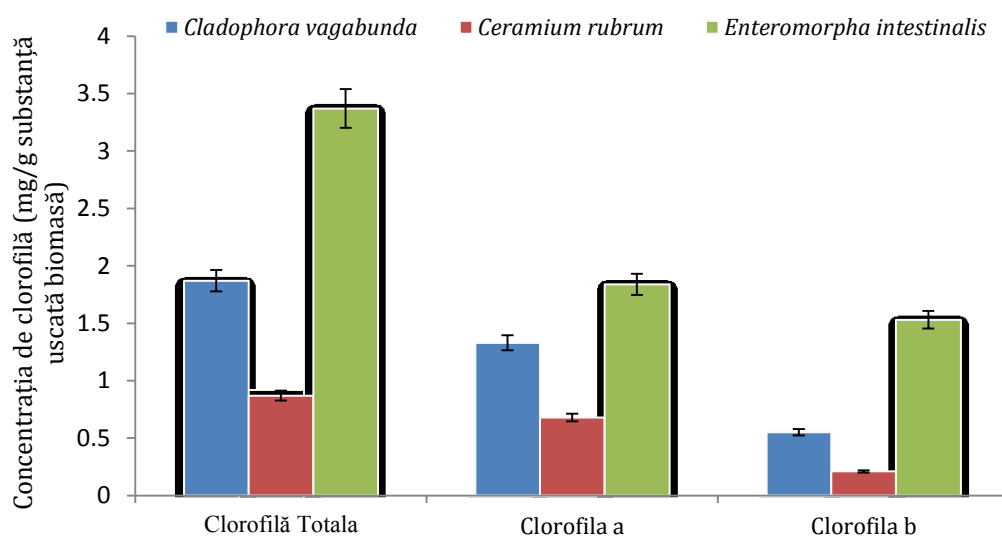


Figura 4.11 Potențialul macroalgelor marine de a sintetiza compuși clorofilieni

4.3.6 Analiza conținutului de compuși volatili extrași din biomasa macroalgelor marine

Prin extracția compușilor chimici din compoziția biomasei prin metoda microextracției în fază solidă s-a demonstrat faptul că algele marine studiate acumulează intracelular cantități importante de compuși volatili, cu o largă diversitate structurală.

Hexanalul este compusul majoritar identificat în extractele obținute din algele *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum*, în concentrație de 10% din totalul compușilor volatili identificați. În cazul extractului din alga *Cladophora vagabunda* concentrația de hexanal a fost doar de 3,38%. Hexanalul prezintă importanță ca reactant în industria aromelor, deoarece induce obținerea unor arome fructate, similar cu mirosul ierbii proaspăt tăiate.

Un alt compus întâlnit de asemenea în toate speciile analizate într-un procent de cca. 3%, este o-cimenul, care este un compus aromatic, insolubil în apă, dar miscibil cu

etanolul și eterul. Este constituentul unor uleiuri esențiale, cum ar fi uleiul de chimen și uleiul de cimbru. Cimenul este un ligand al ruteriului.

Alți compuși volatili identificați în concentrații apreciabile în extractele algelor studiate sunt: furanona *a* și furanona *b*, în toate algele, dar în special în *Ceramium rubrum*, octanul s-a identificat în *Ceramium rubrum* într-o concentrație de 9,8%, pe când la celelalte specii se găsește în cantități neglijabile (sub 0,5%).

În alga roșie *Ceramium rubrum* precum și în celelalte două specii de alge a fost identificat un compus aromatic caracteristic fructelor citrice, limonina, dar în concentrație redusă, de 0,42%. Acest compus se găsește în cantitate mare în lămâi, conferindu-le aroma specifică.

Limonina este folosită în industria farmaceutică pentru atenuarea gustului amar al alcaloizilor, în industria parfumurilor ca aromatizant, și pe scară mai redusă este folosită ca insecticid sau este adăugată cu succes în produsele pentru curățire pentru a le conferi mirosul caracteristic de lămâi și portocale. Limonina este din ce în ce mai mult utilizată ca solvent, pentru curățirea uleiurilor aderente în părțile mecanice ale aparaturii de procesare în industrie. De asemenea, limonina este constituentul de bază al unei soluții care îi ajută pe filateliști să îndeparteze timbrele de pe hârtia de plicuri fără a le distruge. Limonina este utilizată cu succes pentru a dizolva polistirenul și este considerată o alternativă ecologică pentru acetona.

Un alt compus evidențiat în concentrații reduse în extractele celor trei alge marine studiate a fost eucaliptolul. Acesta este un compus organic lichid și incolor. Acest compus este insolubil în apă, dar este miscibil cu etanolul și eterul. Are punctul de fierbere la temperatura de 176°C și punctul de vaporizare la temperatura de 149°C. Eucaliptolul este folosit în industria aromelor dar și în medicină, în doze reduse. Dacă sunt depășite dozele admise, eucaliptolul devine foarte toxic pentru organismul uman. În medicină eucaliptolul este foarte des studiat.

4.3.7 Analiza compoziției în acizi grași a lipidelor extrase din macroalgele marine

S-a determinat concentrația de lipide din compoziția biomasei celor trei alge studiate și s-a stabilit ca aceasta se situează la valori de cca. 40 mg/g substanță uscată biomasă și anume: 48 mg lipide/g substanță uscată biomasă, în *Enteromorpha intestinalis*, 46 mg lipide/g substanță uscată biomasă, în alga *Cladophora vagabunda* și 39 mg/g

substanță uscată biomasă, în alga *Ceramium rubrum*. După extracția lipidelor din biomasa algelor a fost analizată compoziția în acizi grași, prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă. Cromatogramele obținute au fost analizate cu ajutorul software-ului integrat al gaz-cromatografului, prin compararea cu standardele din baza de date.

Tabelul 4.6 Profilul acizilor grași din extractele algelor marine

Acizi grași	Compoziția în acizi grași, %*		
	<i>Cladophora vagabunda</i>	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	<i>Ceramium rubrum</i>
C14:0	9 ± 0.5	10.2 ± 2	6.3 ± 0.8
C15:0	0,5 ± 0.08	0,1 ± 0.02	n.d.
C16:0	24.6 ± 2	20.1 ± 1.8	23.4 ± 2.2
C16:1n-7	0,3 ± 0.05	0,18 ± 0.06	n.d.
C16:1n-9	0,7 ± 0.1	0,13 ± 0.06	n.d.
C16:2n-7,10	n.d.	0,2 ± 0.04	n.d.
C17:0	n.d.	0,3 ± 0.02	n.d.
C18:0	5,4 ± 0.8	5.1 ± 0.9	4.7 ± 0.5
C18:1n-9 cis	11.3 ± 1.3	13.5 ± 1.3	10.8 ± 1.5
C18:1n-9 trans	0,1 ± 0.02	0,4 ± 0.03	0,7 ± 0.04
C18:2n-9	2.4 ± 0.3	3.2 ± 0.7	2.1 ± 0.6
C20:0	0,11 ± 0.03	0,1 ± 0.03	0,4 ± 0.08
C20:1n-11	0,5 ± 0.02	0,6 ± 0.08	n.d.
C20:2n-6	0,4 ± 0.02	0,2 ± 0.05	n.d.
C20:3n-6	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.5	0.4 ± 0.07
C20:4n-6	23 ± 3	20.6 ± 2.8	14.5 ± 1.4
C20:5n-6	2.7 ± 0.7	5.6 ± 1.1	4.1 ± 0.8

* procente din conținutul total de acizi grași

Din datele prezentate în tabelul 4.6 reiese faptul că extractele algelor marine conțin cantități apreciable de acid palmitic (C16:0). Cele mai mari concentrații de acid palmitic au fost evidențiate în compoziția lipidelor sintetizate de alga verde *Cladophora vagabunda*, în concentrație de 24% din totalul acizilor grași. De asemenea, tot în lipidele produse de alga verde *Cladophora vagabunda* au fost evidențiate concentrații mari în acid arahidonic (C20:4n-6), în procent de 23% din totalul acizilor grași. Acidul oleic (C18:1n-9) a fost identificat în toate lipidele din macroalge într-o concentrație mai mare de 10%. Acidul eladic are aceeași structură ca acidul oleic, doar că este în poziția trans, dar nu depășește concentrații mai mari de 1%. Acidul stearic (C18:0) a fost identificat în toate cele trei probe cu o concentrație variind între 4,7% și 5,4 % din conținutul total de acizi grași. Acidul palmitoleic (C16:1) a fost identificat în alga verde *Cladophora vagabunda*, dar în concentrație foarte redusă, de 0,3 %.

Privind în ansamblu compoziția în acizi grași a lipidelor extrase din toate cele trei specii de alge marine, în alga verde *Enteromorpha intestinalis* au fost identificați ca majoritari acidul miristic, acidul palmitic și acidul oleic. În alga roșie *Ceramium rubrum*, pe lângă acizii grași importanți, au mai fost identificate urme de acid arahidonic (C20:0) și de acid eicosatrienoic (C20:3n-6).

Profilul acizilor grași identificat în algele marine studiate le face foarte interesante în utilizarea ca agenți antimicrobieni. Este foarte binecunoscut faptul că acizii grași saturați cu catenă lungă și medie exercită efect bacteriostatic și bactericid împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative. Bacteriile Gram negative sunt mai rezistente decât cele Gram pozitive, acestea necesitând o concentrație mult mai ridicată de acizi grași pentru exercitarea potențialului antibacterian (Galbraith, 1978).

4.3.8 Estimarea compoziției în compuși bioactivi din macroalgele verzi și roșii prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Spectroscopia în domeniul infraroșu (IR) este cea mai adecvată metodă de identificare a prezenței grupărilor funcționale din structura moleculelor compușilor organici. Tehnica FTIR a furnizat informații certe despre grupările funcționale care pot fi întâlnite în compușii bioactivi din algele marine.

Analiza FTIR a extractelor din alge marine a evidențiat prezența mai multor benzi caracteristice, intense, medii sau mici, specifice diferitelor grupări funcționale și caracterizate de frecvențele specifice acestora. Se poate distinge o abundență mai mare a benzilor de absorbție în cazul algei verzi *Enteromorpha intestinalis*. Dintre cei trei solvenți folosiți pentru extracția compușilor bioactivi, metanolul (70%) a avut o specificitate mai ridicată în cazul acestei specii, înregistrând un randament de extracție mai bun comparativ cu acetona (70%) și etanolul (70%). Nu în toate cele trei cazuri metanolul a demonstrat o specificitate crescută pentru extracția compușilor bioactivi.

4.3.9 Evaluarea profilului mineral al extractelor prin tehnica de fluorescență de raze X

Rezultatele obținute sunt încă o dovadă clară că algele marine pot fi considerate bogate surse de macro și microelemente (tabelul 4.16).

Tabelul 4.16 Conținutul în microelemente biomasei al macroalgelor marine

Element chimic	Concentrația de microelemente în biomasă, mg/100 g substanță uscată		
	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	<i>Cladophora vagabunda</i>	<i>Ceramium rubrum</i>
Sb	0,00	0,00	0,00
Sn	0,00	0,00	0,00
Cd	0,00	0,00	0,00
Ag	0,00	0,00	0,00
Sr	37,45	195,35	60,06
Rb	3,25	1,33	2,56
Pb	0,00	0,00	0,00
Se	0,00	0,00	0,00
As	0,55	0,00	0,45
Hg	0,00	0,00	0,00
Zn	2,24	3,82	4,90
Cu	0,00	0,00	0,00
Ni	0,00	9,41	0,00
Co	0,00	0,00	0,00
Fe	83,28	230,98	135,67
Mn	4,96	18,92	24,79
Cr	4,61	6,80	4,42
V	0,00	0,00	0,00
Tl	0,00	12,87	0,00
Sc	25,22	36,11	33,55
Ca	10496,16	32284,24	13119,51
K	2507,01	3354,20	419,97

Se constată faptul că biomasă algele conține o concentrație substanțială de calciu, cea mai mare concentrație înregistrându-se în cazul algei verzi *Cladophora vagabunda*, 32284,2 mg/100 g biomasă substanță uscată. Și celelalte două specii de alge *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis* conțin cantități importante de calciu, 13119 respectiv 10496 mg/100 g biomasă substanță uscată. Algele studiate conțin de asemenea potasiu. Acesta putând fi identificat într-o concentrație maximă de 3354 mg/100 g biomasă substanță uscată tot în alga verde *Cladophora vagabunda*. Alga verde *Enteromorpha intestinalis*, de asemenea, conține o cantitate mare de potasiu, de 2507 mg/100 g biomasă substanță uscată. Alga roșie *Ceramium rubrum* conține cea mai mică concentrație de potasiu de numai 419 mg/100 g biomasă substanță uscată. Conform recomandărilor specialiștilor s-a reglementat doza optimă de 4000 mg de potasiu/zi/individ pentru o viață echilibrată. În cazul algei verzi *Cladophora vagabunda*, puțin peste 100 de grame de biomasă i-ar fi necesar unui

individ pentru a-și acoperi carența de potasiu din organism. Alga verde *Cladophora vagabunda* poate fi considerată astfel o sursă extrem de bogată în potasiu, chiar superioară surselor vegetale consacrate, cum ar fi cartoful, prunele și stafidele.

Alga verde *Cladophora vagabunda* conține cea mai mare concentrație de fier (231 mg/100 g biomasă substanță) în biomasă, comparativ cu celelalte alge studiate. Aceeași algă verde *Cladophora vagabunda* deține supremația și când vine vorba despre concentrația de stronțiu în biomasa algală. Concentrația acestui element este de 195 mg/100 g biomasă uscată în alga verde și reprezintă o concentrație de 3-6 ori mai ridicată decât în cazul celorlalte două specii algale. În doze moderate stronțiul participă la procesele de osificare, dar există și reversul, când patrunderea în organism a stronțiului în cantități mai mari dereglează procesul de osificare și provoacă rahitismul de stronțiu.

Alga verde *Cladophora vagabunda* este singura algă în care s-a identificat taliul, un metal cu diferite întrebuințări. Numele vine de la grecescul thallein care înseamnă verde, pentru că spectrul său are o linie alb-verzuie. Este folosit ca sulfat de taliu - o otravă mortală pentru șobolani. Mai este folosit la confecționarea sticlei optice, care permite razelor infra-roșii să treacă prin ea, la confecționarea semiconductorilor și, într-o formă de aliaj cu mercurul, pentru a umple termometre de joasă temperatură. Taliul a fost identificat în alga verde *Cladophora vagabunda* într-o concentrație de 12,8 mg/100g biomasă substanță uscată. De asemenea, în probele de alge marine au mai fost identificate cuprul, manganul și rubidiul, toate în concentrații mai mici de 10 mg/100 g biomasă substanță uscată.

Rezultatele obținute sunt comparabile cu rezultatele obținute Bowen (1966), care a stabilit profilul mineral al diverselor grupe de alge și al apelor din care ele provin.

4.4 Concluzii parțiale

- Macroalgele marine *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* (alge verzi) și *Ceramium rubrum* (algă roșie) sunt surse importante de compuși bioactivi cu importanță practică, cu rol potențial de compuși antioxidanți, pigmenti, bioconservanți etc.
- Extracția compușilor fenolici totali se realizează cu ușurință în apă și soluții etanolice, acetonice și metanolice, la temperatura ambiantă, cuplat cu

tratament cu ultrasunete. Pentru extracția în apă cel mai bun randament de extracție a fost obținut de către alga verde *Cladophora vagabunda* (210 mg echivalent acid galic/100g substanță uscată biomasă). În ceea ce privește ceilalți solvenți organici, alga verde *Cladophora vagabunda* a avut cel mai bun randament de extracție a compușilor fenolici totali, 140 mg echivalent acid galic/100g substanță uscată biomasă), obținut prin extracție cu soluție 70% acetonă, iar pentru *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* (135 și respectiv 120 mg echivalent acid galic/100g substanță uscată biomasă) prin extracția cu soluție 70 % etanol.

- Dintre compușii fenolici, prin cromatografie HPLC, în extracte au fost identificați ca principali compuși acidul protocatehic, acidul clorogenic, acidul vanilic, acidul cafeic și vanilina. Acești compuși sunt recunoscuți pentru capacitatea antioxidantă, cu implicații deosebite *in vivo*, cu numeroase efecte terapeutice, demonstrate de numeroase studii descrise în literatura de specialitate.
- Flavonoidele sunt, de asemenea, prezente în cantități apreciabile (40-120 μg/g substanța uscată biomasă) în biomasa algelor studiate, care se clasifică în funcție de acest parametru în ordinea descrescătoare, *Ceramium rubrum*, *Cladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*.
- Specia *Ceramium rubrum* se remarcă prin conținutul de compuși carotenoidici al biomasei, în concentrație de 75mg/100g substanță uscată biomasă, de cca. 30 de ori mai mare, comparativ cu conținutul din morcovi.
- Algele verzi și brune sintetizează clorofile, cele mai mari concentrații fiind evidențiate în algele verzi, respectiv specia *Enteromorpha intestinalis* acumulează în biomasă o concentrație de clorofilă totală de 3,37 mg/g biomasă uscată. În extractele din alga roșie *Ceramium rubrum* s-a evidențiat 0,87 mg clorofilă totală/g biomasă uscată.
- Prin tehnica microextracției în fază solidă s-au analizat și evidențiat cantități importante de compuși volatili, cu o largă diversitate structurală și compozițională, cu numeroase implicații practice.

- Diversitatea calitativă și cantitativă a compoziției biomasei celor trei alge studiate s-a demonstrat prin analiza FTIR a extractelor din biomasa liofilizată în 70% acetonă, 70% metanol și 70% etanol, prin analogia particularităților structurale ale acestora cu grupările funcționale identificate în urma analizei spectrelor în infraroșu.
- Prin extracție hexan s-au obținut cantități de lipide comparabile cu cele evidențiate în literatură, pentru alte alge. În compoziția lipidelor s-a evidențiat profilul acizilor grași și s-au identificat concentrații apreciabile de acid palmitic (C16:0) (cea mai mare concentrație în alga verde *Cladophora vagabunda*, 24,6% din cantitatea totală de acizi grași identificați), acid miristic (9-10 % din acizii grași totali), acid oleic (C18:1n-9 cis) (concentrații de la 10,8 – 13,5% din totalul acizilor grași identificați).
- A fost identificat profilul mineral al biomasei macroalgelor, în care s-au identificat concentrații apreciabile de Ca și Fe, dar și de K, Sr și Ti, în cantități mai mari în biomasa algei verzi *Cladophora vagabunda*, comparativ cu celelalte două specii studiate.

Capitolul5. Testarea potențialului bioactiv al extractelor obținute din alge marine

5.1. Introducere

Studiile prezentate în acest capitol au vizat evaluarea capacității antioxidante și a activității antimicrobiene a extractelor în apă, 70% acetonă, 70% etanol, 70% metanol din algele *Ceramium rubrum*, *Chladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*. Originalitatea studiilor derivă din faptul că aceste aspecte sunt abordate în premieră pentru cele trei specii de alge și au permis obținerea unor date cu valoare de cercetare fundamentală și aplicativă privind capacitatea antimicrobiană și capacitatea antimicrobiană a extractelor din macroalgele marine, verzi și roșii.

5.2 Materiale și metode de investigare și prelucrare statistică a datelor experimentale

5.2.1 Materiale, medii de cultură și materiale și microorganisme

▪ Materiale

– Extracte în acetonă, 70% etanol, 70% metanol și hexan din biomasa liofilizată a algelor *Ceramium rubrum*, *Chladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*.

– Microplăci sterile cu 96 de godeuri.

▪ **Mediul BHI** („brain heart infusion”) (Sigma Aldrich, Germania), pentru cultivarea bacteriilor cu potențial patogen.

▪ **Microorganisme indicator:** *Listeria monocytogenes* 56LY, *Salmonella* Enteritidis 15S, *Bacillus cereus* DSM10 și *Escherichia coli* 555, din colecția Universității din Bologna, Facultatea Scienze degli Alimenti, Cesena, Italia. Culturile stoc s-au conservat prin menținerea celulelor pe mediu specific solidificat, sub ulei de parafină steril, la temperatura de 4°C.

5.2.2 Determinarea activității antioxidante prin metoda cu DPPH

Multe teste de determinare a antioxidanților sunt bazate pe capacitatea acestora de a neutraliza sau a inhiba radicalii liberi. Doi radicali liberi, care au fost cel mai frecvent utilizați pentru evaluarea activității antioxidante sunt: 1,1-difenil-2-picril-hidrazil DPPH, și 2,2-azinobis (acid 3-etil-benzotiazoline-6-sulfonic) ABTS. Radicalul liber DPPH este un radical liber cu un electron delocalizat pe întreaga moleculă. Delocalizarea conduce la obținerea culorii purpurii cu absorbție maximă la 517 nm, în soluție de etanol. Atunci când un antioxidant capabil să doneze hidrogen reacționează cu radicalul DPPH, dă naștere la o formă neutră redusă a DPPH care are o culoare galbenă. Scăderea absorbției este măsurată spectrofotometric și este comparată cu o soluție martor de etanol, pentru a calcula activitatea reductoare a radicalilor DPPH. Această metodă este foarte rapidă și simplă de măsurare a activității antioxidante.

5.2.3 Determinarea activității antimicrobiene

Multiplicarea bacteriilor test: Din culturile stoc s-au inoculat celule în mediul BHI lichid, steril (repartizat câte 8 mL, în eprubete), după care culturile s-au termostatat timp de 20 de ore, la temperatura de 37°C. Din fiecare cultură s-a inoculat apoi câte 1

mL de suspensie în altă eprubetă cu 8 mL de mediu BHI, steril. Culturile au fost termostatate la temperatura de 37°C, timp de 20 de ore, obținându-se o concentrație de celule de 10^6 ufc mL⁻¹.

Evaluarea activității antimicrobiene: S-a urmărit activitatea antibacteriană a extractelor în hexan, corelat cu puterea inhibitorie indusă de acizii grași.

Pentru evaluarea activității antimicrobiene a extractelor s-au avut în vedere doi parametri: concentrația minimă inhibitorie (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB), care s-au determinat folosind metoda recomandată de Ali-Shtayeh *et al.* (1997), cu unele modificări. În fiecare din cele 96 de godeuri din microplăci s-au adăugat câte 100 μL de mediu de cultură, BHI lichid, steril. În primele godeuri din prima coloană a microplăcii s-au adăugat 100 μL de extract din care s-au realizat diluții până la 10^{10} , astfel încât în fiecare godeu s-au obținut următoarele concentrații de extract din alge în hexan: 15, 7,5, 3,75, 1,75, 0,93, 0,46, 0,23, 0,11, 0,05, 0,02, 0,01 și 0,005 mg mL⁻¹. Apoi, în fiecare godeu al microplăcii au fost adăugați câte 100 μL de cultură test (10^6 ufc mL⁻¹ mediu). Pe microplacă, ultimele două coloane de godeuri au aparținut controlului pozitiv și respectiv controlului negativ.

Au fost considerate pozitive probele în care, în care s-a exercitat efectul inhibitor al extractului, pentru o anumită concentrație de extract, când s-a constatat stoparea înmulțirii sau distrugerea bacteriilor test, prin analiza turbidității mediului sau pierderea viabilității celulelor, fapt demonstrat prin absența dezvoltării de colonii prin scarificarea din suspensie pe suprafața mediului cu agar și termostatare în condiții optime.

Concentrația minimă inhibitorie reprezintă cea mai redusă cantitate de extract care inhibă complet dezvoltarea bacteriilor, iar *concentrația minimă bactericidă* reprezintă concentrația minimă de extract care determină distrugerea în totalitate a bacteriilor test din inocul.

5.2.4. Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

Experimentele au fost efectuate în triplicat, iar datele prezentate reprezintă medie a celor trei determinări. Datele au analizate statistic prin analiza de varianță (ANOVA), testul Duncan folosind programul de calcul SPSS (versiunea 10. Diferențele cu $p < 0,05$ au fost considerate semnificative.

5.3 Rezultate și discuții

5.3.1 Evaluarea activității antioxidante a extractelor din macroalge marine

S-a analizat activitatea antioxidantă a extractelor, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 5.1. Ca martor a fost folosită quercitina. Capacitatea antioxidantă este variabilă în funcție de sursa de obținere a extractelor și tipul de solvent, corelat cu compoziția chimică a extractelor. Corelând aceste rezultate cu cele privind conținutul de polifenoli totali se observă că nu se poate stabili o corelație pozitivă între cei doi parametri, aceasta deoarece și alți compuși bioactivi din compoziția extractelor exercită efect antioxidant (flavonoide, caratenoide etc).

Tabelul 5.1 Capacitatea antioxidantă a extractelor din macroalge marine din alge marine exprimată în IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)

Sursa de antioxidanți	Activitatea antioxidantă a extractelor, IC50 $\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$				
	Apă	70% Acetonă	70 % Metanol	70 % Etanol	Hexan
<i>Cladophora vagabunda</i>	201.4 ± 8.2	261.5 ± 9.6	219.3 ± 7.9	215.3 ± 8.6	393.1 ± 14.2
<i>Ceramium rubrum</i>	293.1 ± 9.8	355.9 ± 12.2	317.8 ± 10.9	301.2 ± 9.9	411.2 ± 15.3
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	117.2 ± 5.2	281.4 ± 10.2	201.2 ± 8.4	218.5 ± 8.1	347.2 ± 13.1
Quercitină	6.3 ± 0.3				

Din analiza rezultatelor prezentate în tabelul 5.1 rezultă superioritatea activității antioxidante a extractelor obținute din alga *Enteromorpha intestinalis*, pe locul secund situându-se cele obținute din alga *Cladophora vagabunda*. Ambele alge fac parte din categoria algelor verzi. Deși cu potențial antioxidant mai redus, comparativ cu celelalte două alge analizate, extractul din alga roșie *Ceramium rubrum* prezintă totuși activitate antioxidantă comparabilă sau superioară cu cea a extractelor din multe surse vegetale.

Solvenții în care se extrag cel mai eficient compușii cu activitate antioxidantă superioară sunt apa și acetona. Pentru toate cele trei extracte apoase valorile activității antioxidante au fost maxime comparându-le cu extractele obținute cu ceilalți solvenți organici.

5.3.2 Analiza potențialului antimicrobian

S-a evaluat capacitatea minimă de inhibiție a bacteriilor test indusă de extractele din algele macroalgele marine și s-a stabilit că acestea au capacitatea de a inhiba

creșterea bacteriilor potențial patogene. Activitatea bacteriostatică este determinată în primul rând de acizii grași. Cea mai puternică acțiune bacteriostatică s-a înregistrat asupra tulpinilor de bacterii aparținând speciilor *Listeria monocytogenes* și *Escherichia coli* (tabelul 5.2 și tabelul 5.3).

Tabelul 5.2. Capacitatea minimă de inhibiție a extractelor din alge marine, în hexan, împotriva bacteriei *Listeriei monocytogenes*

Extract în hexan din alge	Concentrația de extract, mg mL ⁻¹											
	15	7,5	3,75	1,75	0,93	0,46	0,23	0,11	0,05	0,02	0,01	0,005
<i>Cladophora vagabunda</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Ceramium rubrum</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

• 0-pozitiv (efect inhibitor) ; 1- negativ

După cum se poate observa din datele prezentate în tabelul 5.2, cel mai activ extract a fost cel din algă *Cladophora vagabunda*, acesta reușind să inhibe dezvoltarea bacteriilor test e în concentrația minimă de 1,75 mg mL⁻¹. Celelalte două extracte din algele *Ceramium rubrum* și respectiv *Enteromorpha intestinalis*, au o capacitate minimă de inhibiție de cca. două ori mai redusă. Acest rezultat este în corelație cu compoziția în acizi grași saturați cu catenă lungă și medie, care se consideră a fi principalii responsabili pentru efectul bacteriostatic al extractelor (Horincar et al., 2011; Parfene et al, 2013).

Tabelul 5.3 Capacitatea minimă de inhibiție a extractelor din alge marine, în hexan, împotriva bacteriei *Escherichia coli*

Extract în hexan din alge	Concentrația de extract, mg mL ⁻¹											
	15	7,5	3,75	1,75	0,93	0,46	0,23	0,11	0,05	0,02	0,01	0,005
<i>Cladophora vagabunda</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Ceramium rubrum</i>	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

*0-pozitiv (efect inhibitor) ; 1- negativ

Bacteria *Escherichia coli* s-a dovedit mai sensibilă în prezența extractului din alga *Ceramium rubrum*, la o concentrație de extract de într-o 0,93 mg mL⁻¹ . Celelalte extracte din alge înregistrând o valoare a capacității minime inhibitorii la concentrația de 1,75 mg mL⁻¹ . În acest caz, chiar și extractul de *Enteromorpha intestinalis*, care în cazul celorlalte microorganisme nu a avut un efect puternic inhibitor, a inhibat dezvoltarea bacteriei *Escherichia coli* la concentrația minimă de 1,75 mg mL⁻¹. În tabelul 5.4 se prezintă potențialul bacteriostatic exercitat de extractele din alge asupra tulpinii *Salmonella* Enteritidis. Două dintre extracte, din alga *Cladophora vagabunda* și alga *Ceramium rubrum*, au prezentat o concentrație

minimă inhibitorie în concentrație de 1,75 mg mL⁻¹. Extractul din alga *Enteromorpha intestinalis* are o capacitate inhibitorie mai redusă, de 3,75 mg mL⁻¹.

Tabelul 5.4 Capacitatea minimă de inhibiție a extractelor din alge marine, în hexan, împotriva bacteriei *Salmonella* Enteritidis

Extract în hexan din alge	Concentrația de extract, mg mL ⁻¹											
	15	7,5	3,75	1,75	0,93	0,46	0,23	0,11	0,05	0,02	0,01	0,005
<i>Cladophora vagabunda</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Ceramium rubrum</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*0-pozitiv (efect inhibitor); 1- negativ

Capacitatea minimă inhibitorie a extractelor împotriva bacteriei *Bacillus cereus* a fost similară pentru extractele din cele trei alge, în concentrație de 3,75 mg mL⁻¹, (tabelul 5. 5).

Tabelul 5.5 Capacitatea minimă de inhibiție a extractelor din alge marine, în hexan, împotriva bacteriei *Bacillus cereus*

Extract în hexan din alge	Concentrația de extract, mg mL ⁻¹											
	15	7,5	3,75	1,75	0,93	0,46	0,23	0,11	0,05	0,02	0,01	0,005
<i>Cladophora vagabunda</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Ceramium rubrum</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*0-pozitiv (efect inhibitor); 1- negativ

În tabelul 5.6 se prezintă efectul bactericid comparativ cu cel bacteriostatic al extractelor în hexan din algele marine. Extractul din alga roșie *Ceramium rubrum* a fost cel mai activ împotriva tulpinilor de bacterii test, în concentrații de 1,75-3,75 mg mL⁻¹. Cel mai puțin activ s-a dovedit extractul din alga verde *Enteromorpha intestinalis*, cu acțiune bactericidă în concentrație de 3,75-7,5 mg mL⁻¹. Extractul din alga verde *Cladophora vagabunda* a este cel mai eficient asupra bacteriei *Bacillus cereus*, în concentrație de 1,75 mg mL⁻¹.

Tabelul 5.6 Concentrația minimă bactericidă a extractelor din macroalge

Extract în hexan din alge	Concentrația de extract, mg mL ⁻¹							
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Salmonella enteritidis</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CMI*	CMB*	CMI*	CMB*	CMI*	CMB*	CMI*	CMB*
<i>Cladophora vagabunda</i>	3,75	7,5	1,75	3,75	1,75	1,75	1,75	3,75
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	3,75	7,5	3,75	7,5	3,75	3,75	3,5	3,75
<i>Ceramium rubrum</i>	3,75	3,75	1,75	3,75	1,75	1,75	1,75	3,75

*0-pozitiv (efect inhibitor); 1- negativ

Aceste rezultate sunt comparabile cu date descrise în literatură privind potențialul bacteriostatic și bactericid al altor alge marine studiate.

5.4 Concluzii

- Prin analiza activității antioxidante ale extractelor din biomasa macroalgelor *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* (alge verzi) și *Ceramium rubrum* (algă roșie) s-a demonstrat potențialul celor trei alge de a furniza compuși cu potențial rol fiziologic, corelat cu compoziția chimică și solventul în care se realizează extracția. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a evidențiat în extractele apoase din alga verde *Enteromorpha intestinalis*, dar și pentru extractele apoase ale celorlalte două specii studiate.
- S-a studiat potențialul grăsimilor extrase în hexan din biomasa macroalgelor de a furniza acizi grași saturați (acid miristic și acid palmitic) și nesaturați (acid oleic), recunoscuți pentru activitatea antimicrobiană,
- S-a demonstrat eficiența acizilor grași derivați din lipidele macroalgelor împotriva unor bacterii cu incidență în microbiologia alimentelor și siguranța alimentară, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*. Compușii sintetizați de macroalga roșie *Ceramium rubrum* s-au dovedit a avea cea mai mare capacitate inhibitoare asupra bacteriilor, cu efect bacteriostatic, în concentrație de 1,75 mg mL⁻¹ și efect bactericid, în concentrație de 3,75 mg mL⁻¹, asupra majorității bacteriilor studiate.

Capitolul 6. Testarea potențialului fiziologic al compușilor bioactivi din macroalge marine asupra activității fiziologice și a viabilității unor culturi de drojdii

6.1 Introducere

Din punct de vedere al compoziției chimice, algele marine conțin din abundență macroelemente și oligoelemente (iod, magneziu, potasiu, calciu, fier, mangan, fosfor, sulf, cupru, nichel, cobalt, rubidiu, siliciu), diastaze (enzime) și vitamine (A, B, C, D1, D2, E, F, K, PP), aminoacizi (acid glutamic, cisteina, metionina, valina, tirozina, lizina, acid aspartic), glucide, materii grase, clorofila (structura sa chimică seamănă cu cea a hemoglobinei umane), mucilagii și compuși farmacologic activi, fapt care îndreptățește considerarea lor în categoria alimentelor-medicament.

6.2 Materiale și metode de investigare și analiză statistică a datelor experimentale

6.2.1 Materiale

- **Culturi de drojdii.** Tulpini aparținând speciilor *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* și *Rhodotorula glutinis*, din Colecția Platformei Bioaliment (indicativ MIUG), din cadrul Facultății de Știința și ingineria alimentelor, din cadrul Universității „Dunărea de Jos” din Galați. Culturile pure s-au repicat periodic prin cultivare pe must de malț cu agar și s-au păstrat la temperatura de 4°C.
- **Medii fermentative.** Mediul pentru înmulțirea drojdiilor, cu următoarea compoziție (g/L): zaharoză 2,5, extract de drojdie 3, extract de malț 3, fosfat monopotasic 5, sulfat de amoniu 1. Mediul pentru fermentația alcoolică (g/L): zaharoză 10, extract de drojdie 3, extract de malț 3, fosfat monopotasic 5, , sulfat de amoniu 1 .

6.2.2 Înmulțirea drojdiilor în prezența biomasei algelor marine

Culturile pure de drojdii aparținând speciilor *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis* și *Candida utilis* Au fost reactivate prin cultivare timp de 48 de ore, la temperatură de 25°C, pe mediul must de malț cu agar. Celulele din biomasa reactivată au fost apoi suspensionate în ser fiziologic steril și s-a determinat concentrația de celule în suspensie prin măsurarea densității optice la lungimea de undă de $\lambda=600$ nm. Densitatea optică a suspensiei, care a fost apoi utilizată ca inocul a fost $DO = 0,5$. Din suspensiile de drojdie s-au inoculat apoi câte 5 ml în 100 mL mediu fermentativ pentru înmulțire, suplimentat cu 0,25 g biomasă liofilizată aparținând celor trei alge, *Ceramium rubrum*, *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis*. S-au realizat și probe martor prin cultivarea drojdiilor în mediu nesuplimentat cu biomasă de alge. După inoculare, a urmat cultivarea submersă, pe agitator orbital, având control analogic al frecvenței de agitare și termostatare (LAB COMPANION COMECTA S.A.), timp de 72 de ore, la temperatura de 25°C și la o viteză de agitare de 170 de rpm. La fiecare 24 de ore au fost recoltate probe și s-a stabilit concentrația de celule prin numărare directă cu citometrul Thoma.

La finalul celor 72 h de cultivare s-a stabilit randamentul de biomasă umedă și prin determinarea substanței uscată a biomasei, randamentul de biomasă substanță uscată. S-a determinat gradul de autoliza, prin colorarea vitală a celulelor în soluție de

albastru de metilen cu citrat. *Gradul de autoliză* s-a stabilit ca procent a numărului de celule autolizate în raport cu numărul total de celule. *Capacitatea de înmulțire* a celulelor a fost evaluată pe baza parametrilor cinetici: viteza de înmulțire, numărul de generații, timpul de generații.

6.2.3 Testarea comportamentului fermentativ al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în prezența biomasei algelor marine

Un volum de 200 mL mediu fermentativ steril suplimentat cu 0,25g % biomasă liofilizată de drojdie, în baloane de fermentație, s-a inoculat cu 10 mL inocul de drojdie (suspensie cu densitatea optică egală cu $DO=0,5$, măsurată la lungimea de undă de $\lambda=600$ nm). Vaselor li s-a atașat ventilul de fermentație. Probele au fost termostate timp de 120 de ore, la temperatura de 28°C.

Capacitatea fermentativă și viteza de fermentație s-au apreciat în funcție de cantitatea de CO₂ eliberat în unitatea de timp, raportată la unitatea de volum a mediului. S-a exprimat grafic, notându-se pe ordonată g CO₂/L și pe abscisă timpul, și s-a exprimat curba pierderilor de CO₂ de la începutul experimentului precum și CO₂-ul degajat în intervalul de timp dintre două cântăriri.

6.2.4 Determinarea concentrației de azot total în biomasa de drojdie *Candida utilis*

S-a comparat conținutul de azot din biomasa drojdiei *Candida utilis* acumulat prin cultivare în medii suplimentate cu biomasă liofilizată de alge. Metoda utilizată a fost metoda cu kitul Hanna, în care cuantificarea azotului total are la bază o reacție cromotropă acidă. Prin reacția chimică dintre nitrat și reactivii kitului apare o colorație galbenă specifică, a cărei absorbantă este determinată cu ajutorul unui spectrofotometru, la lungimea de undă $\lambda=420$ nm. Instrumentul va afișa pe ecran direct valoarea concentrația în azot total, în mg/L. Metoda are un prag de detecție a azotului total cu concentrații cuprinse între 0,0 – 25,0 mg/L. Precizia determinării este de $\pm 0,5$ la 15,0mg/L. Valorile au fost apoi convertite în mg azot total/g substanță uscată biomasă.

6.2.5 Determinarea concentrației de carotenoizi din biomasa drojdiei *Rhodotorula glutinis*

Pentru extracția carotenoidelor s-a procedat la extracția cu amestec de eter de petrol:benzen (1:1) și s-a menținut la temperatura camerei, timp de 30 min, pentru

extracția pigmentilor. Resturile de biomasă au fost îndepărtate prin filtrare, iar filtratul a fost trecut pe coloană cu Al_2O_3 (4 – 7 cm înălțime).

Carotenoidele solubile în solvent trec prin coloană, iar eluentul se colectează la partea inferioară într-un balon conic, notându-se volumul de extract (V_{ex}). În extractul carotenoidic obținut s-a citit absorbanta la lungimea de undă $\lambda=436$ nm. Concentrația în β -caroten (Cx) a probelor de analizat s-a determinat în acord cu o curba etalon trasată cu soluție standard de β -caroten.

6.2.6. Metode de analiză statistică și interpretare a datelor experimentale

Experimentele au fost efectuate în triplicat, iar datele prezentate reprezintă medie a celor trei determinări. Datele au analizate statistic prin analiza de varianță (ANOVA), testul Duncan folosind programul de calcul SPSS (versiunea 10. Diferențele cu $p < 0,05$ au fost considerate semnificative.

6.3 Rezultate și discuții

Preocupările pentru studiul influenței algelor asupra funcționalității metabolice a microorganismelor sunt de actualitate. Efectul inhibitor al algelor a fost îndelung studiat și prezintă importanță pentru evaluarea calității algelor ca surse de nutrienți pentru nutriția microorganismelor, creând astfel perspective valoroase pentru eficientizarea valorificării resurselor naturale în compoziția mediilor fermentaive utilizate în biotehnologie, pentru creșterea productivității bioproceselor și reducerea costurilor.

6.3.1 Dinamica de înmulțire a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în prezența biomasei algelor marine

Analizând rezultatele obținute în cadrul acestui experiment se poate afirma ca biomasa algelor marine a avut un efect de stimulare a creșterii și înmulțirii drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*. După cum se poate observa în figura 6.2, probele în care mediul fermentativ a fost suplimentat cu 0,25% biomasă liofilizată de alge marine, *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis* au prezentat o capacitate superioară de înmulțire, procesul demarându-se mult mai rapid comparativ cu proba martor. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin suplimentarea mediului fermentativ cu biomasă de *Ceramium rubrum* și *Cladophora vagabunda*, la care se observă o etapă de lag de cca. 20 de ore, după care drojdia începe să se înmulțească rapid, comparativ cu proba martor.

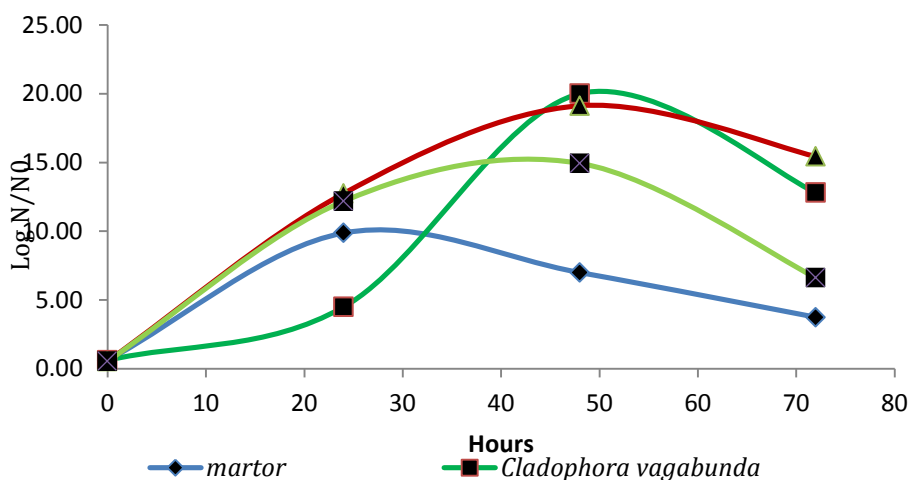


Figura 6.2 Dinamica de înmulțire a *Saccharomyces cerevisiae* în mediul fermentativ suplimentat cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge

Utilizând datele obținute din numărarea celulelor de drojdie s-au calculat parametrii cinetici ai procesului de înmulțire a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, după 24 de ore de cultivare submersă. Rezultatele obținute au fost evidențiate în figura 6.3, de unde reiese faptul ca cel mai număr de generații s-a obținut când mediul a fost suplimentat cu biomasa algei roșii *Ceramium rubrum*. Algele verzi au indus efecte diferite, proba în care mediul a fost suplimentat cu *Enteromorpha intestinalis* obținând o valoare cu puțin peste valoarea probei martor, în timp ce în probele care au conținut alga *Cladophora vagabunda* numărul de generații a fost mai redus, comparativ cu proba martor.

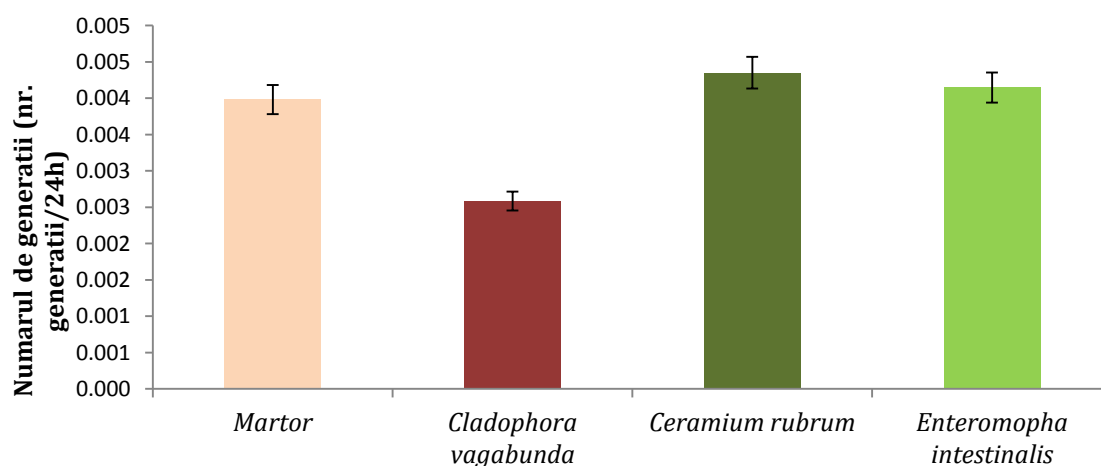


Figura 6.3 Numarul de generatii al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* prin multiplicare în medii suplimentate cu 0,25% biomasă de macroalge marine

Corelat cu numărul de generații, așa cum se poate observa în figura 6.4, viteza de înmulțire respectă aceeași evoluție, alga roșie *Ceramium rubrum* determinând cel mai intens efect stimulator, comparativ cu celelalte alge. În prezența biomasei algei *Ceramium rubrum*, drojdia *Saccharomyces cerevisiae* a prezentat o viteză de înmulțire cu 9% mai mare comparativ cu proba martor.

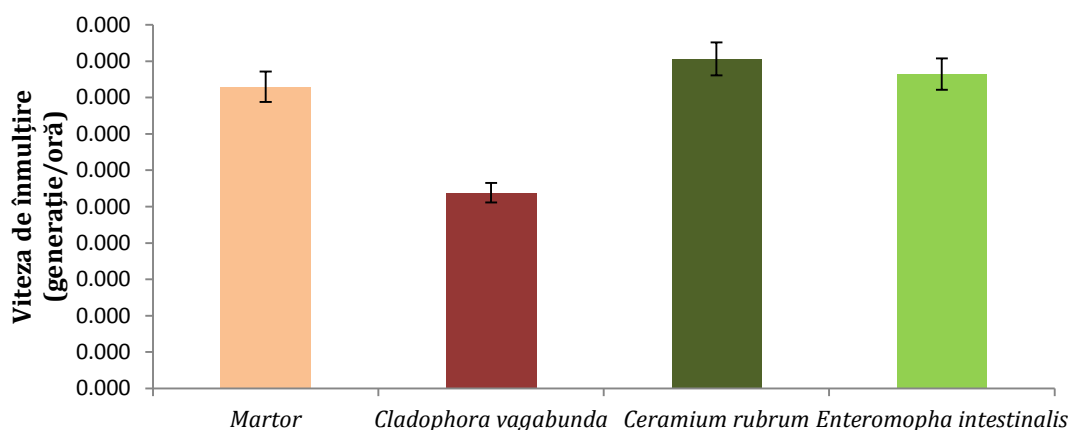


Figura 6.4 Viteza de înmulțire a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în medii fermentative suplimentate cu 0,25% biomasă de macroalge marine

Pe locul al doilea se situează mediul suplimentat cu biomasa algei *Enteromorpha intestinalis*, în care viteza de înmulțire a drojdiei a crescut cu 4,21% în raport cu proba martor. În mediul îmbogățit cu biomasă de *Cladophora vagabunda*, drojdia *Saccharomyces cerevisiae* avut o viteză de înmulțire mai redusă cu 35 %, comparativ cu proba martor, fapt demonstrat și de evoluția numărului de celule pe perioada cultivării.

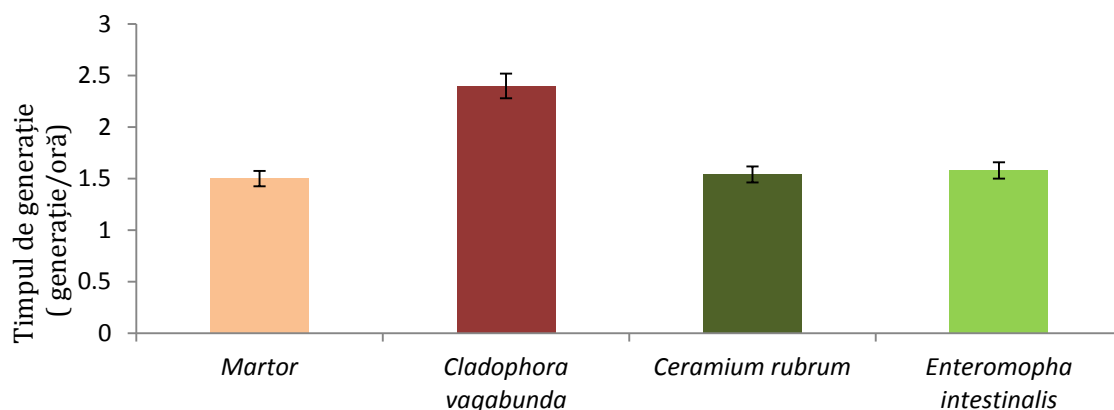


Figura 6.5 Timul de generație al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* cultivată în condiții submerse, în medii fermentative suplimentate cu 0,25% biomasă de macroalge marine

Rezultatele sunt prezentate în figura 6.5, de aici evidențiindu-se o corelație clară cu ceilalți doi parametri cinetici calculați, numărul de generații și viteza de înmulțire. Astfel, în cazul îmbogățirii mediului de cultură cu biomasa algei *Cladophora vagabunda*. Timpul de generație a fost de cca. 1,7 ori mai mare comparativ cu proba martor.

În cazul celorlalte două probe îmbogățite cu alga *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis*, valorile obținute în calculul timpului de generație sunt cu 9 % și respectiv 4 % mai mici, comparativ cu proba martor.

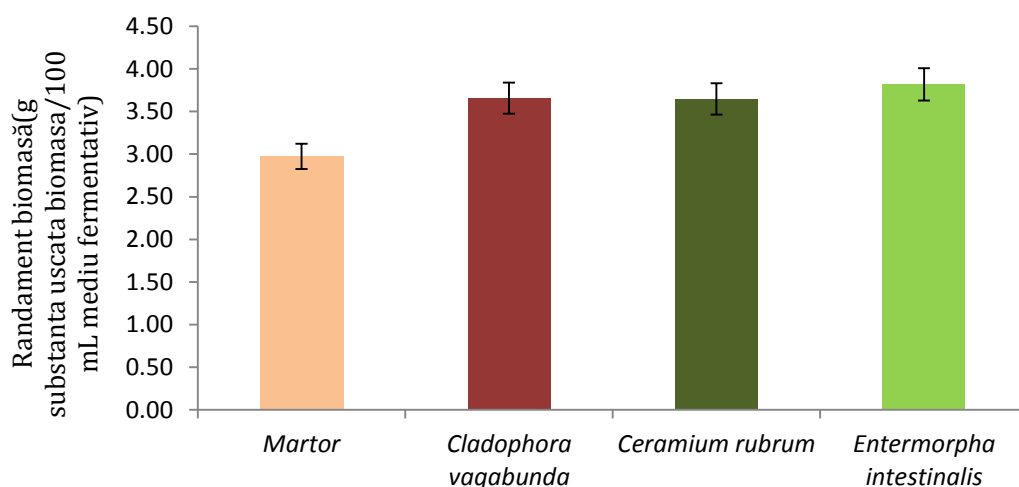


Figura 6.6 Stimularea formării de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* prin cultivarea drojdiei în medii suplimentate cu 0,25% biomasa liofilizată de macroalge

Analizând rezultatele din perspectiva randamentului de biomasa din figura 6.6 se poate observa că cea mai mare cantitate de biomasa substanță uscată este obținută din proba suplimentată cu biomasa algei verzi *Enteromorpha intestinalis*, chiar dacă aceasta nu a înregistrat rezultate spectaculoase la înmulțirea celulelor, probabil stimulează mai bine creșterea celulelor și biosinteza intracelulară de metaboliți. Astfel, în mediile suplimentate cu 0,25% biomasa liofilizată de *Enteromorpha intestinalis* și *Cladophora vagabunda*, randamentul de biomasa a crescut cu 28 % și respectiv cu 23,3%, comparativ cu proba martor. O cantitate de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* mai redusă cu 22,8 % de a fost obținută când mediul a fost îmbogățit cu biomasa din alga roșie *Ceramium rubrum*.

6.3.2 Testarea viabilității celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* cultivate în mediul suplimentat cu biomasa de macroalge marine

Biomasa drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, obținută în condițiile de cultivare menționate anterior, s-a separat de lichidul cultural a fost menținută timp de 48 de ore, la temperatura camerei, apoi s-a analizat gradul de autoliză (figura 6.7).

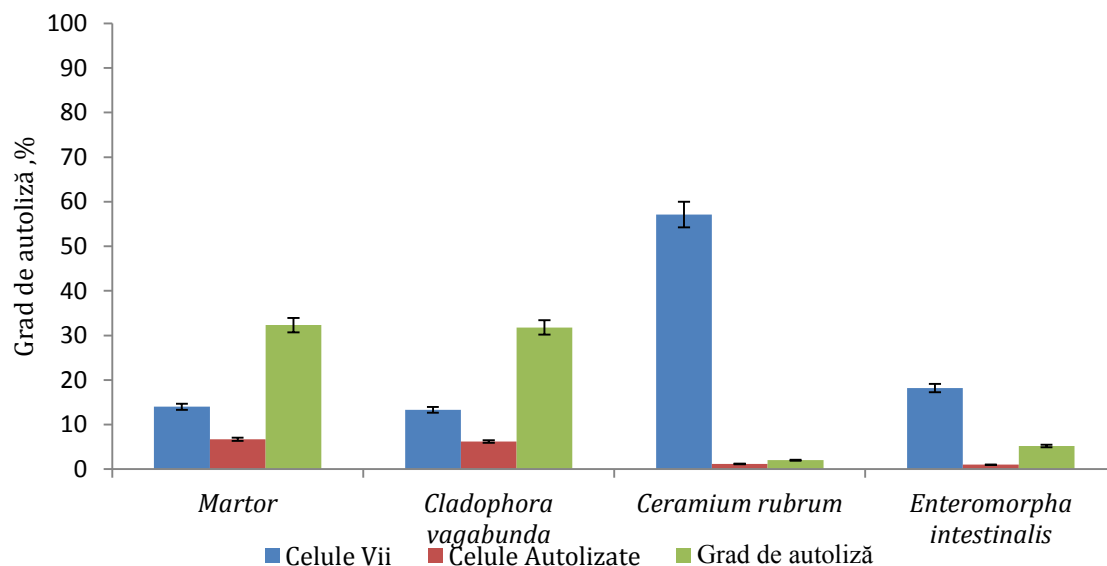


Figura 6.7 Gradul de autoliză al biomasei drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, obținută prin cultivare în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge

După cum se poate observa în figura 6.7 cea mai puternică acțiune protectivă asupra celulelor de drojdie a avut-o alga roșie *Ceramium rubrum*, care are cel mai pregnant efect stimulat și asupra procesului de înmulțire.

Alga verde *Cladophora vagabunda* nu conferă protecție celulelor de drojdiei, rezultatele obținute în acest caz fiind asemănătoare cu ale probei martor, atât privind ponderea celulelor vii și moarte, cât și privind gradul de autoliză. Alga verde *Enteromorpha intestinalis* exercită un efect moderat de stimulare a menținerii viabilității celulelor.

6.3.3 Analiza comportamentului fermentativ al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* în medii îmbogațite cu biomasa macroalgelor marine

În cadrul acestui studiu s-a urmărit comportamentul fermentativ al drojdiilor în prezența biomasei de alge marine. Analizând rezultatele obținute privind fermentația alcoolică a zaharozei în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată a celor trei alge, comparativ cu mediul martor, se observă rolul stimulat al algelor *Enteromorpha*

intestinalis și *Ceramium rubrum* în stimularea capacității fermentative a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* (figura 6.8 și figura 6.9). Analizând figura 6.8 se poate observa că probele în care mediul de cultură a fost îmbogățit cu alge marine au același comportament.

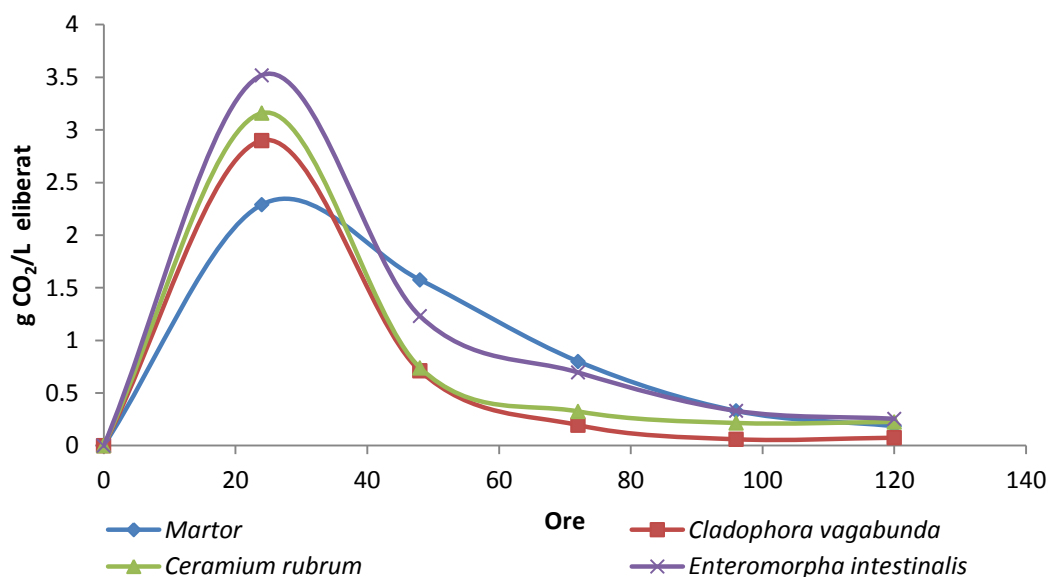


Figura 6.8 Cinetica fermentației zaharozei de către drojdia *Saccharomyces cerevisiae* în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de drojdie

Se observă că adaosul de 0,25% biomasă liofilizată a celor trei alge marine stimulează potențialul fermentativ al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, pentru că în toate cele trei cazuri fermentația are intensitate maximă în intervalul 0-24 ore. Deși curbele au aliura asemănătoare cu cea a probei martor, randamentul de fermentație este crescut în cazul probelor suplimentate cu biomasă algelor marine. Cel mai mult stimulează fermentația suplimentul din alga verde *Enteromorpha intestinalis*, când se obține un randament de fermentație cu 36 % mai mare, comparativ cu proba martor. Adaosul de biomasă din alga roșie *Ceramium rubrum* determină o creștere a randamentului de fermentație cu 26,5 %, iar adaosul de biomasă din alga verde *Cladophora vagabunda*, cu numai 21 %, comparativ cu proba martor.

În figura 6.9 se prezintă dinamica de fermentare, ceea ce confirmă eficacitatea adaosului de biomasă al algei *Enteromorpha intestinalis* în stimularea capacității fermentative a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*. Se poate observa că toate probele în care mediul fermentativ s-a suplimentat cu biomasă de alge, au un ritm mai accelerat de fermentație, în primele 48, comparativ cu proba martor.

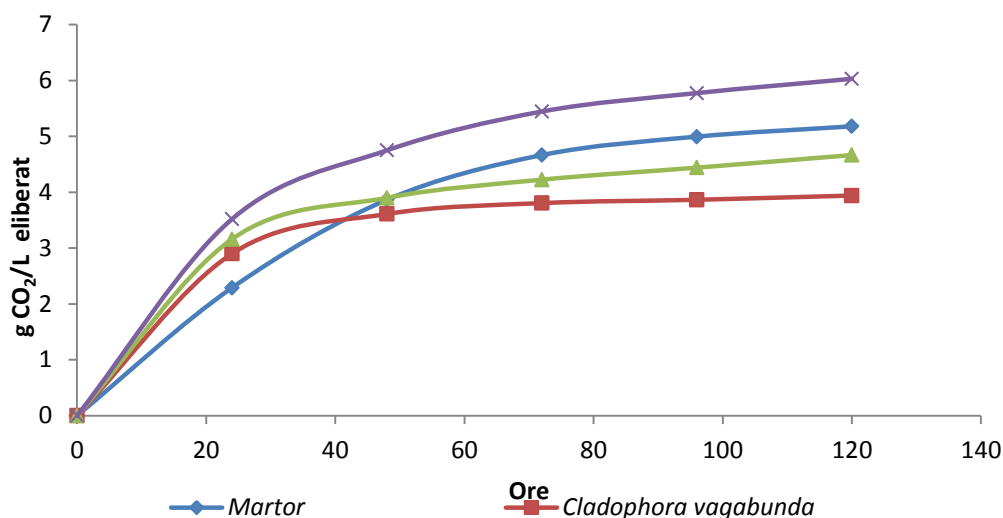


Figura 6.9 Dinamica fermentației alcoolice a zaharozei în medii cu adaos de 0,25 % biomasă liofilizată de macroalge

6.3.4 Evaluarea capacității de înmulțire și biosinteză a compușilor cu azot a drojdiei *Candida utilis* în medii îmbogățite cu biomasă de macroalge marine

În figura 6.10 sunt prezentate curbele de creștere pentru drojdia *Candida utilis*.

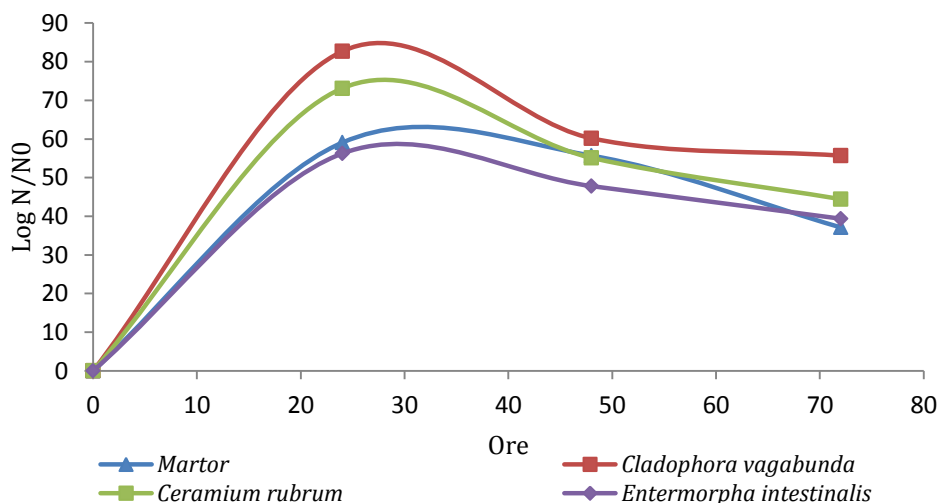


Figura 6.10 Dinamica de înmulțire a drojdiei *Candida utilis*, prin cultivare submersă în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge marine

S-a observat că în probele care au conținut în mediu de cultură alga verde *Cladophora vagabunda* și alga roșie *Ceramium rubrum* s-au înregistrat viteze de înmulțire superioare, comparativ cu proba martor, fapt care explică o potențare a înmulțirii celulelor de drojdie de către compușii bioactivi din biomasa algelor. În intervalul 24-30 ore, în care cultura de drojdie se înmulțește exponențial, probele de medii

suplimentate cu biomasă din alga verde *Cladophora vagabunda* și din alga roșie *Ceramium rubrum* au înregistrat cel mai bun grad de înmulțire, comparativ cu proba martor. Alga verde *Enteromorpha intestinalis* nu a prezentat efect stimulatив asupra procesului de înmulțire a drojdiei *Candida utilis*. Se observă similitudinea rezultatelor cu cele obținute în studiul procesului de înmulțire a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*.

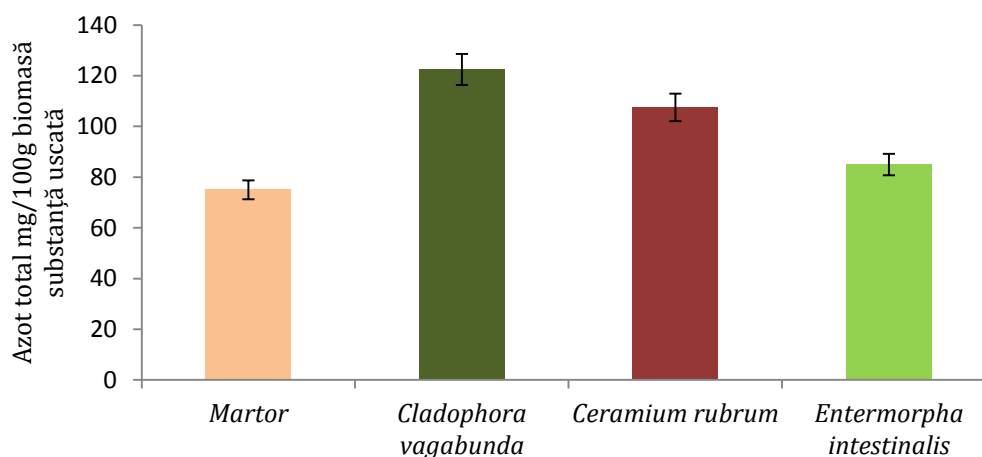


Figura 6.12 Conținutul de azot total acumulat în biomasă drojdiei *Candida utilis*, prin cultivarea submersă în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge marine

În urma analizei conținutului de azot total din compoziția biomasei de drojdiei *Candida utilis*, după 72 de ore de cultivare submersă, se observă din figura 6.12 efectul stimulatив al celor două alge, *Cladophora vagabunda* și *Ceramium rubrum*, care stimulează și înmulțirea celulelor. Aceste rezultate confirmă rolul pozitiv al suplimentării mediului fermentatив cu biomasă liofilizată de alge, asupra creșterii, înmulțirii și biosintezei de metaboliți la drojdia furajeră *Candida utilis*. Acest aspect prezintă importanță deosebită în stimularea producerii de biomasă furajeră, cu valoare nutritivă superioară, care permite obținerea în condiții economice eficiente a unor aditivi furajeri de calitate superioară.

6.3.5 Creșterea drojdiei *Rhodotorula glutinis* și biosinteza de pigmenți carotenoidici în medii îmbogățite cu biomasă de macroalge marine

Si în cazul cultivării submerse a drojdiei *Rhodotorula glutinis*, probele în care mediul de cultură a fost suplimentat cu biomasă liofilizată din macroalge au avut o evoluție superioară, comparativ cu proba martor atât în ceea ce privește înmulțirea drojdiei și formarea de biomasă, cât și în procesul de biosinteză intracelulară a pigmentilor

carotenoidici. Din figura 6.13 se poate observa că în intervalul 24-30 ore de cultivare submersă, biomasa celor trei specii de macroalge a stimulat înmulțirea drojdiei. O dinamică diferită se observă în prezența biomasei de *Enteromorpha intestinalis*, când după 40 de ore de cultivare se observă o regresie a concentrației de celule vii în cultură.

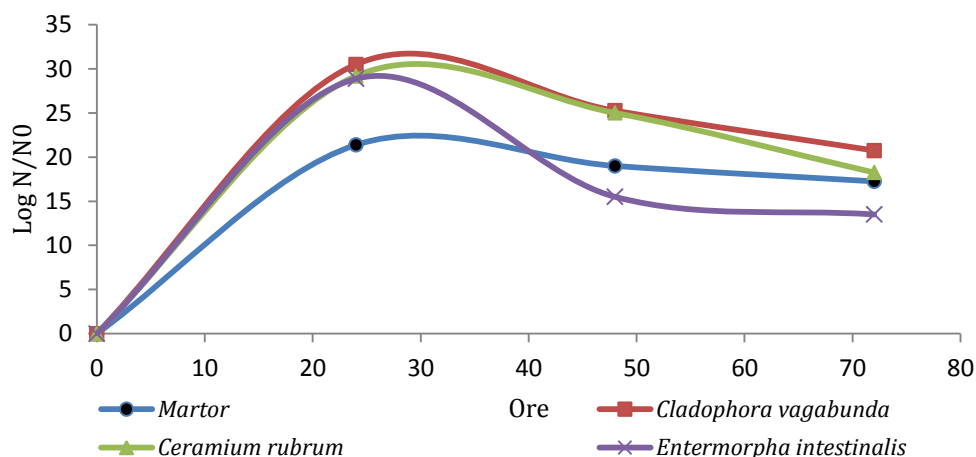


Figura 6.13 Dinamica de înmulțire a drojdiei *Rhodotorula glutinis* prin cultivarea submersă în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge marine

Alga verde *Enteromorpha intestinalis* a indus un comportament similar în cazul speciei *Rhodotorula glutinis*, ca și în cazul celui observat la înmulțirea speciei *Candida utilis*.

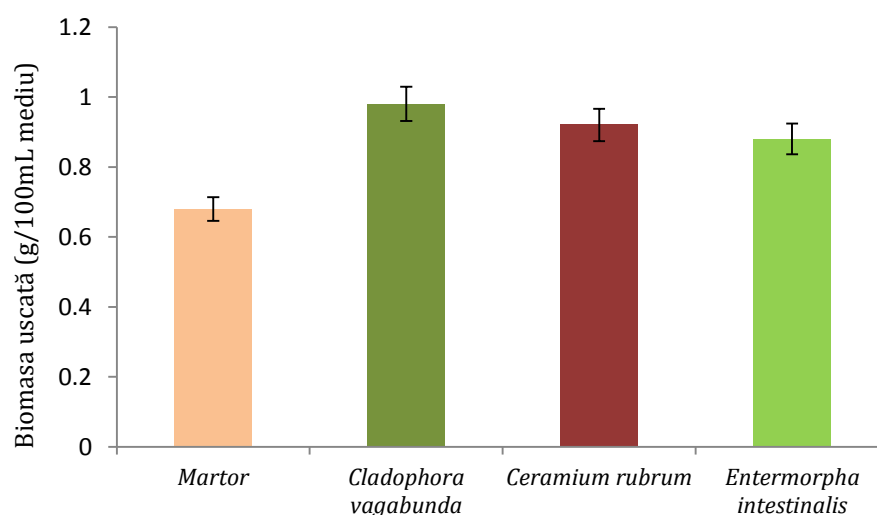


Figura 6.14 Randamentul de biomasă obținut după 72 de ore de cultivarea submersă a drojdiei *Rhodotorula glutinis*, în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge marine

Este evident efectul stimulativ al biomaselor celor trei maroalge în stimularea producerii de biomasă la drojdie *Rhodotorula glutinis*. Specia *Rhodotorula glutinis* este o drojdie care sintetizează intracelular lipide și totodată produce lipaze extracelulare. Efectul stimulativ poate fi explicat și pe seama metabolizării cu eficiență sporită a lipidelor.

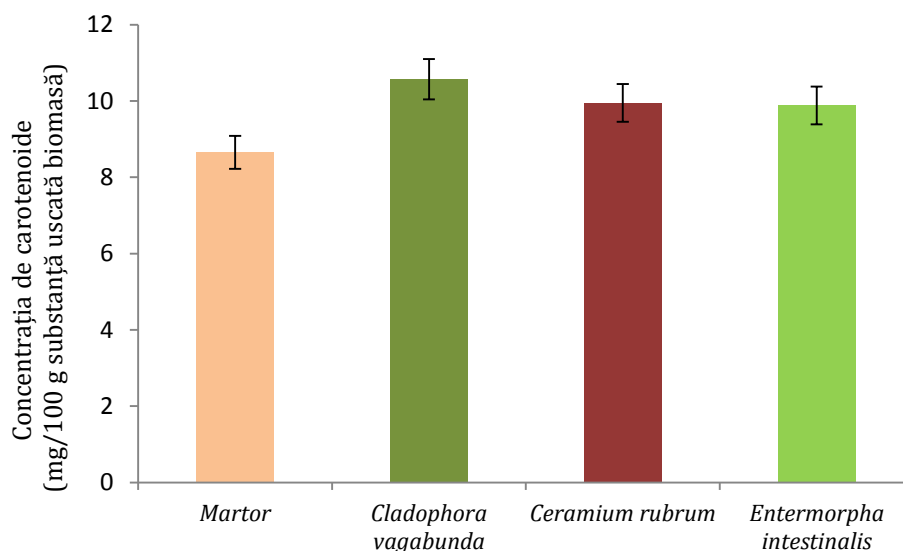


Figura 6.14 Biosinteza de carotenoide la drojdia *Rhodotorula glutinis*, după 72 de ore de cultivarea submersă, în medii suplimentate cu 0,25% biomasă liofilizată de macroalge marine

Specia *Rhodotorula glutinis* este recunoscută ca agent producător de pigmenți carotenoidici (Bhosale și Gardre, 2001). S-a studiat modul în care suplimentarea mediului fermentativ cu 0,25% biomasă liofilizată din cele trei macroalge influențează bioproducerea de pigmenți carotenoidici (figura 6.14). Se observă ca în toate cele trei cazuri, în prezența biomasei algelor, drojdia produce o cantitate mai mare de pigmenți. Corelând aceste rezultate cu cele obținute în studiul înmulțirii drojdiei se poate afirma că efectul este similar.

6.4 Concluzii

- S-a studiat efectul suplimentării mediilor fermentative cu biomasa liofilizată a macroalgelor *Ceramium rubrum*, *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis*, în concentrație de 0,25%, asupra capacității de multiplicare, a viabilității și a potențialului metabolic (fermentația alcoolică, biosinteza de compuși cu azot și pigmenți carotenoidici) al drojdiilor *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* și *Rhodotorula glutinis*.

- Adaosul de biomasă liofilizată de alge, în concentrație de 0,25% stimulează înmulțirea și capacitatea fermentativă a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, comparativ cu proba martor (fără adaos de biomasă). În ceea ce privește gradul de autoliză al celulelor de drojdie *Saccharomyces cerevisiae*, se poate afirma că în prezența biomasei macroalgelor *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis*, celulele sunt mult mai stabile și își mențin viabilitatea un timp mai mare, în condiții restrictive de păstrare, comparativ cu celulele cultivate în medii fără îmbogățire.
- S-a demonstrat creșterea potențialului de biosinteză a compușilor cu azot și a pigmentilor carotenoidici de către drojdiile *Candida utilis* și respectiv *Rhodotorula glutinis*, în medii suplimentate cu biomasă uscată de macroalge, efect indus în special în prezența biomasei algelor *Cladophora vagabunda* și *Ceramium rubrum*.
- Aceste studii oferă noi perspective de cercetare pentru utilizarea biomasei macroalgelor *Ceramium rubrum*, *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis*, ca surse de nutrienți pentru formularea mediilor fermentative, cu efecte economice deosebite și pentru protecția mediului înconjurător.

Capitolul 7. Concluzii generale

- S-a studiat potențialul bioactiv a trei specii diferite de macroalge, speciile *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* (alge verzi) și *Ceramium rubrum* (algă roșie), care cresc frecvent și abundent în Marea Neagră, în vederea separării și caracterizării compușilor chimici cu valoare fiziologică și economică, cu rol de aditivi și ingrediente sau pentru a controla activitatea fiziologică a unor microorganisme, cu impact pozitiv în conservarea alimentelor și în biotehnologie. Pentru extracția compușilor bioactivi s-a utilizat metoda clasică de extracție în mediu apos și în solvenți organici (etanol, metanol, acetonă, hexan) și metoda modernă de microextracție în fază solidă, pentru separarea compușilor volatili. Prin microextracție în fază solidă s-a demonstrat faptul că algele marine studiate acumulează intracelular cantități importante de compuși volatili, cu o largă diversitate structurală și compozițională.
- S-a demonstrat că algele marine studiate sintetizează și acumulează în biomasă concentrații importante de compuși polifenolici, care se extrag ușor în mediu apos,

și în solvenți organici. Condițiile optime de extracție și în special solventul utilizat și concentrația acestuia variază în funcție de specie și particularitățile structurale ale biomasi algelor. Cantități importante de polifenoli se extrag în apă. Cele mai mari randamente de extracție s-au obținut prin extracția cu 70% etanol, în cazul speciilor *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* și 70% acetonă, în cazul algei *Cladophora vagabunda*.

- Profilul polifenolilor din extracte demonstrează conținutul în compuși cu valoare biologică, recunoscuți pentru activitatea antioxidantă, și anume: *acid protocatehic*; *3,4-dihidroxibenzaldehidă*; *acid p-dihidroxibenzoic*; *2,3-acid dihidroxibenzoic*; *acid clorogenic*; *acid vanilic*; *acid cafeic*; *p-hidroxibenzaldehidă*; *vanilină*; *acid p-cumaric*; *acid salicilic*.
- S-a demonstrat că biomasa celor trei macroalge studiate este bogată în flavonoide, în ordinea descrescătoare *Ceramium rubrum* (alga roșie), urmată de algele verzi *Cladophora vagabunda* și *Enteromorpha intestinalis*. Metanolul (soluție 70%) s-a dovedit a fi cel mai eficient solvent pentru extracția flavonoidelor din biomasa algelor.
- Biomasa celor trei macroalge studiate conține cantități importante de compuși carotenoidici. Astfel, cele mai mari concentrații de carotenoide au fost evidențiate în extractele din biomasa algei roșii *Ceramium rubrum*, în concentrații similare cu cele întâlnite în plantele bogate în acești pigmenți.
- Referitor la conținutul de clorofile (totală, colorofilă *a* și clorofilă *b*) acumulate în biomasa celor trei specii de macroalge marine, s-a demonstrat că cea mai mare concentrație de clorofilă totală, 3,37 mg/g biomasa uscată, conține alga verde *Eteromorpha intestinalis*, iar cea mai redusă, 0,87 mg/g biomasă uscată, alga roșie *Ceramium rubrum*.
- Pentru a determina grupările funcționale ale compușilor organici din compoziția biomasei s-a realizat analiza FTIR a extractelor obținute în diferiți solvenți și s-a confirmat abundența, în compoziția biomasei, a compușilor cu potențial bioactiv, prin analogia dintre grupările funcționale identificate și structura acestora.
- Corelat cu compoziția chimică a biomasei s-a studiat activitatea antioxidantă a extractelor. Cea mai mare activitate antioxidantă s-a evidențiat în extractele în apă obținute din alga verde *Enteromorpha intestinalis*. Pentru toate speciile de alge,

extractele obținute în apă au avut o activitate antioxidantă mai mare, comparativ cu extractele în etanol, metanol, acetonă și hexan.

- Algele studiate sintetizează cantități importante de compuși volatili, dintre care importanță practică prezintă în principal hexanalul, o-cimen, furanona *a* și furanona *b*. Extracția și separarea acestor compuși prezintă importanță pentru industria aromelor și industria cosmetică.
- A fost identificat profilul mineral al biomasei algelor studiate. Rezultatele confirmă prezența în concentrații mari a microelementelor Ca și Fe, dar și de K, Sr și Rb. Dintre cele trei specii de alge marine, biomasa algei verzi *Cladophora vagabunda* este cea mai bogată în minerale. Nu au fost evidențiate metale toxice, pe care algele le pot prelua din mediul acvatic prin biosorbție.
- Speciile *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* sunt surse importante de acizi grași, dintre care cei mai importanți sunt acidul palmitic (C16:0) în concentrații de 20-24% (din totalul acizilor grași identificați), evidențiat în principal în lipidele din alga verde *Cladophora vagabunda* (24,6% din cantitatea totală de acizi grași identificați), acidul oleic (C18:1n-9) între 10-13%, acidul miristic (C14:0) între 6-10% și acidul arahidonic (C20:4n-6) între 14-23%.
- Compoziția în acizi grași este corelată cu potențialul antimicrobian al hidrolizatelor din lipide din alge, cu eficiență asupra bacteriilor test studiate *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* și *Escherichia coli*. Extractul lipidic din alga roșie *Ceramium rubrum* s-a dovedit a avea activitatea antimicrobiană cea mai mare, cu efect bacteriostatic, în concentrație de 1,75 mg mL⁻¹ și efect bactericid, în concentrație de 3,75 mg mL⁻¹, asupra majorității bacteriilor studiate.
- Adaosul de biomasă liofilizată de alge, în concentrație de 0,25 %, în mediul de cultură stimulează înmulțirea și capacitatea fermentativă a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*. Cel mai pregnant efect de stimulare îl induce biomasă algei verzi *Enteromorpha intestinalis* pentru drojdia *Sacharomyces cerevisiae*, iar pentru *Candida utilis* și *Rhodotorula glutinis* efectul cel mai pregnant este indus de către biomasă algei verzi *Cladophora vagabunda*. Totodată celulele de drojdie, specia *Saccharomyces cerevisiae*, crescute în medii suplimentate cu biomasă algelor *Ceramium rubrum* și *Enteromorpha intestinalis* s-au dovedit a fi mai stabile față de autoliză, comparativ cu martorul (mediu fermentativ nesuplimentat).

- În cazul în care drojdiile au fost cultivate în medii suplimentate cu 0,25 % biomasă liofilizată a algelor marine, s-au evidențiat potențări ale înmulțirii celulelor drojdiilor din speciile *Candida utilis* și *Rhodotorula glutinis*, corelate cu creșterea randamentului de acumulare a biomasei și biosinteza intracelulară a compușilor cu azot și respectiv a pigmentilor carotenoidici.
- Toate aceste studii confirmă lipsa toxicității algelor studiate și potențialul acestora pentru a fi valorificate ca resurse de hrană, pentru obținerea de energie neconvențională și a numeroși aditivi și ingrediente cu valoare economică.
- Prin conținutul important de compuși bioactivi, din cele mai importante categorii cu potențial fiziologic, macroalgele *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* reprezintă resurse importante ce pot fi complex valorificate în folosul omenirii, pentru obținerea de produse cu valoare economică și pentru creșterea calității vieții.
- Utilizarea acestor bioresurse reprezintă o alternativă valoroasă, deoarece macroalgele *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* cresc abundent în condiții naturale de mediu, iar valorificarea lor superioară are impact pozitiv și asupra calității mediului și a echilibrului în ecosistemele naturale.

8. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective

Originalitatea cercetărilor efectuate, în conformitate cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, se concretizează printr-o serie de elemente de noutate, care sporesc valoarea științifică a studiilor realizate. În baza rezultatelor experimentale originale obișnuite în teză se pot evidenția o serie de contribuții științifice și aplicative, dintre care pot fi amintite în principal următoarele:

- S-au studiat în premieră în România trei specii de macroalge marine, care cresc abundent în Marea Neagră, speciile *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum*, ca surse de compuși bioactivi, în vederea predicției potențialului fiziologic *in vitro* și *in vivo*.
- S-a caracterizat compoziția chimică a biomasei algelor studiate, vizând în principal compușii bioactivi, polifenoli, carotenoide, clorofile, lipide, acizi grași, compuși volatili și microelemente, utilizând metode moderne de investigare (microextracție în fază solidă, cromatografie HPLC, gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, analiza FTIR și analiza XRF).
- S-a demonstrat potențialul bioactiv al extractelor din biomasa macroalgelor *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum* prin evaluarea activității antioxidante și a potențialului antibacterian asupra unor bacterii cu incidență în microbiologia alimentelor și pentru siguranța alimentară, speciile *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* și *Escherichia coli*. Aceste date au valoare de cercetare fundamentală și aplicativă întrucât sunt de asemenea în premieră abordate.
- S-a demonstrat rolul benefic al biomasei macroalgelor *Cladophora vagabunda*, *Enteromorpha intestinalis* și *Ceramium rubrum*, în stimularea activității metabolice și a viabilității culturilor de drojdii cu implicații în biotehnologie, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* și *Rhodotorula glutinis*. Aceste studii demonstrează lipsa toxicității și posibilitatea de formulare a unor medii fermentative utilizând biomasa algelor ca surse de nutrienți. Această nouă viziune are implicații practice deosebite în reducerea costurilor cu mediile de cultură, uneori excesive în biotehnologie, în paralel, depoluarea mediului înconjurător prin valorificarea superioară a macroalgelor care cresc abundent vara în Marea Neagră și poluează excesiv zona litoralului.

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

A. Articole publicate în reviste cotate ISI

- **Horincar, V.**, Parfene, G., Gottardi, D., Tyagi, A.K., Guerzoni, M.E., Dinică, R., Bahrim, G. (2012). Fatty acid and volatile profile of three green and red seaweeds from Romanian Black Sea in response to antibacterial activity. În recenzie la *Journal of Applied Phycology* (Factor de impact 2,441)
- **Horincar, V.**, Parfene, G., Bahrim, G. (2011). Evaluation of bioactive compounds in extracts obtained from three romanian marine algae species, *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6), 71- 78 (Factor de impact 0,219)

B. Articol publicat în revistă indexată în baza de date internaționale

- **Horincar, V.**, Parfene, G., Bahrim, G. (2011). Antioxidant activity of romanian marine algae extracts, *Annals of „Dunărea de Jos” University of Galați*, 35(2), 319-324 (revistă indexată în baza de date Scopus).

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

- **Vicentiu-Bogdan Horincar**, Georgiana Parfene, Gabriela Bahrim (2012). Study on the physiological effect of bioactive compounds from seaweed upon *Saccharomyces cerevisiae* growth and fermentation abilities, *Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences*, May 24th – 27th, 2012, Brasov, Romania.
- **Vicentiu-Bogdan Horincar**, Georgiana Parfene, Rodica Dinica, Gabriela Bahrim (2011). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from three romanian marine algae species, “*Environmental Capacity Building*” (ECB 2011) 11-13 November 2011, National Library – Bucharest, Romania.