

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Chemii

# **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**mgr Joanna Fabrowska**

**Metody izolacji i analiza związków bioaktywnych  
z wybranych gatunków zielenic słodkowodnych**

**Methods of isolation and analysis of bioactive  
compounds from selected freshwater green algae species**

W formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych  
w czasopismach naukowych

Promotor: prof. UAM dr hab. Bogusława Łęska

Poznań 2017



*Pragnę serdecznie podziękować mojej promotor prof. UAM dr hab. Bogusławie Łęskiej  
Za pięć lat wspaniałej współpracy, poświęcony mi czas, wszechstronną pomoc,  
Ale przede wszystkim za ogromną życzliwość i rodzinną atmosferę w pracy.  
Dziękuję z całego serca! Była Pani dla mnie nie tylko przewodnikiem po naukowym świecie,  
Ale również zastępczą mamą, która zawsze służyła radą, kawałkiem ciasta i kubkiem herbaty.*



*Wielkie podziękowania należą się również mojemu narzeczonemu, Adrianowi.*

*Za wszystko. Przede wszystkim za miłość, którą mnie obdarzył.*

*Ale również za cierpliwość, pomoc i informatyczne porady.*

*Bez Ciebie moja praca i publikacje pewnie by nie ujrzały światła dziennego,*

*A liczne pliki poginęłyby dawno w komputerowych przestworzach.*

*Dziękuję Ci za Twoje wsparcie i dobre serce!*



*Niniejszą pracę dedykuję swoim Kochanym Rodzicom.  
Dziękuję za Waszą miłość, cierpliwość i to, że zawsze we mnie wierzyliście.  
Dziękuję Wam za cały trud włożony w moje wychowanie.  
To dzięki Wam dotarłam tu, gdzie jestem.*

## Metody izolacji i analiza związków bioaktywnych z wybranych gatunków zielenic słodkowodnych

Podstawę niniejszej dysertacji stanowią następujące publikacje:

- Załącznik I Messyasz B., Łęska B., Fabrowska J., Pikosz M., Rój E., Cieślak A., Schroeder G., Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the cosmetic industry, *Open Chemistry* 13 (2015) 1108–1118 (IF = 1,272; punkty MNiSW = 14).
- Załącznik II Fabrowska J., Ibañez E., Łęska B. Herrero M., Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae, *Algal Research* 19 (2016) 237–245 (IF = 5,303; punkty MNiSW = 40).
- Załącznik III Pankiewicz R., Łęska B., Messyasz B., Fabrowska J., Sołoducha M., Pikosz M., First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae, *Algal Research* 19 (2016) 348–354 (IF = 5,303; punkty MNiSW = 40).
- Załącznik IV Fabrowska J., Kapuścińska A., Łęska B., Feliksik-Skrobich K., Nowak I., *In vivo* studies and stability study of *Cladophora glomerata* extract as a cosmetic active ingredient, *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research* 74 (2) (2017) 633-641 (IF = 0,96; punkty MNiSW = 15).
- Załącznik V Fabrowska J., Łęska B., Schroeder G., Słodkowodna *Cladophora glomerata* jako nowy potencjalny surowiec kosmetyczny, *Chemik* 69 (8) (2015) 491–497 (IF = 0; punkty MNiSW = 8).
- Załącznik VI Fabrowska J., Łęska B., Ulvany – biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy izolowane z zielenic, w: *Rośliny – przegląd wybranych zagadnień*, Kropiwiec K., Szala M. (red.), Wydawnictwo Naukowe Tygiel, Lublin, 2016, s. 204-220, ISBN 978-83-65598-13-4.

Sumaryczny współczynnik IF: 12,838

Suma punktów MNiSW: 117

# Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy .....	11
1. Wstęp.....	13
2. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim .....	15
3. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim.....	19
4. Opis teoretyczny .....	23
4.1. Charakterystyka badanych zielenic słodkowodnych .....	23
4.2. Metody izolacji związków bioaktywnych z glonów .....	28
4.2.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta .....	30
4.2.2. Ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym.....	32
4.2.3. Ekstrakcja enzymatyczna .....	35
4.2.4. Ekstrakcja poprzez mineralizację mikrofalową .....	37
4.3. Związki bioaktywne w glonach.....	39
4.3.1. Kwasy tłuszczowe.....	39
4.3.2. Karotenoidy .....	41
4.3.3. Siarczanowe polisacharydy.....	44
4.3.4. Polifenole .....	46
4.3.5. Makroelementy i mikroelementy .....	48
4.4. Zastosowanie ekstraktów z zielenic słodkowodnych w kosmetyce .....	49
4.5. Literatura.....	53
5. Podsumowanie .....	61
6. Dorobek naukowy.....	63
6.1. Życiorys naukowy .....	63
6.2. Lista publikacji .....	65
6.3. Konferencje naukowe .....	68
7. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej .....	74
Załącznik I .....	74
Załącznik II.....	86
Załącznik III.....	96
Załącznik IV.....	104
Załącznik V .....	114
Załącznik VI.....	120



## Wykaz skrótów stosowanych w pracy

DAD – detektor z matrycą diodową (ang. *Diode Array Detector*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy ( ang. *Deoxyribonucleic Acid*)

EAE – ekstrakcja z hydrolizą enzymatyczną (ang. *Enzyme Assisted Extraction*)

FT-IR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GC - chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*)

$^1\text{H}$  NMR - magnetyczny rezonans jąder  $^1\text{H}$  (ang. *Proton Nuclear Magnetic Resonance*)

HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-DAD-MS - wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem z matrycą diodową sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector coupled with Mass Spectrometry*)

ICP-OES - optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w indukcyjnie sprzężonej plazmie (ang. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

MS – spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry*)

NNKT - niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *EFA - Essential Fatty Acids*)

O/W – emulsja typu olej w wodzie (ang. *Oil in Water*)

$p_k$  – ciśnienie krytyczne

SC-CO<sub>2</sub> - dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym (ang. *Supercritical CO<sub>2</sub>*)

SFE – ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (ang. *Supercritical Fluid Extraction*)

SPs - siarczanowe polisacharydy (ang. *Sulfated Polysaccharides*)

TEAC – pojemność antyoksydacyjna w przeliczeniu na równoważniki troloksu (ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

TEWL - przeznaskórkowa utrata wody (ang. *Transepidermal Water Loss*)

$T_k$  – temperatura krytyczna

UV-VIS – nadfiolet i obszar widzialny (ang. *Ultraviolet-Visible*)



# 1. Wstęp

Związki biologicznie czynne są substancjami, które wykazują określone działanie, np.: wzmacniające, osłabiające lub modyfikujące, na funkcje fizjologiczne i metaboliczne organizmu. Wyróżnia się wiele rodzajów aktywności biologicznej, m.in.: antyoksydacyjną, przeciwzapalną, immunostymulującą, czy antyproliferacyjną. Świat substancji bioaktywnych jest bardzo bogaty i obejmuje różnorodne grupy związków chemicznych, takich jak: kwasy tłuszczowe, związki fenolowe, karotenoidy, sacharydy, białka, terpeny, garbniki, alkaloidy i wiele innych, które są produkowane wskutek naturalnych procesów w roślinach, jako ich metabolity, czyli organiczne i nieorganiczne produkty przemian chemicznych zachodzących w komórkach. Ekstrakty roślinne od wieków są chętnie wykorzystywane przez ludzkość w medycynie, farmacji, przemyśle kosmetycznym, czy też spożywczym.

Naturalnym źródłem związków bioaktywnych są również glony. Morskie gatunki alg są znanym i cenionym surowcem zawierającym karotenoidy, kwasy tłuszczowe, polisacharydy, aminokwasy, tokoferole, flawonoidy i inne substancje o aktywności biologicznej, wobec czego znajdują one zastosowanie jako składniki kosmetyków, leków, suplementów diety i żywności. Natomiast skład chemiczny glonów słodkowodnych jest dotychczas bardzo słabo poznany, o czym dowodzi niewielka liczba artykułów naukowych na ten temat. Dlatego też w niniejszej pracy doktorskiej zostały postawione pytania: czy biomasa glonów słodkowodnych może stanowić potencjalny nowy surowiec, bogaty w związki biologicznie czynne? Jakie substancje bioaktywne są zawarte w makroglonach słodkowodnych? Która metoda ekstrakcji jest najlepsza do izolacji określonych substancji?

Nadrzędnym celem pracy było opracowanie i optymalizacja metod izolacji dobranych do konkretnych grup związków bioaktywnych zawartych w zielenicach. Badane w pracy gatunki słodkowodnych makrozielenic występują masowo w wodach śródlądowych na terenie Polski. Brak koncepcji wykorzystywania ich biomasy stanowił punkt wyjścia do rozpoczęcia badań nad zawartością substancji bioaktywnych w tych glonach. Poznanie składu chemicznego wyselekcjonowanych gatunków makrozielenic stwarza możliwość efektywnego zagospodarowania do celów przemysłowych tych surowców, powstających w dużych ilościach w zbiornikach wodnych.

Badania podjęte w pracy doktorskiej miały na celu wykazanie, że biomasa wybranych słodkowodnych makroglonów może stanowić nowy surowiec, bogaty w różnorodne związki biologicznie czynne. Analiza składu chemicznego niezbadanych dotychczas gatunków glonów słodkowodnych, a także właściwości antyoksydacyjnych i kosmetycznych uzyskanych z nich ekstraktów, może przyczynić się do odkrycia nowych naturalnych surowców, które mają szansę zostać wykorzystane w przyszłości np. w przemyśle kosmetycznym.



## 2. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim

W prezentowanej rozprawie doktorskiej przedstawiono podsumowanie wyników badań prowadzonych w ramach studium doktoranckiego w okresie od 2013 do 2017 roku. Wyniki zostały zaprezentowane w formie czterech oryginalnych artykułów naukowych [Załączniki I-IV]. W skład dysertacji wchodzi również jeden artykuł przeglądowy [Załącznik V] oraz jeden rozdział monografii naukowej [Załącznik VI].

Biomasa glonów morskich jest naturalnym surowcem, bogatym w różnorodne związki biologicznie czynne, dzięki czemu jest z powodzeniem wykorzystywana w wielu gałęziach przemysłu, m.in.: kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Natomiast w danych literaturowych trudno znaleźć informacje o składzie chemicznym glonów słodkowodnych, co świadczy o tym, że ich właściwości są dotychczas słabo poznane [Załączniki V i VI]. Większość badań dotyczących glonów koncentruje się bowiem na charakterystyce substancji bioaktywnych w algach morskich. Według danych z bazy Web of Science z dnia 01.06.2017 r. istnieją tylko 3 publikacje zawierające słowa kluczowe: „słodkowodne makroglony”, „związki bioaktywne”, podczas gdy analogicznych artykułów na temat glonów morskich jest aż 358. Obiektem badań prowadzonych w trakcie studiów doktoranckich były trzy gatunki słodkowodnych makrozielenic: *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* i *Chara fragilis*. Glony te występują masowo w wodach śródlądowych w Polsce, stanowiąc tym samym zbędny balast w zbiornikach wykorzystywanych rekreacyjnie. Biomasa badanych glonów nie znalazła dotychczas zastosowania praktycznego w przemyśle, jak również była w znikomym stopniu przebadana w zakresie zawartości substancji czynnych. A zatem punktem wyjścia do zapoczątkowania eksperymentów zrealizowanych w ramach przedstawionej pracy doktorskiej był zarówno brak wyników badań nad składem chemicznym słodkowodnych zielenic, jak i zagospodarowania tych naturalnych surowców.

Celem podjętych eksperymentów była izolacja, analiza jakościowa i ilościowa związków biologicznie czynnych w glonach słodkowodnych, jak również określenie właściwości antyoksydacyjnych oraz kosmetycznych otrzymanych z nich ekstraktów. Najistotniejszym etapem badań było opracowanie skutecznych i wydajnych metod izolacji substancji bioaktywnych z glonów. W tym celu wykorzystywane były różne techniki, tj. ekstrakcja: klasyczna w aparacie Soxhleta, dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (SFE; ang. *Supercritical Fluid Extraction*), z hydrolizą enzymatyczną (EAE; ang. *Enzyme Assisted Extraction*), a także ekstrakcja poprzez mineralizację mikrofalową. Zastosowanie różnych metod ekstrakcji miało na celu wyselekcjonowanie i dobór najbardziej wydajnej techniki do izolacji odpowiednich substancji biologicznie czynnych. Ekstrakcja SFE okazała się być najbardziej wydajną metodą w przypadku

izolacji kwasów tłuszczowych z badanych glonów [Załącznik I]. Natomiast zoptymalizowana metoda SFE z wykorzystaniem etanolu jako modyfikatora pozwoliła na otrzymanie wyciągów o wysokiej zawartości karotenoidów i związków polifenolowych (polifenoli), charakteryzujących się silną aktywnością antyoksydacyjną [Załącznik II]. Klasyczna ekstrakcja gorącą wodą połączona z hydrolizą enzymatyczną umożliwiła wydajną izolację siarczanowych polisacharydów [Załącznik III]. Z kolei ekstrakcja poprzez mineralizację na mokro w piecu mikrofalowym została wykorzystana do analizy pierwiastkowej biomasy glonów [Załącznik I].

Analiza wybranych związków bioaktywnych w biomacie glonów słodkowodnych z wykorzystaniem różnych metod badawczych stanowiła kolejny cel naukowy niniejszej pracy doktorskiej. Przeprowadzone zostały oznaczenia takich substancji biologicznie czynnych jak: kwasy tłuszczowe, karotenoidy, siarczanowe polisacharydy, związki fenolowe, z uwzględnieniem analizy jakościowej i ilościowej. W zależności od rodzaju badanych związków wykorzystywane były różne metody analityczne: spektrofotometria UV-VIS, chromatografia gazowa (GC), wysokosprawna chromatografia ciekowa z detekcją UV-VIS sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-DAD-MS), analiza elementarna, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  NMR) oraz spektroskopia w podczerwieni (FT-IR). Dodatkowo zbadany został skład makro- i mikroelementów w biomacie glonów za pomocą techniki optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w indukcyjnie sprzężonej plazmie (ICP-OES). Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na bogaty skład substancji czynnych w badanych zielenicach. Przykładowo, w gatunku *C. glomerata* wykryto liczne kwasy tłuszczowe nasycone i nienasycone, m.in. unikalny kwas palmityno-oleinowy [Załącznik I]. Z kolei zielenica *C. fragilis* charakteryzowała się szczególnie dużą ilością polifenoli i karotenoidów, w tym fukoksantyny i luteiny, które są silnymi antyoksydantami [Załącznik II]. Ponadto w *C. glomerata* i *U. flexuosa* po raz pierwszy wykryto obecność siarczanowych polisacharydów typu ulwanów [Załącznik III]. Biomasa *C. glomerata* okazała się być źródłem licznych makro- i mikroelementów, w szczególności zawierała duże ilości wapnia, potasu i magnezu [Załącznik I]. Warto podkreślić, że większość z opisanych w pracy związków została wykryta po raz pierwszy w badanych gatunkach słodkowodnych makrozielenic.

Wykazanie, że ekstrakty z wyselekcjonowanych makroglonów słodkowodnych mogą stanowić nowy surowiec dla przemysłu kosmetycznego, to ostatni cel pracy. Aby to udowodnić przeprowadzona została analiza właściwości antyoksydacyjnych w warunkach *in vitro* wybranych wyciągów glonowych za pomocą metody TEAC (ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Okazało się, że ekstrakty z gatunku *U. flexuosa* cechowały się największym potencjałem przeciwutleniającym [Załącznik II]. Ostatni etap pracy dotyczył badań *in vivo* preparatów kosmetycznych z dodatkiem wybranych ekstraktów. Badaniu poddano emulsję kosmetyczną typu O/W (olej w wodzie) zawierającą ekstrakt z *C. glomerata*. Określono wpływ tego wyciągu

na zmiany stopnia nawilżenia oraz elastyczności skóry, a także na stabilność produktów kosmetycznych. Po czterech tygodniach aplikacji badanego kremu wyraźnie wzrosło nawilżenie, jak i elastyczność skóry, w porównaniu do placebo. Dodatkowo badania wykazały, że obecność wyciągu nie wpłynęła na zmianę stabilności emulsji kosmetycznej [**Załącznik IV**]. W ten sposób wykazano właściwości użytkowe badanych ekstraktów glonowych jako nowych surowców kosmetycznych.

Realizacja założonych celów posłużyła opracowaniu odpowiednich metod izolacji substancji bioaktywnych z niezbadanych dotychczas gatunków glonów słodkowodnych, a także poznaniu ich składu chemicznego, właściwości antyoksydacyjnych i kosmetycznych. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej mogą więc pozwolić na wypromowanie nowych, naturalnych surowców, które można w przyszłości wykorzystać jako składniki kosmetyków, czy żywności. Przedstawione badania były częściowo realizowane w ramach grantu NCBiR: PBS1/A1/2/2012 pt. "Innowacyjna technologia ekstraktów glonowych - komponentów nawozów, pasz i kosmetyków"; cz. 4: "Ocena właściwości użytkowych ekstraktów glonowych jako składników kosmetyków" (kierownik zadania: prof. dr hab. Grzegorz Schroeder; koordynator: Politechnika Wrocławska, lider: prof. dr hab. Katarzyna Chojnacka; realizacja w latach 2012-2015) oraz grantu NCN: 2014/13/B/NZ8/04690, pt. „Fizykochemiczne i biologiczne przyczyny ekologicznej dominacji zielenic nitkowatych w wodach śródlądowych” (kierownik zadania: prof. UAM dr hab. Bogusława Łęska; realizacja w latach 2015-2018). Testy aplikacyjne z udziałem ochotników zostały wykonane w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr uchwały: 649/16). Treść uchwały znajduje się na stronie 52 pracy.



### 3. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim

In the presented doctoral dissertation a summary of the results of the research conducted in the period from 2013 to 2017, as part of a PhD study, is featured. The results are presented in the form of four original scientific articles [**Appendices I-IV**]. The dissertation also includes one review article [**Appendix V**] and one chapter of scientific monograph [**Appendix VI**].

Biomass of marine algae is a natural raw material, rich in various bioactive compounds, hence, it is successfully used in many industries, e.g.: cosmetic, pharmaceutical and food industry. On the other hand, it is difficult to find information in the literature about chemical composition of freshwater algae, which indicates that their properties have been poorly scrutinized so far [**Appendices V and VI**]. The majority of study concerning algae focus on the characteristics of bioactive substances in marine algae. According to the data from Web of Science database of 01.06.2017 there are only 3 publications containing keywords: "freshwater macroalgae", "bioactive compounds", while there are as many as 358 analogical articles about marine algae. The object of the research conducted during the PhD study were three freshwater green macroalgae species: *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis*. These algae occur in large quantities in inland waters in Poland, thus they constitute unnecessary ballast in recreational waters. The biomass of the studied algae has not found any practical application in the industry yet, as well as it has been negligibly examined in the terms of the content of bioactive substances. Thus, the starting point for the experiments carried out within the scope of the present doctoral thesis was both the lack of research results on the chemical composition of freshwater green algae and the lack of utilization of these natural raw materials.

The aim of the undertaken experiments was isolation, qualitative and quantitative analysis of biologically active compounds in freshwater algae, as well as determination of antioxidant and cosmetic properties of obtained extracts. The most important step in the research was to develop effective and efficient methods for the isolation of bioactive substances from algae. For this purpose, different techniques were used, i.e. extraction: classical in Soxhlet apparatus, with supercritical carbon dioxide (SFE; *Supercritical Fluid Extraction*), with enzymatic hydrolysis (EAE; *Enzyme Assisted Extraction*), as well as extraction by microwave mineralization. The application of diverse extraction methods was aimed to select and choose the most effective technique for the isolation of proper biologically active compounds. SFE extraction turned out to be the most efficient method in the case of fatty acids isolation from the studied algae [**Appendix I**]. Whereas the optimized SFE method using ethanol as a modifier let to obtain extracts with high carotenoids and polyphenolic compounds (polyphenols)

content, characterized by high antioxidant activity [**Appendix II**]. Classical hot water extraction combined with enzymatic hydrolysis let for efficient isolation of sulfated polysaccharides [**Appendix III**]. On the other hand, the extraction by wet mineralization in a microwave oven was used for elements analysis of algae biomass [**Appendix I**].

The analysis of selected bioactive compounds in the biomass of freshwater algae using different research methods was another scientific objective of this doctoral dissertation. There were conducted determinations of such biologically active substances as: fatty acids, carotenoids, sulfated polysaccharides, phenolic compounds, taking into account qualitative and quantitative analysis. Depending on the type of investigated compounds, different analytical methods were used: UV-VIS spectrophotometry, gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography with UV-VIS detection coupled with mass spectrometry (HPLC-DAD-MS), elemental analysis, nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR) and infrared spectroscopy (FT-IR). Additionally the composition of macro- and micronutrients was investigated in algae biomass using the technique of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The results of performed analysis show a rich composition of active substances in the tested green algae. For example, many types of saturated and unsaturated fatty acids were found in *C. glomerata* species, e.g. unique palmitoleic acid [**Appendix I**]. Afterwards, the green alga *C. fragilis* was characterized by a particularly high amounts of polyphenols and carotenoids, including fucoxanthin and lutein which are strong antioxidants [**Appendix II**]. Moreover, the presence of sulfated polysaccharides of the ulvan type was detected in *C. glomerata* and *U. flexuosa* for the first time [**Appendix III**]. The biomass of *C. glomerata* turned out to be a source of numerous macro- and micronutrients, in particular it contained large amounts of calcium, potassium and magnesium [**Appendix I**]. It is worth emphasizing that most of the compounds described in the thesis were detected for the first time in the studied freshwater green macroalgae species.

The demonstration that extracts of selected freshwater macroalgae can be a new raw material for the cosmetic industry is the final goal of the thesis. To prove this, *in vitro* analysis of antioxidant properties of selected algae extracts was performed using the TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) method. It turned out that the extracts from *U. flexuosa* species were characterized by the highest antioxidant potential [**Appendix II**]. The last stage of research involved *in vivo* studies of cosmetic formulas with the addition of selected extracts. An O/W (oil in water) emulsion type containing *C. glomerata* extract was put to the test. The effect of this extract on the changes in skin hydration and elasticity as well as on the stability of cosmetic products was determined. After four weeks of the tested cream application, skin hydration significantly increased, so did skin elasticity, compared to placebo. In addition, the studies showed that the presence of the extract did not influence

the change of the cosmetic emulsion stability [**Appendix IV**]. In this way, the usable properties of algae extracts as new cosmetic raw materials have been demonstrated.

The realization of the goals was used to develop appropriate isolation methods of bioactive substances from unexplored till now freshwater algae, as well as to get to know their chemical composition, antioxidant and cosmetic properties. Thus, research conducted in the framework of the doctoral dissertation may allow the promotion of new natural raw materials which can be used in the future as ingredients of cosmetics or food. The presented studies were partially implemented within the grant NCBiR: PBS1/A1/2/2012 entitled: "Innovative technology of algae extracts - fertilizer, feed and cosmetic ingredients"; part 4: "Assessment of the properties of algae extracts as components of cosmetics" (task leader: Prof. Grzegorz Schroeder, coordinator: Wrocław University of Technology, leader: Prof. Katarzyna Chojnacka, implementation in 2012-2015) and the grant NCN: 2014/13/B/NZ8/04690, entitled: "Physicochemical and biological causes of ecological dominance of filamentous green algae in freshwater ecosystems" (task leader: Prof. UAM dr hab. Bogusława Łęska, realization in 2015-2018). Application tests with the participation of volunteers were performed on the basis of the consent of the Bioethics Committee of the Karol Marcinkowski Medical University in Poznań (resolution no: 649/16). The content of the resolution is on the page 52 of the thesis.



## 4. Opis teoretyczny

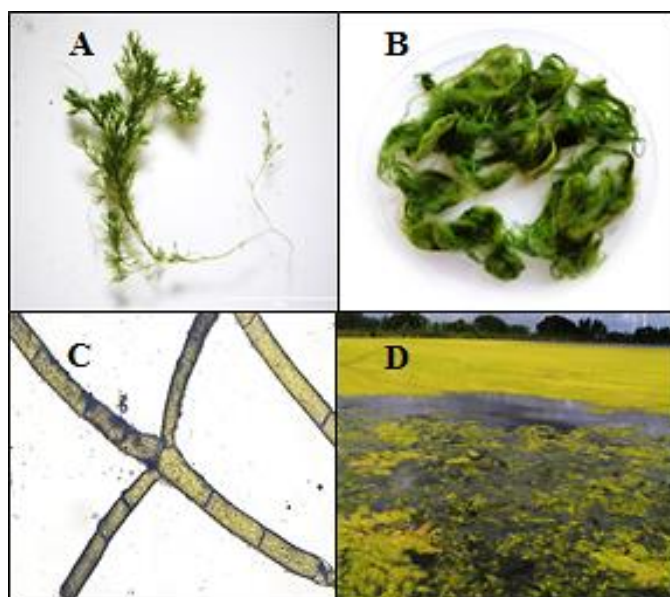
### 4.1. Charakterystyka badanych zielenic słodkowodnych

Głony, algi (łac. *Algae*) to określenie ekologiczne grupy plechowatych, samożywnych organizmów żyjących w środowiskach wodnych i miejscach wilgotnych. Cechami wspólnymi dla tych organizmów jest obecność chlorofilu, jednokomórkowa lub plechowa budowa ciała oraz wodny tryb życia [1]. W ujęciu taksonomicznym wyróżnia się 11 gromad glonów: Cyanophyta, Prochlorophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta i Chlorophyta [2]. Głony z grupy zielenic (*Chlorophyta*) charakteryzują się wysoką zawartością chlorofilu *a* i *b*, natomiast ich substancją zapasową jest głównie skrobia [3]. Zielenice występują powszechnie w wodach słodkich, jak również słonych. Według Lewisa i McCourta zielenice dzielone są na dwie równorzędne gromady: Chlorophyta i Charophyta [4].

*Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (gałęzotka kłębiasta) jest makroglonem należącym do gromady zielenic nitkowatych (Chlorophyta, Ulvophyceae), charakteryzujących się silnie rozgałęzionymi plechami (Rys. 1) [5]. Zielenice z rodzaju *Cladophora* bytują zarówno w środowiskach słodkowodnych, jak i morskich. *C. glomerata* jest gatunkiem kosmopolitycznym, występującym masowo w wodach śródlądowych Polski: stawach, jeziorach i rzekach, w postaci mat unoszących się na wodzie [6]. Biomasa glonów z gatunku *C. glomerata* wykorzystywana do badań w niniejszej pracy doktorskiej była zbierana ze zbiorników wodnych zlokalizowanych na terenie województwa wielkopolskiego. Głównymi punktami poboru glonów było Jezioro Oporzyńskie (N52°55', E17°9') i rzeka Nielba (N52°48', E17°12'). W trakcie prowadzonych prac zaobserwowano bowiem systematyczne, coroczne pojawianie się dużej ilości biomasy *C. glomerata* w opisanych zbiornikach wodnych. W szczególności dotyczyło to Jeziora Oporzyńskiego, gdzie co roku notowano formowanie się znaczących ilości biomasy *C. glomerata* w postaci mat.

Zdecydowana większość badań prowadzonych nad związkami biologicznie czynnymi zawartymi w zielenicach *C. glomerata* dotyczyła morskich gatunków tych glonów [7, 8]. Dotychczas przeprowadzono niewiele eksperymentów odnośnie składu chemicznego słodkowodnych glonów *C. glomerata*, niemniej jednak wykryto w nich m.in.: kwasy tłuszczowe, steroidy [9], karotenoidy [10] i polifenole [11]. Zagadnienie aktualnego stanu wiedzy na temat substancji biologicznie czynnych obecnych w słodkowodnych zielenicach *C. glomerata* zostało obszernie opisane w **Załączniku V**. W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej dokonano złożonej

charakterystyki biochemicznej słodkowodnych glonów *C. glomerata* występujących w wodach śródlądowych Wielkopolski. W **Załączniku I** przedstawiono wyniki analiz makroelementów, mikroelementów, aminokwasów oraz kwasów tłuszczowych w badanych glonach. Biomasa słodkowodnych makrozielenic *C. glomerata* jest źródłem wielu makro- i mikroelementów (w szczególności zawierała duże ilości wapnia, a także potasu i magnezu), aminokwasów (w największych ilościach występował kwas glutaminowy), jak również kwasów tłuszczowych (zarówno nasyconych, jak i nienasyconych). Zostały wykryte następujące kwasy nasycone (malejąco według ilości): kwas palmitynowy (C16:0; dominujący kwas nasycony), mirystynowy (C14:0), pelargonowy (C9:0) i stearynowy (C18:0). Spośród kwasów nienasyconych wykryto kolejno: kwas oleinowy (C18:1 [n-9]; dominujący kwas nienasycony), linolowy (C18:2 [n-6]),  $\alpha$ -linolenowy (C18:3 [n-3]), palmityno-oleinowy (C16:1 [n-7]), stearydynowy (C18:4 [n-3]), arachidonowy (C20:4 [n-6]) oraz eikozapentaenowy (C20:5 [n-3]). Bogaty skład kwasów tłuszczowych, w szczególności kwasów jedno- i wielonienasyconych, warunkuje prozdrowotne działanie ekstraktów z *C. glomerata*, m.in. przeciwzapalne i antyoksydacyjne [12, 13]. Ponadto, badania przedstawione w opisanym artykule pokazują, że ekstrakcja SFE jest znacznie bardziej wydajną metodą izolacji kwasów tłuszczowych z *C. glomerata*, niż klasyczna ekstrakcja w aparacie Soxhleta z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników. W kolejnej pracy [**Załącznik II**] opisano oznaczanie chlorofili, karotenoidów i związków polifenolowych w ekstraktach z *C. glomerata*, z wykorzystaniem ekstrakcji SFE z dodatkiem etanolu jako modyfikatora. Metoda SFE została zoptymalizowana w celu uzyskania wyciągów o jak największej zawartości karotenoidów i polifenoli. W badaniach tych po raz pierwszy została wykryta fukoksantyna (karotenoid o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, charakterystyczny dla brunatnic) oraz astacen w słodkowodnych glonach *C. glomerata*. Innym nowatorskim odkryciem było opracowanie metody ekstrakcji gorącą wodą w połączeniu z hydrolizą enzymatyczną oraz pierwsza tego typu izolacja siarczanowych polisacharydów (typu ulvanów) ze słodkowodnego gatunku *C. glomerata* [**Załącznik III**].



Rys. 1. *Cladophora glomerata*: plecha przed suszeniem (A) i po suszeniu (B); rozgałęzione komórki - zdjęcie z mikroskopu świetlnego Zeiss Axioskop 2 MOT (C); maty na Jeziorze Oporzyńskim (D); autor: Marta Pikosz.

*Ulva flexuosa* subsp. *pilifera* (Kütz.) (błonica oszczepowata) również należy do gromady zielenic nitkowatych (Chlorophyta, Ulvophyceae). Jest jednoroczną zielenicą plechową, najpowszechniej występującą w wodach morskich [14]. Środowiskiem występowania tego gatunku są również ekosystemy słonawe (estuaria) i słodkowodne (jeziora, stawy i rzeki). Plechy *U. flexuosa* (Rys. 2) mają formę taśmokszałtnych rurek pustych w środku. Jest to gatunek kosmopolityczny, tworzący dużą biomasę w zbiornikach słodkowodnych na terenie Polski [1]. Miejscem występowania corocznych zakwitów *U. flexuosa* w Wielkopolsce jest rzeka Nielba, skąd pobierano próby do badań.

W literaturze brakuje danych na temat składu chemicznego słodkowodnych glonów *U. flexuosa*. Większość przeprowadzonych badań dotyczy morskiego gatunku *U. lactuca*, w którym wykryto m.in.: glikozydy, proteiny, taniny, terpenoidy, steroidy, flawonoidy i inne związki fenolowe, węglowodany [15, 16], a także siarczanowe polisacharydy – ulwany [17]. Morskie zielenice z gatunku *U. flexuosa* są również źródłem ulwanów [17], związków fenolowych, tanin i glikozydów [18]. W **Załączniku III** opisano pierwszą izolację siarczanowych polisacharydów typu ulwanów ze słodkowodnych zielenic *U. flexuosa*. Natomiast w **Załączniku II** przedstawiona została analiza związków fenolowych, chlorofili i karotenoidów w tym samym słodkowodnym gatunku. Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację dwóch karotenoidów: deinoksantyny i sifonoksantyny w ekstraktach ze słodkowodnych glonów *U. flexuosa*. Obecność opisanych substancji w *U. flexuosa* warunkuje właściwości przeciwutleniające wyciągów z tego glonu, co również zostało opisane

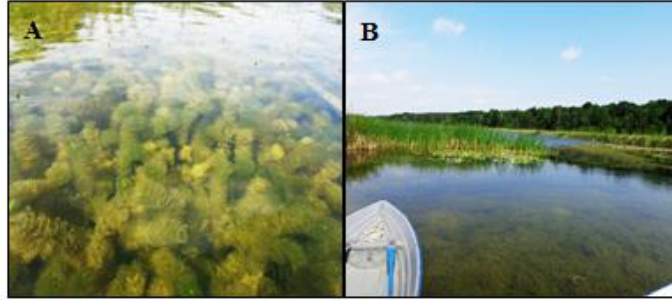
w **Załączniku II**. Ekstrakty z *U. flexuosa* charakteryzowały się największym potencjałem antyoksydacyjnym spośród innych badanych makrozielenic.



Rys. 2. *Ulva flexuosa*: plecha (A);  
maty w rzece Nielbie (B); autor: Marta Pikoś.

*Chara fragilis* A.N. Desvaux to ramienica krucha należąca do gromady ramienic (Charophyta, Charophyceae). Jest makroglonem o silnie rozgałęzionej, kruchej plesze, inkrustowanej węglanem wapnia. W ogólnym pokroju ramienice przypominają skrzypy. Glony te występują zarówno w środowiskach słono-, jak i słodkowodnych. Jako gatunek kosmopolityczny *C. fragilis* występuje powszechnie w Polsce, najczęściej w strefie pojezierzy, jak również w Bałtyku [19]. Biomasa *C. fragilis* wykorzystywana do badań była pobierana z Jeziora Wielkowiejskiego (N52°17'48.9", E16°39'37.7") (Rys. 3).

Charakterystyka biochemiczna słodkowodnych gatunków z rodzaju *Chara* jest bardzo słabo poznana. Dotychczas określono jedynie obecność kwasów tłuszczowych, steroli [20], a także niektórych karotenoidów, takich jak: luteina, neoksantyna, zeaksantyna, wiolaksantyna, fukoksantyna,  $\beta$ -,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -karoten [21] w słodkowodnych gatunkach *Chara*. Wiedza na temat związków bioaktywnych w tych glonach, a co za tym idzie – ich potencjalnych właściwości, jest znikoma. Dlatego też podjęto badania w celu oznaczenia substancji biologicznie czynnych w słodkowodnym glonie *C. fragilis* [**Załącznik II**]. Wyniki badań wykazały obecność licznych karotenoidów: fukoksantyny, mikromonolu, astacenu, luteiny, cytranaksantyny oraz maktraksantyny, a także polifenoli w *C. fragilis*. Warto podkreślić, że badania te miały charakter pionierski i większość z opisanych związków została wykryta po raz pierwszy w badanych makroglonach słodkowodnych. Gatunek *C. fragilis* cechował się największą zawartością analizowanych substancji (karotenoidów, polifenoli) spośród innych badanych makrozielenic. A zatem badania te wskazują na największy potencjał gatunku *C. fragilis*, który jest najbogatszym źródłem związków bioaktywnych w porównaniu do pozostałych glonów badanych w pracy. Ponadto wykazano, że wyciągi z *C. fragilis* posiadają stosunkowo silne właściwości antyoksydacyjne.



*Rys. 3. Chara fragilis: plechy w Jeziorze Wielkowiejskim (A, B);  
autor: Beata Messyasz.*

## 4.2. Metody izolacji związków bioaktywnych z glonów

Ekstrakcja jest procesem umożliwiającym wyodrębnienie substancji z danego układu na zasadzie dyfuzji, poprzez ich rozpuszczanie w odpowiednim rozpuszczalniku, a następnie oddzielenie od pozostałych składników próbki. Proces ten polega na przechodzeniu jednego lub więcej składników z matrycy (roztworu lub ciała stałego) do drugiej fazy – ekstrahenta (zazwyczaj cieczy). W przypadku izolacji substancji bioaktywnych z biomasy glonów zwykle mamy do czynienia z ekstrakcją w układzie ciało stałe – ciecz. Matrycę pierwotną stanowi bowiem biomasa glonów (ciało stałe), natomiast matrycą wtórną (odbierająca) jest rozpuszczalnik, zazwyczaj w postaci cieczy lub płynu w stanie nadkrytycznym. We współczesnych metodach ekstrakcji, jako matryca odbierająca stosowany jest również gaz lub ciało stałe [22].

Kierując się kryterium innowacyjności można wyróżnić klasyczne oraz nowoczesne techniki ekstrakcyjne. Klasyczne metody ekstrakcji, jak np. ekstrakcja w aparacie Soxhleta, wytrząsanie i maceracja, są obecnie stopniowo wypierane przez nowoczesne metody otrzymywania wyciągów roślinnych, głównie z powodu niskiej wydajności pozyskiwania substancji czynnych, jak również długiego czasu przebiegu procesu i dużego zużycia rozpuszczalników. Współczesne techniki ekstrakcji wykorzystują działanie dodatkowych czynników fizycznych, bądź chemicznych, takich jak: promieniowanie mikrofalowe, rozpuszczalniki w stanie nadkrytycznym, enzymy hydrolityczne, które powodują przyspieszenie procesu ekstrakcji oraz znaczne zwiększenie jego wydajności. Do metod tych należy m.in. ekstrakcja SFE i EAE. Kierunkiem rozwoju nowoczesnych metod ekstrakcji są zasady „zielonej chemii”, w tym: zmniejszenie nakładu pracy i energii, ograniczenie zużycia rozpuszczalników organicznych, emisji gazów, ścieków i odpadów [22].

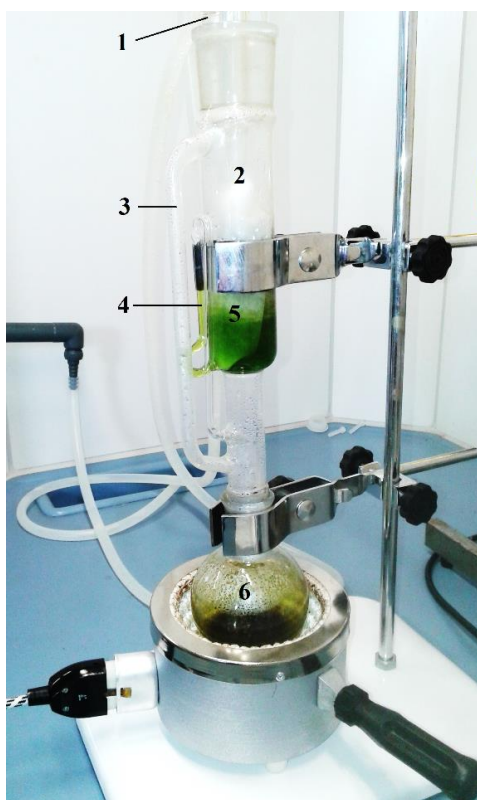
W zależności od właściwości fizyko-chemicznych próbki oraz substancji bioaktywnych, które mają zostać wyekstrahowane, dobierany jest odpowiedni rozpuszczalnik, bądź mieszanina rozpuszczalników. Wybór ekstrahenta zależy głównie od stopnia rozpuszczalności w nim danego analitu oraz od łatwości usunięcia go z ekstraktu. Wydajność procesu ekstrakcji zależy również od właściwości samej matrycy pierwotnej, takich jak rozdrobnienie, czy też związanie z analitem. W przypadku glonów bardzo istotne jest odpowiednie przygotowanie próbki do procesu ekstrakcji. Poprawne postępowanie z biomasa glonów rozpoczyna się w zasadzie już na etapie pobierania próbek ze środowiska. Musi się ono odbyć w taki sposób, aby uzyskać próbkę reprezentatywną. Należy zatem pobrać próbki biomasy z jak największej liczby punktów na danym terenie (rzeka, jezioro), z odpowiedniej głębokości i najlepiej w tym samym dniu. Następnie zebrana biomasa powinna zostać

przewieziona do laboratorium w możliwie najkrótszym czasie, w szczelnie zamkniętych plastikowych pojemnikach z wodą, w niskiej temperaturze i bez dostępu światła. W laboratorium biomasa jest wielokrotnie płukana wodą destylowaną aż do momentu usunięcia wszelkich zanieczyszczeń, np. piasku, innych gatunków glonów i roślin wodnych. Tak oczyszczoną biomasę poddaje się analizie mikroskopowej oraz DNA w celu potwierdzenia przynależności gatunkowej, a następnie suszeniu w temperaturze ok. 40°C aż do uzyskania stałej masy. Glony muszą zostać wysuszone w przeciągu 4 godzin od ich poboru, w przeciwnym razie istnieje ryzyko zajścia procesów gnilnych oraz rozkładu substancji biologicznie czynnych. Kolejnym etapem jest homogenizacja suchej biomasy, np. za pomocą młynka laboratoryjnego, aby uzyskać próbkę laboratoryjną o jak największym rozdrobnieniu. Otrzymaną w ten sposób homogeniczną próbkę poddaje się następnie procesowi ekstrakcji. Należy jednak pamiętać o odpowiednim przechowywaniu próbek laboratoryjnych biomasy glonów, tj. w ciemnych pojemnikach i niskiej temperaturze (-20°C), z uwagi na fakt, że wiele substancji bioaktywnych zawartych w glonach (np. karotenoidy, polifenole) są związkami łatwo rozkładającymi się pod wpływem światła i podwyższonej temperatury. Oprócz odpowiednio przygotowanej próbki, na wydajność procesu ekstrakcji mają również wpływ inne czynniki, np.: współczynnik dyfuzji i lepkość rozpuszczalnika, szybkość przenoszenia masy substancji ekstrahowanej z matrycy pierwotnej do matrycy odbierającej, czas trwania procesu, temperatura i ciśnienie [22, 23].

Aby uzyskać ekstrakt z glonów o jak największej zawartości substancji biologicznie czynnych należy przede wszystkim dobrać odpowiednią metodę ekstrakcji do właściwości izolowanych związków. Przykładowo, ekstrakcja SFE jest wydajną techniką w przypadku izolacji kwasów tłuszczowych [**Załącznik I**] i karotenoidów [**Załącznik II**] z glonów słodkowodnych. Natomiast w przypadku siarczanowych polisacharydów najlepiej sprawdza się klasyczna ekstrakcja gorącą wodą w połączeniu z hydrolizą enzymatyczną [**Załącznik III**]. Opracowywanie nowych metod izolacji bioaktywnych molekuł z biomasy glonów jest bardzo skomplikowane i czasochłonne. Optymalizacja warunków ekstrakcji często jest przeprowadzana na zasadzie prób i błędów, ale również za pomocą programów komputerowych, np. Statgraphics Centurion XVI® (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Programy te pomagają w zaprojektowaniu eksperymentu i na podstawie uzyskanych danych wyliczają optymalne warunki procesu ekstrakcji, co znacząco skraca czas pracy. W kolejnych podrozdziałach zostały opisane metody ekstrakcji opracowane w niniejszej pracy doktorskiej w celu izolacji poszczególnych grup związków biologicznie czynnych z badanych słodkowodnych makrozielenic.

### 4.2.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta

Jedną z najpowszechniej stosowanych technik izolacji substancji bioaktywnych z glonów i roślin jest klasyczna ekstrakcja próbek stałych w aparacie Soxhleta za pomocą rozpuszczalnika. Proces ekstrakcji odbywa się w obiegu zamkniętym, gdzie próbka jest ekstrahowana wielokrotnie, każdorazowo świeżą porcją ekstrahenta. Rysunek 4 przedstawia zestaw do ekstrakcji z aparatem Soxhleta. Sam aparat Soxhleta składa się z pojemnika szklanego, w którym umieszcza się gilzę z bibuły filtracyjnej wypełnioną próbką, a także z rurki przelewowej (syfonu) oraz rurki bocznej, która umożliwia przepływ par rozpuszczalnika do chłodnicy. Do aparatu podłącza się od dołu kolbę okrągłodenną wraz z ekstrahentem, zaś od góry - chłodnicę zwrotną. Kolba z rozpuszczalnikiem jest ogrzewana w stanie łagodnego wrzenia. Pary ekstrahenta przechodzą rurką boczną do chłodnicy, gdzie ulegają schłodzeniu i skropleniu, natomiast kondensat z chłodnicy wpływa do pojemnika z próbką, powoli go wypełniając. Ekstrakt przelewa się do kolby, gdy poziom rozpuszczalnika w pojemniku osiągnie wysokość rurki bocznej. Proces ten powtarzany jest wielokrotnie aż do całkowitego wyekstrahowania substancji [22].



Rys. 4. Zestaw do ekstrakcji z aparatem Soxhleta: 1 – chłodnica; 2 – aparat Soxhleta; 3 – rurka boczna; 4 – rurka przelewowa; 5 – gilza z próbką; 6 – kolba z rozpuszczalnikiem; autor: Joanna Fabrowska.

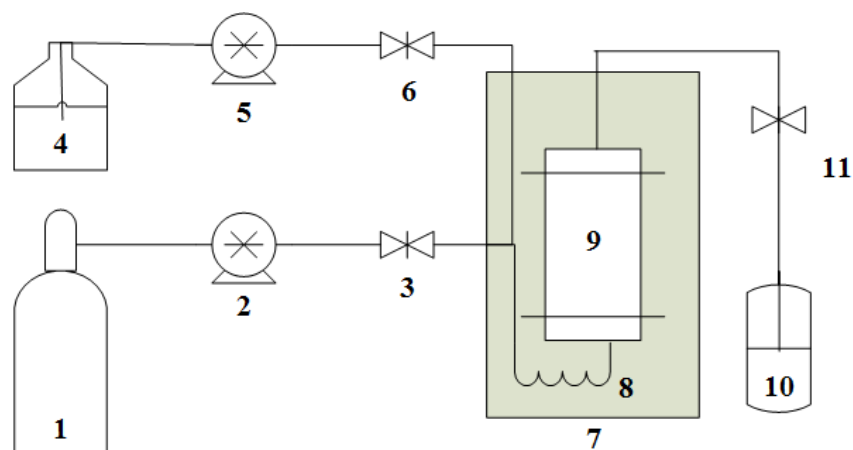
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta jest bardziej ekonomiczna, niż klasyczna ekstrakcja przez wytrząsanie, gdyż zużywa się w niej znacznie mniejsze ilości rozpuszczalników. Mimo, że technika ta jest procesem dość powolnym, jest ona powszechnie stosowana w laboratoriach, jako metoda odniesienia dla innych, nowoczesnych technik ekstrakcji. Dodatkową zaletą ekstrakcji w aparacie Soxhleta jest fakt, że nie wymaga ona ciągłego nadzoru i pozwala na praktycznie całkowite wyizolowanie substancji z materiału roślinnego. Jednakże metoda ta jest stopniowo wypierana przez nowoczesne techniki ekstrakcji z tego względu, że jest długotrwała i często mniej wydajna [22, 24]. W technice ekstrakcji w aparacie Soxhleta stosowane są stosunkowo wysokie temperatury, które wynikają z temperatury wrzenia danego rozpuszczalnika. Z tego względu opisana metoda nie nadaje się do ekstrakcji substancji termolabilnych, takich jak karotenoidy i polifenole, czy też związków lotnych. Fakt ten znacząco limituje zakres zastosowań ekstrakcji w aparacie Soxhleta do izolacji związków trwałych termicznie, średniolotnych i nielotnych [22].

W **Załączniku I** opisano przykład zastosowania ekstrakcji w aparacie Soxhleta do izolacji kwasów tłuszczowych z *C. glomerata*, jako metody porównawczej. Technika ta sprawdza się w przypadku ekstrakcji kwasów tłuszczowych z glonów, ponieważ substancje te są trwałe termicznie, a zatem zastosowanie wysokich temperatur ekstrakcji nie wpływa na rozkład tych związków. Zastosowanymi ekstrahentami były etanol i aceton, a czas ekstrakcji wynosił 7 godzin. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują wyraźnie, że ekstrakcja w aparacie Soxhleta była znacznie mniej wydajną metodą izolacji kwasów tłuszczowych z *C. glomerata* niż ekstrakcja SFE. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku zastosowania heksanu, jako rozpuszczalnika do ekstrakcji w aparacie Soxhleta [25]. W kolejnej publikacji [**Załącznik III**] zastosowano ekstrakcję w aparacie Soxhleta, jako metodę wstępną do oczyszczenia biomasy glonów z lipidów, barwników i innych substancji przeszkadzających. W tym celu przeprowadzono ekstrakcję w mieszaninie dichlorometan : aceton (1:1) przez 7 godzin. Po takiej wstępnej obróbce biomase poddano kolejnemu etapowi, tj. ekstrakcji siarczanowych polisacharydów za pomocą wody.

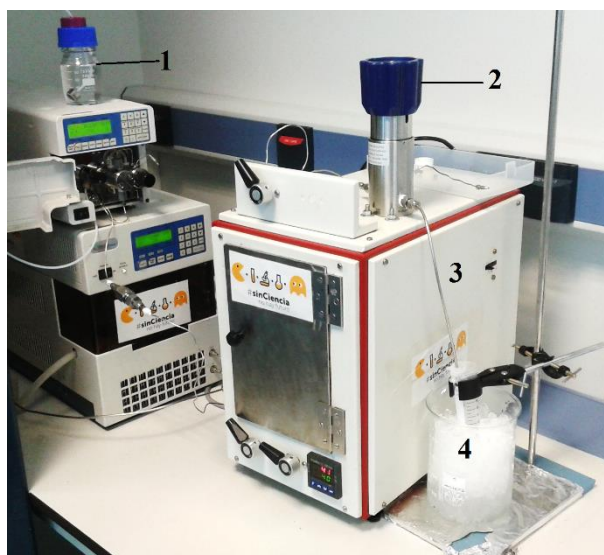
Podsumowując, ekstrakcja w aparacie Soxhleta jest powszechnie stosowaną metodą ze względu na dostępność aparatury i łatwość wykonania. W przedstawionej pracy metoda ta była wykorzystywana głównie jako technika porównawcza, lub też metoda pomocnicza, stanowiąca wstępny etap innego procesu ekstrakcji. Ze względu na duże zużycie rozpuszczalników, długi czas trwania i brak automatyzacji tej techniki, w pracy doktorskiej skupiono się na optymalizacji nowoczesnych metod ekstrakcji, które zostały opisane w kolejnych podrozdziałach.

#### 4.2.2. Ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym

Obecnie ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym jest jedną z najbardziej rozwijających się technik ekstrakcji, o czym świadczy znacząca ilość publikacji na ten temat [26-28]. Ekstrahentami stosowanymi w technice SFE są płyny w stanie nadkrytycznym, a najpowszechniej wykorzystywany jest dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym (SC-CO<sub>2</sub>). Stan nadkrytyczny danego rozpuszczalnika jest uzyskiwany poprzez jego podgrzanie do temperatury przekraczającej temperaturę krytyczną ( $T_k$ ) oraz sprężenie powyżej ciśnienia krytycznego ( $p_k$ ). Płyny w stanie nadkrytycznym cechują się lepkością zbliżoną do gazów, gęstością podobną do cieczy oraz wysoką dyfuzyjnością. Po przejściu rozpuszczalnika w stan nadkrytyczny wzrasta tempo ekstrakcji oraz skraca się etap oddzielania w porównaniu z tradycyjnymi metodami [22, 26-28]. Na Rysunku 5 przedstawiono schemat aparatury do procesu ekstrakcji nadkrytycznej, zaś na Rysunku 6 – zdjęcie aparatury. Do celki ekstrakcyjnej, w której znajduje się próbka, doprowadzany jest sprężony CO<sub>2</sub>, poprzez zmianę jego ciśnienia i temperatury do uzyskania stanu nadkrytycznego, oraz, jeśli to konieczne, modyfikator. W wyniku kontaktu ekstrahenta w stanie nadkrytycznym z surowcem następuje wydobycie ekstrahowanego składnika w celce ekstrakcyjnej. Następnie uzyskany wyciąg jest transportowany z celki do odbieralnika poprzez restryktor, który obniża ciśnienie wychodzącego płynu. W tym momencie CO<sub>2</sub> przechodzi ze stanu nadkrytycznego w stan gazowy, gdyż osiąga temperaturę i ciśnienie panujące w otoczeniu [22, 29].



Rys. 5. Schemat aparatury do ekstrakcji nadkrytycznej: 1 – zbiornik CO<sub>2</sub>, 2 – pompa CO<sub>2</sub>, 3, 6 – zawór ciśnieniowy, 4 – zbiornik na modyfikator, 5 – pompa modyfikatora, 7 – piec, 8 – wymiennik ciepła, 9 – celka ekstrakcyjna, 10 – odbieralnik, 11 – restryktor **[Załącznik II]**.



Rys. 6. Aparatura do ekstrakcji nadkrytycznej i jej główne składowe: 1 – zbiornik na modyfikator, 2 – restryktor, 3 – piec z celką ekstrakcyjną w środku, 4 – odbieralnik; autor: Joanna Fabrowska.

Jak już wspomniano, największe znaczenie w przemyśle spośród rozpuszczalników stosowanych w metodzie SFE ma SC-CO<sub>2</sub>. Fakt ten wynika z wielu korzystnych właściwości tego ekstrahenta, wśród których wymieniane są: wysoka dyfuzyjność umożliwiająca głęboką penetrację surowca roślinnego w celu uzyskania wszystkich pożądanych składników, wysoka lotność ułatwiająca usunięcie CO<sub>2</sub> z produktu po ekstrakcji, obojętność chemiczna, stosunkowo niskie parametry krytyczne ( $T_k=31,1^{\circ}\text{C}$ ,  $p_k=7,38\text{ MPa}$ ), niska lepkość, niepalność, nietoksyczność, brak korozyjności, niskie koszty [22, 29]. Z uwagi na charakter niepolarny dwutlenku węgla jest on odpowiednim rozpuszczalnikiem do ekstrakcji bioaktywnych substancji niepolarnych, takich jak: kwasy tłuszczowe, karotenoidy, steroidy, terpeny. Natomiast ekstrakcja związków polarnych jest przeprowadzana poprzez dodatek do dwutlenku węgla niewielkich ilości (1-15%) modyfikatorów polarnych, np. etanolu, metanolu, acetonu, czy też kwasu mrówkowego [22]. W porównaniu do innych metod ekstrakcja SFE jest znacznie bardziej wydajna, selektywna i szybka, a jednocześnie przyjazna dla środowiska, gdyż znacząco ogranicza wykorzystanie lotnych rozpuszczalników organicznych. Dodatkowe zalety SFE to: przebieg procesu bez dostępu powietrza, co chroni substancje przed utlenianiem, poprawa czystości i jakości z jednoczesnym zachowaniem aktywności biologicznej substancji pozyskiwanych z roślin i glonów, możliwość całkowitego wydzielenia rozpuszczalnika z ekstraktu, a także recyrkulacji rozpuszczalnika i – co za tym idzie – obniżenie kosztów [25, 27]. Głównymi niedogodnościami tej techniki są wysokie koszty aparatury wysokociśnieniowej oraz znaczne nakłady energii niezbędne do sprężenia rozpuszczalnika [29]. Aktualnie metoda ekstrakcji nadkrytycznej jest szeroko stosowana do izolacji substancji bioaktywnych z alg, m.in. kwasów tłuszczowych, chlorofili i związków fenolowych

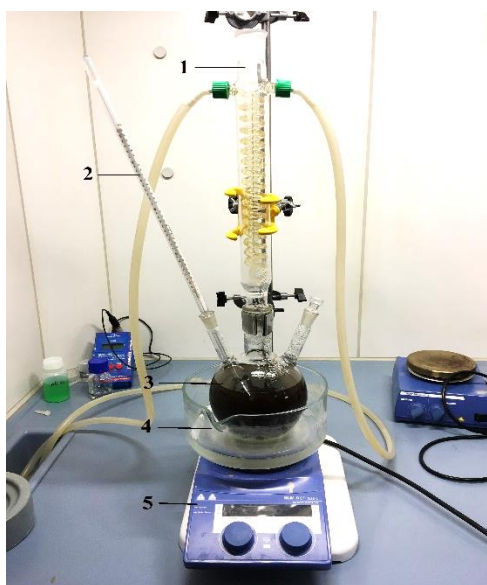
[30, 31]. Z uwagi na niską temperaturę krytyczną SC-CO<sub>2</sub>, technika SFE jest odpowiednia także do ekstrakcji substancji termolabilnych, takich jak: β-karoten [31], luteina [32], tokoferole [33] oraz terpenoidy [34].

W pracy doktorskiej największą uwagę poświęcono optymalizacji i zastosowaniu ekstrakcji SFE do izolacji substancji bioaktywnych z glonów słodkowodnych. W **Załączniku II** przedstawiona została optymalizacja metody SFE, ukierunkowana na ekstrakcję karotenoidów i polifenoli z badanych gatunków makrozielenic. Celem opisanego procesu optymalizacji było uzyskanie ekstraktów o jak największej zawartości karotenoidów i związków polifenolowych, oraz o możliwie najwyższym potencjale przeciwutleniającym. Optymalne warunki ekstrakcji, tj. temperatura 40°C, ciśnienie 300 bar oraz 11,4% dodatek etanolu w roli modyfikatora, pozwoliły na otrzymanie wyciągów bogatych w substancje przeciwutleniające, w szczególności w karotenoidy, z *C. fragilis*, *C. glomerata* oraz *U. flexuosa*. Zastosowanie etanolu jako dodatkowego rozpuszczalnika miało na celu zwiększenie wydajności ekstrakcji również substancji polarnych, takich jak polifenole. Zaobserwowano, że wzrost ilości etanolu, zastosowanie wyższych ciśnień i niższych temperatur sprzyjało wydajniejszej ekstrakcji karotenoidów i polifenoli, jak również uzyskaniu lepszych właściwości antyoksydacyjnych otrzymanych wyciągów. Dodatkową zaletą procesu był fakt, że ekstrakty otrzymano w stosunkowo krótkim czasie (2 h) oraz przy niskim zużyciu rozpuszczalnika. Kolejny przykład zastosowania metody SFE w pracy doktorskiej przedstawia **Załącznik I**, w którym opisano izolację kwasów tłuszczowych z gatunku *C. glomerata*. W tym przypadku jako ekstrahent stosowany był tylko i wyłącznie SC-CO<sub>2</sub>, bez dodatku modyfikatorów, ponieważ celem była ekstrakcja substancji niepolarnych. Proces przebiegał w temperaturze 45°C, przy kolejno wzrastających ciśnieniach: 300, 500 oraz 700 bar, przez 1,5 h. W porównaniu do klasycznej ekstrakcji w aparacie Soxhleta, metoda SFE pozwala na znacznie bardziej wydajną izolację kwasów tłuszczowych z badanych glonów. Za pomocą techniki SFE otrzymano wyciąg o zawartości 62,5% kwasów tłuszczowych, podczas gdy z wykorzystaniem ekstrakcji acetonem w aparacie Soxhleta – 36,5%.

Reasumując, ekstrakcja nadkrytyczna znajduje szerokie zastosowanie do izolacji substancji biologicznie czynnych z glonów. Jest odpowiednią metodą do ekstrakcji głównie substancji niepolarnych, takich jak karotenoidy i kwasy tłuszczowe, niemniej jednak odpowiednia modyfikacja procesu, np. poprzez dodatek polarnego ekstrahenta - etanolu, pozwala również na izolację związków polarnych, jak np. polifenoli. Dodatkowo, możliwość zastosowania niskich temperatur sprzyja pozyskiwaniu substancji wrażliwych na wysoką temperaturę, do których należą wspomniane karotenoidy i polifenole. Modyfikując parametry procesu, takie jak temperatura, ciśnienie, dodatek rozpuszczalnika, czy czas trwania, można optymalizować proces ekstrakcji SFE w kierunku uzyskiwania pożądanych składników bioaktywnych.

### 4.2.3. Ekstrakcja enzymatyczna

Ekstrakcja EAE jest techniką bazującą na stosowaniu dodatku specyficznych enzymów hydrolitycznych, takich jak peptydazy, proteiny, czy też glikozydazy, które są zdolne do rozkładu wysokocząsteczkowych związków zlokalizowanych w ścianie komórkowej glonów i roślin. Skład ściany komórkowej glonów jest uzależniony od gatunku i można w nim wyróżnić m.in. glikoproteiny i polisacharydy, a wśród nich: pektyny, skrobię, celulozę, ksylany, karagenian. Obecność opisanych związków utrudnia przenikanie rozpuszczalnika do wnętrza komórek glonów, a tym samym – ekstrakcję związków bioaktywnych. Dlatego też dodatek odpowiednich enzymów hydrolitycznych w metodzie EAE warunkuje osłabienie struktury ściany komórkowej, a w konsekwencji ułatwienie uwalniania wewnątrzkomórkowych substancji czynnych do rozpuszczalnika. Ekstrakcję typu EAE prowadzi się zazwyczaj w taki sam sposób, jak w metodach konwencjonalnych, z tą różnicą, że do ekstrahenta dodawany jest odpowiedni enzym. Przykładowy zestaw do EAE przedstawia Rysunek 8, gdzie ekstrahowano siarczanowe polisacharydy z *C. glomerata*. Zestaw składa się z kolby, w której znajduje się wyciąg zawierający mieszaninę polisacharydów, protein i niskocząsteczkowych cukrów wraz z dodanymi enzymami, mieszadła magnetycznego, łaźni wodnej, chłodnicy oraz termometru. Oprócz enzymu właściwego dla danego gatunku glonu i substancji, które należy usunąć, trzeba również dobrać adekwatną temperaturę, pH i czas trwania reakcji enzymatycznej. Każdy z enzymów posiada bowiem swoisty zakres pH, temperatury oraz innych czynników, w obrębie których może on właściwie działać [35].



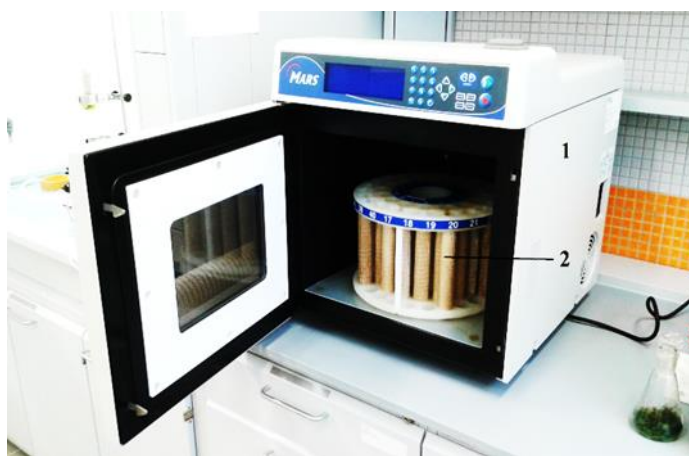
Rys. 7. Zestaw do ekstrakcji enzymatycznej: 1 – chłodnica; 2 – termometr; 3 – kolba; 4 – łaźnia wodna; 5 – mieszadło magnetyczne; autor: Joanna Fabrowska.

EAE okazała się być techniką wysoce bardziej selektywną i wydajną, generującą mniej zanieczyszczeń, a zarazem mniej czasochłonną w stosunku do klasycznych metod ekstrakcji [36]. Ponadto technika EAE cechuje się mniejszym zużyciem energii w porównaniu do ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami, jak również mikrofalami [37]. Główną niedogodnością tej metody jest trudność w dobraniu odpowiednich warunków ekstrakcji, takich jak: rodzaj i stężenie enzymów w stosunku do składu ściany komórkowej alg, czas hydrolizy, stosunek zawartości wody do materiału roślinnego, pH, temperatura [35]. Jakkolwiek ze względu na szereg zalet EAE staje się coraz bardziej popularna w pozyskiwaniu substancji bioaktywnych z glonów, m.in.: polisacharydów, polifenoli i innych antyoksydantów [36, 37]. Często metoda EAE nie służy samej ekstrakcji substancji bioaktywnych, stanowi natomiast etap oczyszczania ekstraktu z niepożądanych związków. Ma to miejsce m.in. w przypadku ekstrakcji ulvanów z glonów, gdzie właściwym etapem jest ekstrakcja gorącą wodą. Natomiast w kolejnym etapie do wyciągu wodnego dodawane są enzymy hydrolityczne w celu oczyszczenia wyciągu z protein i cukrów prostych [38].

W pracy doktorskiej wykorzystano hydrolizę enzymatyczną jako etap oczyszczania do pozyskiwania ulvanów z *C. glomerata* i *U. flexuosa* [Załącznik III]. Opracowana metoda ekstrakcji polisacharydów jest procedurą skomplikowaną i wieloetapową. Pierwszy etap ma na celu usunięcie lipidów, barwników i innych substancji niepolarnych z glonów za pomocą ekstrakcji w aparacie Soxhleta z użyciem mieszaniny dichlorometan : aceton (1:1). Kolejnym krokiem była ekstrakcja polisacharydów siarczanowych z wstępnie oczyszczonej biomasy za pomocą wody, w temperaturze 75-85°C przez 7 h. Następnym etapem to właśnie hydroliza enzymatyczna. Otrzymany ekstrakt wodny obok siarczanowych polisacharydów zawierał także cukry proste, produkty skrobiowe, czy proteiny. Aby usunąć te substancje zastosowano dodatek  $\alpha$ -amylazy, która hydrolizuje wiązanie  $\alpha$ -(1-4)glikozydowe w skrobi, oraz proteinazy-K, służącej do trawienia i usuwania zanieczyszczeń białkowych [39]. W przypadku  $\alpha$ -amylazy reakcja enzymatyczna była prowadzona w temperaturze 20°C przez 30 minut. Następnie ustalono pH roztworu do wartości 7,5 i dodano proteinazę-K, z którą hydroliza była prowadzona w temperaturze 37°C przez 24 h. Kolejne etapy polegały na oczyszczaniu otrzymanych ulvanów oraz na ich wytrąceniu z roztworu za pomocą etanolu. Opisana metoda została opracowana i po raz pierwszy wykorzystana do izolacji siarczanowych polisacharydów z zielenic słodkowodnych. W rezultacie otrzymano ulwany ze stosunkowo wysoką wydajnością, wynoszącą około 16% (najwyższa uzyskana wydajność).

#### 4.2.4. Ekstrakcja poprzez mineralizację mikrofalową

Mineralizacja jest procesem polegającym na przekształcaniu związków organicznych, poprzez ich rozkład i utlenienie, w proste związki mineralne takie jak:  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$  i inne. Proces ten prowadzi do otrzymania związków mineralnych z próbki stałej, które następnie można przeprowadzić ilościowo do roztworu. A zatem mineralizacja stanowi także specyficzny rodzaj ekstrakcji, ponieważ pozwala na wyekstrahowanie z próbki składników nieorganicznych, takich jak metale, a następnie na ich oznaczenie zarówno jakościowe, jak i ilościowe. Istnieje wiele technik mineralizacji, m.in. mineralizacja na sucho i na mokro. Metody na sucho, np. spopielenie, są technikami starszymi i zazwyczaj mniej wydajnymi ze względu na błędy wynikające ze strat pierwiastków na skutek ich lotności. Dlatego też bardziej powszechne są metody mineralizacji na mokro, które polegają na rozpuszczaniu próbek organicznych w kwasach lub w mieszaninach substancji utleniających. W technice tej używane są stężone roztwory kwasów mineralnych, ich mieszaniny lub inne związki o właściwościach utleniających, np.:  $HNO_3$ ,  $HClO_4$ , mieszaniny  $HNO_3$  i  $HClO_3$ ,  $HNO_3$  i  $H_2O_2$ . Obecnie najczęściej wykorzystywana jest mineralizacja ciśnieniowa z użyciem energii mikrofalowej. Metoda ta jest połączeniem trzech technik mineralizacji: na mokro z zastosowaniem kwasów i innych substancji mineralizujących, w układzie zamkniętym oraz z użyciem energii mikrofalowej. Jest to najbardziej efektywna metoda mineralizacji próbek organicznych. Urządzeniem wykorzystywanym do tego procesu jest piec mikrofalowy (Rys. 7). Analizowana próbka wraz z kwasem lub inną substancją utleniającą umieszczana jest zamkniętym naczyniu wykonanym z teflonu, tzw. bombie teflonowej. W wyniku działania promieniowania mikrofalowego o typowej częstotliwości 2450 MHz oraz wytwarzającego się w naczyniu ciśnienia i wysokiej temperatury następuje rozkład próbki [22, 23].



Rys. 8. Aparatura do ekstrakcji poprzez mineralizację mikrofalową: 1 - piec mikrofalowy; 2 – bomby teflonowe z próbkami; autor: Joanna Fabrowska.

Zastosowanie mineralizacji mikrofalowej skraca czas roztwarzania próbki od kilku do kilkunastu minut w porównaniu z metodą klasyczną, gdzie mineralizacja trwa zazwyczaj kilka godzin. Jest to spowodowane tym, że podwyższona temperatura i ciśnienie w systemie zamkniętym powodują przyspieszenie reakcji. Ponadto technika ta zapewnia lepszą selektywność, czystość produktów, skuteczność rozkładu związków organicznych i nieorganicznych oraz małe straty analitu. Zastosowanie układu zamkniętego pozwala bowiem uniknąć strat roztworów, a także zapobiec wtórnym zanieczyszczeniom próbki. Metoda ta jest również bardziej przyjazna środowisku, gdyż ogranicza ilość zużytej energii oraz stosowanych szkodliwych rozpuszczalników. Głównymi niedogodnościami przy mineralizacji za pomocą kwasów w piecu mikrofalowym są zanieczyszczenia pochodzące od używanych odczynników utleniających, niecałkowite rozpuszczenie próbki oraz wysokie koszty aparatury [22, 23, 34].

Dzięki mineralizacji w piecu mikrofalowym możliwe jest oznaczanie składników nieorganicznych w próbkach pochodzenia organicznego, np. makro- i mikroelementów zawartych w glonach. W pracy doktorskiej ekstrakcję poprzez mineralizację mikrofalową stosowano jako metodę przygotowania próbek glonów do analizy ICP-OES (ang. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*; optyczna [atomowa] spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w indukcyjnie sprzężonej plazmie). Metoda ICP-OES wymaga przeprowadzenia próbki do roztworu, a zatem mineralizacja biomasy glonów jest procesem niezbędnym poprzedzającym wykonanie tej analizy. Technika mineralizacji próbek *C. glomerata* została opisana w **Załączniku I**. Proces mineralizacji przeprowadzono w piecu mikrofalowym z zastosowaniem kwasu azotowego (V), w czasie 1 h, w zakresie temperatur 100-130°C. Po roztworzeniu próbek glonów możliwe było następnie wykonanie analizy pierwiastkowej za pomocą metody ICP-OES. Skład pierwiastkowy biomasy *C. glomerata* wskazuje na jej potencjalne możliwości wykorzystania, np. w przemyśle kosmetycznym, z uwagi na stosunkowo wysoką zawartość makroelementów: wapnia, potasu i sodu, jak również mikroelementów: magnezu, żelaza, miedzi i cynku. Dodatkowo wyniki analiz wykazały, że *C. glomerata* zawiera jedynie śladowe, a więc niezagrażające zdrowiu, ilości metali, takich jak: arsen, kadm, nikiel, ołów.

## 4.3. Związki bioaktywne w glonach

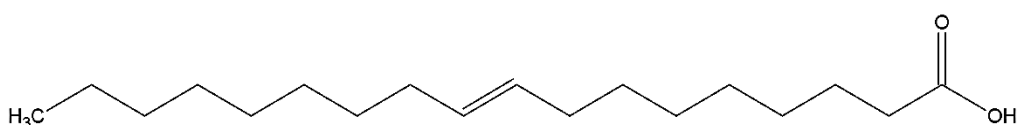
### 4.3.1. Kwasy tłuszczowe

Kwasy tłuszczowe to grupa alifatycznych, lipofilowych kwasów monokarboksylowych. Wyróżnia się kwasy tłuszczowe nasycone, gdy atomy węgla są połączone wyłącznie wiązaniami pojedynczymi, oraz kwasy tłuszczowe nienasycone, wówczas w cząsteczce kwasu występuje co najmniej jedno wiązanie podwójne. Dodatkowo wśród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych istnieje grupa niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT; ang. EFA – *Essential Fatty Acids*), które są potrzebne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Kwasy NNKT są dzielone na kwasy omega-9, omega-6 i omega-3, w zależności od tego, przy którym atomie węgla, licząc od skrajnej grupy metylowej, znajduje się pierwsze wiązanie podwójne [12].

Biorąc pod uwagę aktywność biologiczną kwasów tłuszczowych, najistotniejsze dla organizmu są kwasy z grupy NNKT. Kwasy te występują w cemencie międzykomórkowym warstwy rogowej naskórka, lipidach skóry i tkance podskórnej. Z tego względu pełnią one wiele istotnych funkcji, m.in.: są substratami do syntezy lipidowych składników błon komórkowych, regulują produkcję sebum i proces keratynizacji naskórka, zapobiegają nadmiernemu przesuszeniu skóry i złuszczeniu naskórka. W kosmetyce NNKT działają głównie jako emolienty – związki o działaniu zmiękczającym i wygładzającym skórę, tworzące na powierzchni skóry film okluzyjny, przez co chronią przed nadmierną utratą wody oraz obniżają współczynnik TEWL (ang. *Transepidermal Water Loss*). Tworzenie lipidowej warstwy okluzyjnej na powierzchni skóry warunkuje również ochronę przed patogenami, stąd wynika działanie przeciwzapalne, antyalergiczne i łagodzące NNKT [12, 13].

Substancje z grupy kwasów tłuszczowych są metabolitami pierwotnymi i stanowią materiał zapasowy w komórkach glonów. Związki te stanowią najliczniejszą grupę spośród wszystkich lipidów występujących w glonach. Najbardziej rozpowszechnionymi kwasami tłuszczowymi w przyrodzie są kwasy nienasycone zawierające w cząsteczce 16 lub 18 atomów węgla [12]. Według bazy danych Web of Science™ tylko 16% publikacji, które zostały wydane w latach 2000-2017, dotyczy analizy kwasów tłuszczowych w glonach słodkowodnych, natomiast aż 84% artykułów odnosi się do alg morskich. Wszystkie dane dotyczące ilości publikacji na temat badań związków bioaktywnych w glonach słodkowodnych i morskich, przedstawione w niniejszym oraz kolejnych podrozdziałach, zostały opracowane na podstawie bazy <https://webofknowledge.com/> w dniu 10.06.2017 r. W ramach pracy doktorskiej zbadano skład kwasów tłuszczowych w słodkowodnej makrozielenicy *C. glomerata* [Załącznik I]. Z przeprowadzonych badań wynika, że glon ten jest bogatym źródłem

kwasów tłuszczowych i uzyskany z niego ekstrakt może zawierać aż do 62,5% tych substancji. Kwasem występującym w największej ilości (17,4%) w tym glonie był kwas palmitynowy (C16:0), który jest wykorzystywany w kosmetyce jako emulgator [12]. Co ważne, badane glony *C. glomerata* zawierały także znaczące ilości kwasów tłuszczowych nienasyconych z grupy omega-3, omega-6, omega-7 i omega-9, wykazujących znacznie szerszy zakres aktywności biologicznej. Jako dominujący (9,3%) kwas nienasycony wykryto kwas oleinowy (C18:1 [n-9]) (Rys. 9), który obniża współczynnik TEWL, poprawia stopień nawilżenia skóry, regeneruje barierę lipidową naskórka i niweluje stany zapalne [13]. Kolejnym kwasem nienasyconym wykrytym w *C. glomerata* był kwas linolowy (C18:2 [n-6]), który jest naturalnym składnikiem cementu międzykomórkowego skóry i posiada właściwości przeciwzapalne [12, 13]. Kwas  $\alpha$ -linolenowy (C18:3 [n-3]), również obecny w *C. glomerata*, reguluje pracę układu krążenia, i zwiększa elastyczność naczyń krwionośnych [12]. Interesującym kwasem obecnym w badanych glonach jest kwas palmityno-oleinowy (C16:1 [n-7]), wykazujący silne działanie antyoksydacyjne, ponadto jest dobrze wchłaniany i tolerowany przez skórę [13]. Pozostałe kwasy nienasycone wykryte w *C. glomerata*, tj. kwas stearydynowy (C18:4 [n-3]), arachidonowy (C20:4 [n-6]) oraz eikozapentaenowy (C20:5 [n-3]) posiadają właściwości regenerujące, łagodzące, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, wzmacniają barierę immunologiczną naskórka i opóźniają procesy starzenia się skóry [12]. Ze względu na bogatą zawartość kwasów tłuszczowych słodkowodne makroglony *C. glomerata* mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w kosmetyce, np. jako składniki kremów nawilżających, regenerujących, ochronnych, czy też przeciwstarzeniowych.



Rys. 9. Kwas oleinowy.

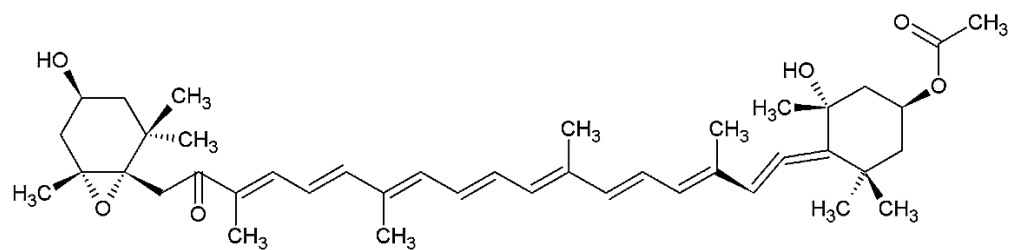
### 4.3.2. Karotenoidy

Karotenoidy są węglowodorami nienasyconymi, należącymi do tetraterpenów, tj. 40-węglowych terpenoidów. Związki te zbudowane są z jednostek izoprenowych zawierających pięć atomów węgla i zaliczane są do grupy lipidów. Z uwagi na swoją budowę karotenoidy mają charakter niepolarny i są dobrze rozpuszczalne w tłuszczach. Wspólną cechą karotenoidów jest również obecność układów sprzężonych wiązań podwójnych, co determinuje zdolność tych substancji do absorpcji światła w zakresie widzialnym oraz ich charakterystyczne czerwono-pomarańczowe zabarwienie [40]. Karotenoidy można podzielić na karoteny i ksantofile. Karoteny to substancje zawierające w swoich cząsteczkach wyłącznie atomy węgla i wodoru, o wzorze sumarycznym  $C_{40}H_{56}$ . Z kolei ksantofile są tlenowymi pochodnymi karotenów, gdyż posiadają dodatkowe grupy hydroksymetylowe, karbonylowe lub karboksylowe [41].

Związki z grupy karotenoidów wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, co oznacza, że są zdolne do zwalczania wolnych rodników i opóźniają procesy starzenia. Dlatego też związki te są powszechnie cenionym surowcem wykorzystywanym do produkcji kosmetyków typu *anti-aging*, czy też suplementów diety. Karotenoidy mogą stymulować fibroblasty do syntezy kolagenu i elastyny, przez co przyczyniają się do redukcji zmarszczek oraz do wzrostu elastyczności skóry. Ponadto, substancje te odgrywają istotną rolę w procesach keratynizacji naskórka, zapobiegają przesuszaniu się skóry i utrzymują nienaruszalność tkanki nabłonkowej. Normalizują również pracę gruczołów łojowych, poprzez regulację gospodarki lipidowej skóry, a także wzmacniają funkcje ochronne naskórka oraz zmniejszają przeznaskórkową utratę wody (TEWL). Z uwagi na absorpcję światła przez karotenoidy są one wykorzystywane jako uzupełnienie filtrów przeciwsłonecznych w kosmetykach promieniochronnych. Ze względu na swoje właściwości fotoprotekcyjne związki te mogą zwiększać odporność skóry na działanie słońca oraz zapobiegać nowotworom skóry. Karotenoidy znajdują również zastosowanie jako naturalne barwniki produktów kosmetycznych, m.in. szminek, lakierów do paznokci, pudrów, cieni do powiek [13, 42, 43].

Karotenoidy występują w komórkach glonów jako barwniki asymilacyjne, które pełnią pomocniczą rolę w procesie fotosyntezy. Ich zadaniem jest absorpcja promieniowania świetlnego, a następnie przekazywanie energii stanu wzbudzonego na cząsteczkę chlorofilu. Stąd też karotenoidy chronią komórki glonów przed niekorzystnym wpływem światła, takim jak fotoutlenianie [13]. Zielenice zawierają z reguły mniej karotenoidów aniżeli brunatnice, czy krasnorosty. Charakterystycznymi barwnikami dla glonów z grupy zielenic są chlorofile *a* i *b*, które występują w nich w największych ilościach, z kolei dominującymi karotenoidami są:  $\beta$ -karoten, luteina

i zeaksantyna. Natomiast brunatnice cechują się wysokimi zawartościami fukoksantyny i  $\beta$ -karotenu, a krasnorosty – luteiny, zeaksantyny oraz  $\beta$ -karotenu [3]. Stąd też zawartość karotenoidów w zielenicach, a w szczególności w słodkowodnych makrozielenicach, jest bardzo słabo poznana. Podobnie jak w przypadku kwasów tłuszczowych, zdecydowana większość artykułów (85%) dostępnych w bazie danych Web of Science™ dotyczy badań karotenoidów w glonach morskich. **Załącznik II** przedstawia pionierskie wyniki badań dotyczące m.in. analizy karotenoidów w trzech gatunkach słodkowodnych makrozielenic. Gatunek *C. fragilis* jest najbogatszym źródłem karotenoidów spośród badanych w pracy doktorskiej glonów i zawiera takie karotenoidy jak: fukoksantyna (Rys. 10), mikromonol, astacen, luteina, cytranaksantyna oraz maktraksantyna. Z kolei w zielenicy *C. glomerata* wykryto fukoksantynę jako karotenoid dominujący, a także astacen. Analiza karotenoidów w *U. flaxuosa* pozwoliła na identyfikację deinoksantyny i sifonoksantyny w ekstraktach z tego glonu. Wszystkie z oznaczonych karotenoidów zostały wykryte po raz pierwszy w badanych słodkowodnych gatunkach glonów. Szczególnie interesującym odkryciem było oznaczenie fukoksantyny w *C. fragilis* oraz w *C. glomerata*, gdzie substancja ta występowała w największych ilościach spośród innych karotenoidów. Obecność fukoksantyny w badanych słodkowodnych zielenicach jest o tyle nietypowa, że karotenoid ten jest charakterystyczny dla morskich brunatnic [3], w szczególności dla gatunków *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* [44] oraz *Sargassum muticum* [45]. Natomiast tylko nieliczne publikacje opisują obecność fukoksantyny w słodkowodnych gatunkach makrozielenic [21]. Fukoksantyna jest bardzo cennym surowcem bioaktywnym ze względu na swoje unikalne właściwości. Przede wszystkim związek ten jest silnym antyoksydantem zdolnym do neutralizowania wolnych rodników [46], ponadto wykazano jego działanie przeciwzapalne [47] i przeciwnowotworowe [48]. Fukoksantyna hamuje także procesy melanogenezy, stąd może znaleźć zastosowanie jako aktywny składnik kosmetyków wybielających przebarwienia skóry [49]. Innym karotenoidem wykrytym w *C. fragilis* jest luteina, która również wykazuje działanie antyoksydacyjne [46], przeciwzapalne, fotoprotekcyjne [50], przeciwnowotworowe [51], jak również jest stosowana w profilaktyce i leczeniu chorób oczu, takich jak zwyrodnienie plamki żółtej, zaćma i barwnikowe zwyrodnienie siatkówki [52]. Pozostałe z wykrytych związków są przebadane w mniejszym stopniu, niemniej jednak wszystkie z substancji należących do grupy karotenoidów charakteryzuje podobne działanie, przede wszystkim przeciwutleniające. Reasumując, ze względu na obecność karotenoidów wyciągi z badanych glonów słodkowodnych mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako składniki leków, suplementów diety, kosmetyków przeciwstarzeniowych czy też promieniochronnych. Na szczególne zainteresowanie zasługuje słodkowodny gatunek *C. fragilis*, który jest najbogatszym źródłem karotenoidów spośród badanych glonów, w tym fukoksantyny i luteiny o udowodnionym działaniu leczniczym.



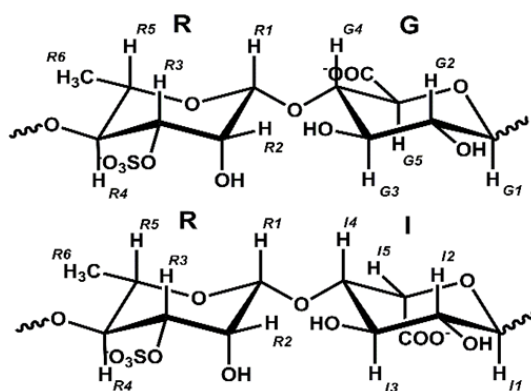
*Rys. 10. Fukoksantyna.*

### 4.3.3. Siarczanowe polisacharydy

Siarczanowe polisacharydy (ang. *Sulfated Polysaccharides* - SPs) zbudowane są z wielu (10-30000) cząsteczek cukrów prostych połączonych wiązaniami glikozydowymi, dodatkowo zawierają w swoich cząsteczkach grupy siarczanowe. Związki te należą do grupy kwaśnych polisacharydów, ponieważ w ich skład wchodzi reszty kwasowe, takie jak grupy siarczanowe i kwasy uronowe [12, 13]. Biorąc pod uwagę trzy grupy glonów, tj. brunatnice (*Phaeophyceae*), krasnorosty (*Rhodophyta*) i zielenice (*Chlorophyta*), wyróżnia się SPs specyficzne dla każdej z tych grup. Fukoidany są polisacharydami charakterystycznymi dla brunatnic, galaktany – dla krasnorostów, a ulvany – dla zielenic. Ulvany są głównie z glukozy, ramnozy, ksylozy, kwasu glukuronowego i iduronowego, mogą również zawierać w swoich cząsteczkach mannozę, arabinozę czy też galaktozę [53]. Skład monosacharydów i sposób ich połączenia w ulvanach jest bardzo różnorodny i zmienny w zależności od wielu czynników: gatunku glonów, środowiska ich występowania, warunków środowiskowych i pory roku [54, 55], a także od zastosowanej metody ekstrakcji tych substancji [56]. Niemniej jednak stwierdzono, że charakterystyczną cechą ulwanów są powtarzające się mery 3-siarczanu ramnozy połączonego wiązaniem (1,4)- $\alpha$ -glikozydowym z kwasem glukuronowym bądź też iduronowym [57]. Podobnie jak inne związki z grupy polisacharydów ulvany są substancjami półkrystalicznymi, barwy białej, o właściwościach higroskopijnych, rozpuszczalnymi w gorącej wodzie i w roztworach alkaliów, po ostudzeniu pęcznieją w wodzie tworząc żele [38, 58]. Ulvany stanowiły główny obiekt badawczy w przedstawionej pracy doktorskiej spośród grupy SPs.

Aktywność biologiczna SPs, w tym ulwanów, jest bardzo zróżnicowana. Wykazano m.in. właściwości antyoksydacyjne [59], antyproliferacyjne i apoptotyczne [60] ulwanów. Substancje te charakteryzują się także działaniem immunostymulującym [61], antykoagulacyjnym [62], antyhiperlipidemicznym [63], antybakteryjnym [64] i przeciwwirusowym [65]. Podobnie jak inne polisacharydy, ulvany mogą pełnić funkcje humektantów w produktach kosmetycznych, tj. substancji nawilżających skórę poprzez absorpcję wody, zapobiegających jej wysuszeniu oraz chroniących przed szkodliwym działaniem substancji chemicznych i drobnoustrojów [12]. Ulvany mają szanse znaleźć zastosowanie również jako składniki aktywne kosmetyków typu *anti-aging* ze względu na aktywność antyoksydacyjną [59], zdolność do regeneracji tkanek skóry [66], oraz indukcję syntezy kolagenu w skórze spowodowaną wysoką zawartością cząsteczek ramnozy [67]. Z uwagi na właściwości przeciwutleniające [59], przeciwbakteryjne [64] i żelotwórcze [38, 58] ulvany działają także jako stabilizatory, konserwanty oraz zagęstniki produktów kosmetycznych. Zagadnienie aktywności biologicznej ulwanów, ich budowy i metod izolacji zostało szerzej opisane w **Załączniku VI**.

SPs są metabolitami pierwotnymi glonów, pełniącymi główne funkcje budulcowe i zapasowe. Substancje te występują w dużych ilościach w ścianach komórkowych glonów, stąd często są nazywane kwaśnymi polisacharydami glonowymi [13]. Węglowodany stanowią najliczniejszą grupę związków biologicznie aktywnych występujących w algach, stanowią bowiem około 60% wszystkich substancji czynnych wytwarzanych przez glony [12]. Liczba dostępnych danych dotyczących badań nad polisacharydami w gatunkach słodkowodnych glonów wynosi niespełna 6%, podczas gdy dla alg morskich – aż 94%. Do tej pory ulwany były izolowane tylko i wyłącznie z morskich gatunków glonów *Ulva*, m.in.: *U. flexuosa*, *U. lactuca* [17], *U. armoricana*, *U. rotundata*, *U. scandinavica*, *U. gigantea* [54], *U. rigida* [68], *U. clathrata* [69], czy też *U. pertusa* [70]. W **Załączniku III** zostały przedstawione przełomowe badania dotyczące izolacji ulwanów ze słodkowodnych makrozielenic. Struktura wyizolowanych ulwanów jest przedstawiona na Rysunku 11. W badaniach wykryto obecność ulwanów nie tylko w słodkowodnym gatunku *U. flexuosa*, ale również w zielenicy *C. glomerata*. Przedstawione w publikacji widma FT-IR oraz <sup>1</sup>H NMR jednoznacznie wskazują na podobieństwo substancji wyizolowanych z dwóch różnych gatunków glonów. Co więcej przeprowadzone badania pokazują wyższą zawartość ulwanów w słodkowodnej zielenicy *C. glomerata* niż w *U. flexuosa*. Widać również wyraźną zmienność sezonową izolowanych substancji zarówno pod względem ich zawartości w glonach, jak i składu pierwiastkowego. Biorąc pod uwagę różnorodne właściwości ulwanów w zakresie aktywności biologicznej [**Załącznik VI**] można stwierdzić, że słodkowodne glony *C. glomerata* i *U. flexuosa* stanowią nowy naturalny surowiec o szerokich perspektywach zastosowań. Ulwany izolowane z tych gatunków zielenic mogą być w przyszłości wykorzystywane w medycynie, farmacji i kosmetyce jako substancje biologicznie czynne o wielokierunkowym działaniu.



Rys. 11. Budowa ulwanów (R – ramnoza, G – kwas glukuronowy, I – kwas iduronowy) [**Załącznik III**].

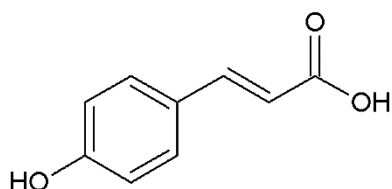
#### 4.3.4. Polifenole

Polifenole to złożona grupa związków, których wspólną cechą charakterystyczną jest obecność pierścienia aromatycznego zawierającego dwie lub więcej grupy hydroksylowe. Ze względu na ilość pierścieni aromatycznych w cząsteczce wyróżnia się fenole proste zawierające jeden pierścień, np. kwas galusowy i pirokatechol, oraz fenole złożone, tj. zbudowane z dwóch lub więcej pierścieni aromatycznych, jak np. kwas usninowy i hiperycyna. Istnieje wiele związków zaliczanych do grupy polifenoli, m.in.: kwasy polifenolowe, flawonoidy, izoflawonoidy, antocyjany, katechiny, kumaryny, czy też stilbeny [12]. Z uwagi na obecność układu wiązań sprzężonych w pierścieniu aromatycznym polifenole absorbują promieniowanie UV-VIS przy długości fali około 280 nm. Związki fenolowe zazwyczaj są bezbarwne, niemniej jednak istnieje również wiele związków barwnych, przykładowo flawonoidy są zazwyczaj żółte, a antocyjany niebiesko-fioletowe. Obecność wielu grup hydroksylowych w cząsteczce determinuje właściwości antyoksydacyjne tych substancji [13].

Związki polifenolowe posiadają głównie właściwości antyoksydacyjne i przeciwrodnikowe. Działanie to opiera się na dwóch mechanizmach. Pierwsze z nich polega na inaktywacji reaktywnych form tlenu, drugie natomiast dotyczy zapobiegania powstawaniu wolnych rodników przez polifenole. Szczególnie duże znaczenie dla przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego mają flawonoidy. Hamują one aktywność enzymów biorących udział w reakcjach powstawania wolnych rodników, chelatują jony metali przejściowych, a także zapobiegają utlenianiu witaminy C. Oprócz działania antyoksydacyjnego flawonoidy działają ochronnie na naczynia krwionośne, zapobiegają ich kruchości i pękaniu, stąd znajdują zastosowanie jako składniki preparatów do cery naczynkowej, jak również w leczeniu żyłaków i miażdżycy. Substancje te wykazują też aktywność przeciwzapalną, przeciwalergiczną i przeciwobrzękową. Z kolei izoflawonoidy, które są pochodnymi flawonoidów, łagodzą stany zapalne skóry i jej podrażnienia, działają promieniochronnie oraz zmniejszają oparzenia słoneczne. Co więcej, są one wykorzystywane w preparatach typu *anti-aging*, gdyż działają antyoksydacyjnie, stymulują syntezę kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego w skórze, dzięki czemu poprawiają jej elastyczność, gęstość i nawilżenie. Natomiast kwasy fenolowe są surowcami o aktywności przeciwzapalnej, przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwrodnikowej [13]. A zatem polifenole stanowią surowiec biologicznie czynny znajdujący zastosowanie w różnorodnych preparatach kosmetycznych, tj. do skóry dojrzałej, wrażliwej, alergicznej i naczynkowej.

Glony są jednym z naturalnych surowców bogatych w związki polifenolowe, które są wytwarzane w nich jako metabolity wtórne. Powstają one w warunkach stresowych jako odpowiedź na dany bodziec i pełnią tym samym funkcje ochronne

wobec czynników biotycznych (np. atak patogenów) i abiotycznych (np. promieniowanie UV, obecność metali ciężkich) [12, 71]. Brunatnice i niektóre zielenice z klasy sprężnic zawierają duże ilości wielopierścieniowych polifenoli, takich jak fukole, floretole, fukofloretole. Związki te należą do grupy florotanin i posiadają właściwości bakterio- i fungistatyczne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, antybiotyczne, antyoksydacyjne, jak również chelatujące jony metali [72]. Morskie gatunki brunatnic *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* [73] oraz *Eisenia bicyclis* [74] są szczególnie bogate we florotaniny i inne związki z grupy polifenoli. Krasnorosty (np. *Palmaria palmata*, *Porphyra tenera*), makrozielenice (*Ulva clathrata*, *Ulva rigida*) oraz mikrozielenice (*Chlorella pyrenoidosa*, *Spirulina platensis*) są również źródłem polifenoli, niemniej jednak zwykle zawierają ich o wiele mniej niż brunatnice [74-76]. Natomiast danych literaturowych odnośnie związków polifenolowych w słodkowodnych glonach jest bardzo niewiele. Przykładowo, w słodkowodnych makroglonach z gatunku *C. glomerata* wykryto do tej pory jedynie kwas kumarynowy (Rys. 12), kwas benzoesowy [11], metoksyfenyl i ester fenyłowy [10], z kolei w makrozielenicy *Chara hispida* - kwas kumarynowy [11]. W **Załączniku II** przedstawiona została analiza ilościowa związków fenolowych w *C. fragilis*, *C. glomerata* oraz *U. flexuosa* wykonana za pomocą metody Folin-Ciocalteu. Gatunek *C. fragilis* zawierał największą całkowitą zawartość związków fenolowych spośród badanych zielenic. Dlatego też glon ten posiada najlepsze perspektywy zastosowań jako naturalne źródło polifenoli.



Rys. 12. Kwas kumarynowy.

#### 4.3.5. Makroelementy i mikroelementy

Jony makro- i mikroelementów są bardzo istotne dla właściwego funkcjonowania organizmu człowieka. Makroelementami określa się pierwiastki potrzebne organizmowi w dużych ilościach, dla człowieka zapotrzebowanie na nie wynosi ponad 100 mg na dobę. Do grupy tej zaliczane są: węgiel, tlen, wapń, fosfor, sód, potas, chlor, siarka i krzem. Natomiast do mikroelementów należą pierwiastki niezbędne dla organizmu w ilościach śladowych, tj. poniżej 100 mg na dobę dla człowieka. Wśród mikroelementów wyróżnia się następujące pierwiastki: bor, cynk, fluor, jod, kobalt, magnez, mangan, miedź, molibden, selen, wanad i żelazo [12]. Każdy z wymienionych pierwiastków pełni odmienne funkcje w organizmie, ponadto wiele z nich wykazuje korzystne działanie na skórę. Dlatego też zarówno makro-, jak i mikroelementy są pożądanymi składnikami kosmetyków, czy też suplementów diety.

W składzie pierwiastkowym glonów występuje wiele makro- i mikroelementów. Jony tych pierwiastków występują w algach w dobrze przyswajalnej postaci, np. jako związki kompleksowe. Dzięki temu są one łatwo wchłaniane przez skórę w postaci naniesionego kosmetyku lub z przewodu pokarmowego, np. w postaci suplementu diety. Glony są źródłem łatwo przyswajalnych makroelementów, takich jak: sód, potas, wapń i chlor. Zawierają również znaczne ilości następujących mikroelementów: cynk, miedź, jod, żelazo i mangan [12]. Obecność tych pierwiastków w plechach glonów jest związana z tym, że ich ściany komórkowe są łatwo przepuszczalne dla związków o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak woda i gazy, czy właśnie jonów [77]. Dlatego też algi żyjące w środowiskach morskich charakteryzują się wyższą zawartością jodu, czy też potasu w biomacie, w przeciwieństwie do alg słodkowodnych. Z tego też powodu glony morskie cieszą się większym zainteresowaniem przemysłu kosmetycznego, niż gatunki słodkowodne. Podobna tendencja występuje w przypadku ilości artykułów naukowych w bazie Web of Science™. Ilość danych na temat składu pierwiastkowego alg morskich jest zdecydowanie dominująca i wynosi 82%, natomiast pozostałe 18% dotyczy glonów słodkowodnych. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej pokazują, że glony występujące w wodach słodkich także mogą zawierać pierwiastki wartościowe dla skóry. **Załącznik I** przedstawia analizę składu pierwiastkowego słodkowodnej zielenicy *C. glomerata*. Wyniki badań pokazują, że glon ten jest bogatym źródłem wapnia, potasu i magnezu, w mniejszych ilościach zawiera także sód, żelazo, miedź i cynk. Szczególnie wysoka zawartość wapnia w *C. glomerata* może wynikać z obecności okrzemek, które bytują na powierzchni plechy tego glonu. Zawartość mikro- i makroelementów w *C. glomerata* wskazuje na potencjalne możliwości wykorzystania tego glonu w przemyśle kosmetycznym, jak również spożywczym.

## 4.4. Zastosowanie ekstraktów z zielenic słodkowodnych w kosmetyce

W poprzednich rozdziałach opisano związki bioaktywne wykryte w badanych zielenicach słodkowodnych, a także scharakteryzowano opracowane metody izolacji tych substancji. W badaniach dowiedziono, że glony z gatunku *C. glomerata*, *C. fragilis* oraz *U. flexuosa* zawierają różnorodne grupy metabolitów biologicznie czynnych o unikalnych, wielokierunkowych właściwościach. Ze względu na zróżnicowaną aktywność biologiczną tych związków opisane gatunki makrozielenic mogą być w przyszłości wykorzystane w wielu rodzajach produktów kosmetycznych.

Pierwszym przykładem kosmetyków, w których można zastosować ekstrakty z badanych zielenic słodkowodnych są różnego rodzaju emulsje kosmetyczne, przede wszystkim kremy nawilżające, odżywcze, typu *anti-aging*, czy też przeciwzmarszczkowe. Działanie nawilżające ekstraktów z analizowanych glonów wynika z obecności humektantów, takich jak SPs, a także emolientów – kwasów tłuszczowych. Właściwości odżywcze badane zielenice zawdzięczają również kwasom tłuszczowym, natomiast przeciwstarzeniowe – antyoksydantom, takim jak karotenoidy i polifenole. Dodatkowo związki polifenolowe są odpowiedzialne za uszczelnianie naczyń krwionośnych, stąd wynika możliwość aplikacji opisanych glonów w kosmetykach przeznaczonych do cery naczynkowej. Przedstawione algi mogą również stanowić składniki balsamów do ciała służących ochronie przeciwsłonecznej ze względu na stosunkowo wysoką zawartość substancji promieniochronnych – karotenoidów i związków fenolowych. Z uwagi na obecność różnorodnych minerałów, takich jak wapń, magnez i cynk, a także ulvanów i kwasów tłuszczowych, wyciągi z *C. glomerata* mogą być aktywnymi składnikami maseczek kosmetycznych o działaniu nawilżającym, odżywczym i oczyszczającym. Zawartość SPs w analizowanych glonach warunkuje możliwość ich aplikacji w szamponach, żelach po prysznic i innych produktach myjących dzięki działaniu pianotwórczemu tych związków. Ponadto kwasy tłuszczowe i wspomniane polisacharydy są powszechnie stosowanymi środkami nawilżającymi i kondycjonującymi w odżywkach, czy też maseczkach do włosów, a także mogą być wykorzystane jako środki konserwujące, emulgatory oraz stabilizatory produktów kosmetycznych. Co więcej, badane zielenice zawierają duże ilości barwników, takich jak chlorofile i karotenoidy, dlatego też istnieją perspektywy zastosowania wyciągów z tych glonów jako naturalnych surowców barwiących w kosmetyce kolorowej [12, 13, 78].

Ostatnim etapem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej było wykazanie, że ekstrakty z badanych glonów słodkowodnych mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako nowe surowce kosmetyczne. W tym celu została przeprowadzona analiza *in vitro* właściwości antyoksydacyjnych uzyskanych

wyciągów. Wyniki tych badań zostały opisane w **Załączniku II** i wskazują one, że ekstrakty z *U. flexuosa* charakteryzują się największym potencjałem przeciwutleniającym wśród pozostałych badanych gatunków zielenic. Z drugiej strony makrozielenica *C. fragilis* zawierała najbogatszy skład substancji bioaktywnych, takich jak karotenoidy i polifenole. Natomiast glonem przebadanym w największym zakresie w ramach pracy doktorskiej był zielenica *C. glomerata*. Gatunek ten został przeanalizowany zarówno pod kątem zawartości substancji biologicznie czynnych (kwasy tłuszczowe, karotenoidy, SPs, polifenole) i składu pierwiastkowego, jak również właściwości *in vitro* (potencjał antyoksydacyjny) oraz *in vivo* (badania aplikacyjne kremów z udziałem ochotników). Testy aplikacyjne *in vivo* dotyczyły emulsji kosmetycznych typu O/W (olej w wodzie), zawierających wyciąg z *C. glomerata* (Rys. 13). Wyniki tego eksperymentu pokazują, że po 4-tygodniowej aplikacji kremu z dodatkiem opisanego ekstraktu wyraźnie wzrasta nawilżenie i elastyczność skóry. Do badań wykorzystano aparat Courage + Khazaka Electronic GmbH, składający się z korneometru służącego do pomiaru nawilżenia skóry i kutometru, który mierzy elastyczności skóry (Rys. 14). Dokładny opis testów aplikacyjnych znajduje się w **Załączniku IV**. Badania aplikacyjne z udziałem ochotników zostały wykonane w oparciu o zgodę (o numerze: 649/16) Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Rys. 15).



Rys. 13. Emulsje kosmetyczne zawierające ekstrakt z *C. glomerata*;  
autor: Joanna Fabrowska.



*Rys. 14. Aparat Courage + Khazaka Electronic GmbH: 1- kutometr; 2 – korneometr;  
autor: Joanna Fabrowska.*

Szereg wykrytych związków bioaktywnych, udowodnione działanie antyoksydacyjne, nawilżające i uelastyczniające ekstraktów otwiera perspektywy do wykorzystania badanych glonów jako nowych skutecznych surowców kosmetycznych. Dodatkowo za zastosowaniem słodkowodnych makrozielenic w kosmetyce przemawia ich naturalne pochodzenie, dostępność spowodowana corocznymi, masowymi zakwitami w zbiornikach wodnych Wielkopolski oraz, co za tym idzie, potencjalnie niskie koszty pozyskiwania. Warto więc kontynuować badania nad przedstawionymi makrozielenicami w celu uzyskania jak największej ilości informacji na temat zawartości substancji biologicznie czynnych, odpowiednich metod ich ekstrakcji, aktywności biologicznej, właściwości, a także bezpieczeństwa stosowania tych potencjalnych surowców kosmetycznych.



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 649/16

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 2 grudnia 1999 r. o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta (Dz. U. 2001, Nr 277, poz. 1314 i późn. zm.), Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 13 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad prowadzenia i finansowania oraz trybu udzielania karnych interwencji (Dz. U. Nr 47, poz. 478), Ustawy z dnia 4 września 2003, Prawo Farmaceutyczne (Dz. U. 2003, Nr 45, poz. 379 i późn. zm.), Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie ulgowego ulogowania odpowiedzialności cywilnej lekarza i stomiata (Dz. U. 2004, Nr 197, poz. 1014 i późn. zm.), Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 16 maja 2005 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie ulgowego ulogowania odpowiedzialności cywilnej lekarza i stomiata (Dz. U. Nr 197, poz. 492), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 29 kwietnia 2006 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. 2006, Nr 109, poz. 1248), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 10 kwietnia 2006 r. w sprawie ogłoszenia ulgowego ulogowania odpowiedzialności cywilnej lekarza i stomiata (Dz. U. Nr 104, poz. 2182), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2008 r. w sprawie sposobu wykonania przedklinicznych w związku z badaniami klinicznymi, wyjątkowy opis za zgodzie wykonawcy oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2008, Nr 232, poz. 1431, z późn. zm.), Ustawy z dnia 28 maja 2008 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2008, Nr 147, poz. 879, z późn. zm.), Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 4 października 2009 r. w sprawie ulgowego ulogowania odpowiedzialności cywilnej stomiata i lekarza stomiata w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2009, Nr 204, poz. 1298), Ustawy z dnia 14 marca 2011 r. o Czystym Rynku Przekazanie Czynnika, Wyrobów Medycznych i Przekazanie Badawczych (Dz. U. 2011, Nr 42, poz. 491), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 480), Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3 maja 2012 r. w sprawie sposobu dokonania przedklinicznych w związku z badaniami klinicznymi przedłożenia końcowego oraz w sprawie wyjątków i sposobu udzielenia opinii za zgodzie wykonawcy w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 28 maja 2008 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2012, Nr 9, poz. 491), w sprawie o Deklaracji Właściwości - Zasadę Złotej Reguły Postępowania w Diagnostyce Medycznej i Oceny Właściwości oraz przepisy ICD-10

**Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 16 czerwca 2016 r.**

**rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.**

**Kierownik projektu:**

**dr hab. Bogusława Łęska prof. UAM**

**Miejsce prowadzenia badań:**

**Zakład Chemii Supramolekularnej Wydziału Chemii,  
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

**Główny badacz: mgr Joanna Fabrowska**

**Członkowie zespołu**

**badawczego:**

**dr hab. Bogusława Łęska prof. UAM  
lek. med. Katarzyna Feliksik-Skrobich**

**Temat badań:**

**„Analiza in vitro i in vivo właściwości ekstraktów z glonów  
słodkowodnych jako nowych surowców kosmetycznych”.**

**Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku**

Przewodniczący Komisji

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński

Rys. 15. Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na wykonanie badań aplikacyjnych in vivo.

## 4.5. Literatura

- [1] Szweykowska A., Szweykowski J., Botanika. Systematyka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [2] Van den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M., Algae. An introduction to phycology, Cambridge University Press, Cambridge 1995.
- [3] Podbielkowski Z., Glony, Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa 1978.
- [4] Lewis L.A., McCourt R.M., Green algae and the origin of land plants, American Journal of Botany 91 (2004) 1535–1556.
- [5] Bellis V.J., McLarty D.A., Ecology of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. in southern Ontario, Journal of Phycology 3 (1967) 57-63.
- [6] Schroeder G., Messyasz B., Łęska B., Fabrowska J., Pikosz M., Rybak A., Biomasa alg słodkowodnych surowcem dla przemysłu i rolnictwa, Przemysł Chemiczny 92 (2013) 1380–1384.
- [7] Heiba H.I., Al-Easa H.S., Rizk A.F.M., Fatty acid composition of twelve algae from the coastal zones of Qatar, Plant Foods for Human Nutrition 51 (1997) 27–34.
- [8] Soltani S., Saadatmand S., Khavarinejad R., Nejadstattari T., Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz in Caspian Sea Coast, Iran, African Journal of Biotechnology 10 (2011) 7684-7689.
- [9] Khalid M.N., Shameel M., Ahmad V.U., The bioactivity and phycochemistry of two species of *Cladophora* (Siphonocladophyceae) from Sindh, Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences 49 (2012) 113-121.
- [10] Amornlerdpison D., Mengumphan K., Thumvijit S., Peerapornpisal Y., Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalga, *Cladophora glomerata* Kütz. Thai Journal of Agricultural Science 44 (2011) 283–291.
- [11] Kartal M., Orhan I., Abu-Asaker M., Senol F.S., Atici T., Sener B., Antioxidant and anticholinesterase assets and liquid chromatography-mass spectrometry preface of various fresh-water and marine macroalgae, Pharmacognosy Magazine 5 (2009) 291–297.

- [12] Molski M., Chemia piękna, PWN, Warszawa 2010.
- [13] Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A., Rośliny w kosmetyce i kosmetologii przeciwstarzeniowej, PZWL, Warszawa 2012.
- [14] Fletcher R., The occurrence of “green tides” — a review, w: Schramm W., Nienhuis S. (Ed.), Marine Benthic Vegetation; Recent Changes and the Effects of Eutrophication, Springer-Verlag, Nowy Jork 1996.
- [15] Manchu N., Melpha Y., Edwin James J., Phytochemical investigation of three species of *Ulva* from Rasthacaud coast, Tamil Nadu, India, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6 (2014) 570-574.
- [16] Uhrich A.V., Córdoba O.L., Flores M.L., *Ulva* species from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina: Seasonal and spatial biochemical variation and their relation with the production of bioactive metabolites, Ars Pharmaceutica 57 (2016) 67-75.
- [17] Castelar B., Reis P.R., dos Santos Calheiros A.C., *Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (Chlorophyta, Ulvophyceae) cultivation in Brazilian tropical waters: recruitment, growth, and ulvan yield, Journal of Applied Phycology 26 (2014) 1989–1999.
- [18] Sharmila S., Jeyanthi R.L., Phytochemical analysis of *Enteromorpha flexuosa* and *Ulva lactuca*: A comparative study, International Journal of Pharma and Bio Sciences 5 (2014) 830-834.
- [19] Pełechaty M., Pukacz A., Klucz do oznaczania gatunków ramienic (Characeae) w rzekach i jeziorach, Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Wydawnictwo Naukowe Gabriel Borowski, Warszawa 2008.
- [20] Khaliq-Uz-Zaman S.M., Shameel S., Shameel M., Leghari S.M., Ahmad V.U., Bioactive compounds in *Chara corallina* var. *wallichii* (A. Br.) R. D.Wood (Charophyta), Pakistan Journal of Botany 30 (1998) 19–31.
- [21] Schagerl M., Pichler C., Pigment composition of freshwater charophyceae, Aquatic Botany 67 (2000) 117–129.
- [22] Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z., Techniki separacyjne. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.

- [23] Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010.
- [24] Hu J., Guo Z., Glasius M., Kristensen K., Xiao L., Xu X., Pressurized liquid extraction of ginger (*Zingiber officinalis Roscoe*) with bioethanol: an efficient and sustainable approach, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5765–5773.
- [25] Korzeniowska K., Fabrowska J., Łęska B., Wieczorek P., Messyasz B., Rój E., Chojnacka K., Schroeder G., Optimization of methods of fatty acids extraction from biomass of *Schizochytrium limacinum*, w: Rój E. (Ed.), *Supercritical Fluid Applications, New Chemical Syntheses Institute*, Puławy 2016.
- [26] Herrero M., Castro-Puyana M., Mendiola J. A., Ibañez, E., Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds, *Trends in Analytical Chemistry* 43 (2013) 67–83.
- [27] Herrero M., Sánchez-Camargo A.P., Cifuentes A., Ibañez E., Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction, *Trends in Analytical Chemistry* 71 (2015) 26–38.
- [28] Quitain A.T., Kai T., Sasaki M., Goto M., Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 5792–5797.
- [29] Janiszewska E., Witrowa-Rajchert D., Ekstrakcja nadkrytyczna w przemyśle spożywczym, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 4 (2005) 5-16.
- [30] Sajilata M.G., Singhal R.S., Kamat M.Y., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis* ARM 740 using response surface methodology, *Journal of Food Engineering* 84 (2008) 321-326.
- [31] Macias-Sanchez M.D., Mantell C., Rodriguez M., Martinez de la Osa E., Lubian L.M., Montero O., Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent, *Journal of Separation Science* 31 (2008) 1352-1362.
- [32] Wu Z., Wu S., Shi X., Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*, *Journal of Food Process Engineering* 30 (2007) 174-185.

- [33] Herrero M., Martin-Alvarez P.J., Senorans F.J., Cifuentes A., Ibáñez E., Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga, *Food Chemistry* 93 (2005) 417–423.
- [34] El Hattab M., Culioli G., Piovellet L., Chitour S.E., Valls R., Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Diclyopteris membranacea*, *Journal of Chromatography A* 1143 (2007) 1-2.
- [35] Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering* 117 (2013) 426–436.
- [36] Wang T., Jónsdóttir R., Kristinsson H.G., Hreggvidsson G.O., Jónsson J.O., Thorkelsson G., Ólafsdóttir G., Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*, *Food Science and Technology* 43 (2010) 1387-1393.
- [37] Li S., Zhang H., Han D., Row K.H., Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from some marine algae by response surface methodology, *Korean Journal of Chemical Engineering* 29 (2012) 650-656.
- [38] Alves A., Caridade S.G., Mano J.F., Sousa R.A., Reis R.L., Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae, *Carbohydrate Research* 345 (2010) 2194–2200.
- [39] Stryer L., Jeremy B.M., Tymoczko J.L., *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
- [40] Widomska J., Kostecka-Gugała A., Latowski D., Calorimetric studies of the effect of cis-carotenoids on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers, *Biophysical Chemistry* 140 (2009) 108-114.
- [41] Rivera S.M., Canela-Garayoa R., Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials, *Journal of Chromatography A* 1224 (2012) 1-10.
- [42] Igielska-Kalwat J., Wawrzyńczak A., Nowak I., Karotenoidy i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, *Chemik* 2 (2012) 140-144.

- [43] Vilchez C., Forjan E., Cuaresma M., Bedmar F., Garbayo I., Vega J.M., Marine Carotenoids: Biological functions and commercial applications, *Marine Drugs* 9 (2011) 319-333.
- [44] Le Tutour B., Benslimane F., Gouleau M.P., Gouygou J.P., Saadan B., Quemeneur F., Antioxidant and prooxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*, *Journal of Applied Phycology* 10 (1998) 121-129.
- [45] Milledge J.J., Nielsen B.V., Bailey D., High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 15 (2016) 67-88.
- [46] Jesus Raposo M.F., Bernardo de Morais A.M.M., Santos Costa de Morais R.M., Carotenoids from Marine Microalgae: A Valuable Natural Source for the Prevention of Chronic Diseases, *Marine Drugs* 13 (2015) 5128-5155.
- [47] Heo S.J., Yoon W.J., Kim K.N., Ahn G.N., Kang S.M., Kang D.H., Affan A., Oh C., Jung W.K., Jeon Y.J., Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2045-2051.
- [48] Pádua D., Rocha E., Gargiulo D., Ramos A.A., Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer, *Phytochemistry Letters* 14 (2015) 91-98.
- [49] Shimoda H., Tanaka J., Shan S.J., Maoka T., Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (2010) 1137-1145.
- [50] Bian Q., Gao S., Zhou J., Qin J., Taylor A., Johnson E.J., Tanq G., Sparrow J.R., Gierhart D., Shanq F., Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells, *Free Radical Biology and Medicine* 53 (2012) 1298-1307.
- [51] Maoka T., Tokuda H., Suzuki N., Kato H., Etoh H., Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxyxynitrite, *Marine Drugs* 10 (2012) 1391-1399.

- [52] Ma L., Lin X.-M., Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (2010) 2–12.
- [53] Robic A., Lahaye M., Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds, *Biomacromolecules* 6 (2007) 1765-1774.
- [54] Lahaye M., Alvarez-Cabal Cimadevilla E., Kuhlenkamp R., Quemener B., Lognone V., Dion P., Chemical composition and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta), *Journal of Applied Phycology* 11 (1999) 1–7.
- [55] Robic A., Sassi J.-F., Dion P., Lerat Y., Lahaye M., Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany Coast, *Journal of Phycology* 45 (2009) 962–973.
- [56] Siddhanta A.K., Goswami A.M., Ramavat B.K., Mody K.H., Mairh O.P., Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 30 (2001) 166–172.
- [57] Lahaye M., Axelos M.A.V., Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.), *Carbohydrate Polymers* 22 (1993) 261–265.
- [58] Alves A., Sousa R.A., Reis R.L., A practical perspective on ulvan extracted from green algae, *Journal of Applied Phycology* 25 (2013) 407–424.
- [59] Qi H., Sun Y. Antioxidant activity of high sulfate content derivative of ulvan in hyperlipidemic rats, *International Journal of Biological Macromolecules* 76 (2015) 326–329.
- [60] Ahmed O.M., Ahmed R.R., Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Cancer Science & Therapy* 6 (2014) 2002-2008.
- [61] Leiro J.M., Castro R., Arranz J.A., Lamas J., Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh., *International Immunopharmacology* 7 (2007) 879–888.

- [62] El-Baky H.H.A., Baz F.K.E., Baroty G.S.E., Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L., Academic Journal of Cancer Research 2 (2009) 1–11.
- [63] Yu P.Z., Zhang Q.B., Li N., Xu Z.H., Wang Y.M., Li Z.E., Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity, Journal of Applied Phycology 15 (2003) 21–27.
- [64] Gadenne V., Lebrun L., Jouenne T., Thebault P., Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 112 (2013) 229–236.
- [65] Aguilar-Briseño J.A., Cruz-Suarez L.E., Sassi J.-F., Ricque-Marie D., Zapata-Benavides P., Mendoza-Gamboa E., Rodriguez-Padilla C., Trejo-Avila L.M., Sulphated Polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* Seaweeds both Inhibit Viral Attachment/Entry and Cell-Cell Fusion, in NDV Infection, Marine Drugs 13 (2015) 697-712.
- [66] Chandika P., Ko S.-C., Jung W.-K., Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration, International Journal of Biological Macromolecules 77 (2015) 24–35.
- [67] Andrès E., Molinari J., Péterszegi G., Mariko B., Ruszova E., Velebny V., Faury G., Robert L., Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in agedependent alterations of connectives tissues, Pathologie Biologie 54 (2006) 420–425.
- [68] Lahaye M., Ray B., Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) - NMR analysis of ulvan oligosaccharides, Carbohydrate Research 283 (1996) 161-173.
- [69] Hernández-Garibay E., Zertuche-González J., Pacheco-Ruiz I., Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides, from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh, Journal of Applied Phycology 23 (2010) 537–542.
- [70] Pengzhan Y., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z., Pengcheng L., Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta), Pharmacological Research 48 (2003) 543–549.

[71] Stengel D.B., Connan S., Popper Z.A., Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application, *Biotechnology Advances* 29 (2011) 483-501.

[72] Czerpak R., Jabłońska-Trypuć A., Roślinne surowce kosmetyczne, MedPharm Polska, Wrocław 2008.

[73] Pavia H., B. Toth G.B., Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*, *Hydrobiologia* 440 (2000) 299-305.

[74] Machu L., Misurcova L., Ambrozova J.V., Orsavova J., Mlcek J., Sochor J., Jurikova T., Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products, *Molecules* 20 (2015) 1118-1133.

[75] Peña-Rodríguez A., Mawhinney T.P., Ricque-Marie D., Cruz-Suárez L.E., Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh, *Food Chemistry* 129 (2011) 491-498.

[76] Yildiz G., Celikler S., Vatan O., Dere S., Determination of the anti-oxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed *Ulva rigida* C. Agardh, *International Journal of Food Properties* 15 (2012) 1182-1189.

[77] Wang J., Chen C., Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotechnology Advances* 27 (2009) 195-226.

[78] Marzec A., *Chemia kosmetyków, surowce, półprodukty, preparatyka wyrobów*, Wyd. III, Wydawnictwo Dom Organizatora, Toruń 2009.

## 5. Podsumowanie

Celem naukowym rozprawy doktorskiej pod tytułem „Metody izolacji i analiza związków bioaktywnych z wybranych gatunków zielenic słodkowodnych” było opracowanie efektywnych metod ekstrakcji oraz identyfikacja substancji biologicznie czynnych w glonach słodkowodnych występujących w wodach śródlądowych na terenie Wielkopolski. Kolejnym krokiem było wykazanie, że zarówno biomasa, jak i ekstrakty z badanych glonów, mogą stanowić nowy surowiec dla przemysłu kosmetycznego.

Uzyskane wyniki przedstawiono w czterech oryginalnych publikacjach naukowych [Załączniki I-IV]. W artykule przeglądowym [Załącznik V] opisano zagadnienie aktualnego stanu wiedzy na temat wykrytych dotychczas substancji bioaktywnych w słodkowodnym gatunku *C. glomerata* oraz potencjalnych możliwościach jego wykorzystania w przemyśle kosmetycznym. Natomiast w rozdziale monografii [Załącznik VI] przedstawiono budowę i właściwości ulwanów, metody ich ekstrakcji i analizy, a także perspektywy zastosowań.

W wyniku przeprowadzonych badań zrealizowano następujące zadania:

- 1) opracowano metody izolacji związków biologicznie czynnych z badanych gatunków zielenic słodkowodnych, tj. ekstrakcji:
  - SFE do izolacji kwasów tłuszczowych z *C. glomerata*,
  - SFE z dodatkiem etanolu jako modyfikatora do izolacji karotenoidów i polifenoli z *C. glomerata*, *C. fragilis* i *U. flexuosa*,
  - gorącą wodą w połączeniu z hydrolizą enzymatyczną do izolacji siarczanowych polisacharydów (ulwanów) z *C. glomerata* i *U. flexuosa*,
- 2) oznaczono substancje bioaktywne w otrzymanych ekstraktach z uwzględnieniem analizy ilościowej i jakościowej:
  - kwasy tłuszczowe w *C. glomerata*,
  - karotenoidy w *C. glomerata*, *C. fragilis* i *U. flexuosa*,
  - polifenole w *C. glomerata*, *C. fragilis* i *U. flexuosa*,
  - siarczanowe polisacharydy w *C. glomerata* i *U. flexuosa*,
- 3) opracowano metodę ekstrakcji poprzez mineralizację mikrofalową i oznaczono makro- oraz mikroelementy w *C. glomerata*,
- 4) zbadano właściwości antyoksydacyjne *in vitro* otrzymanych ekstraktów,
- 5) przeprowadzono badania aplikacyjne *in vivo* emulsji kosmetycznych zawierających ekstrakt z *C. glomerata*.

Otrzymane wyniki wskazują na bogatą zawartość substancji biologicznie czynnych w badanych gatunkach słodkowodnych makrozielenic. Większość z opisanych związków została wykryta po raz pierwszy w analizowanych glonach. Udowodniono również właściwości antyoksydacyjne uzyskanych ekstraktów,

jak również działanie nawilżające i uelastyczniające na skórę. W ten sposób wykazano właściwości użytkowe słodkowodnych makroglonów, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako nowe surowce kosmetyczne.

## 6. Dorobek naukowy

### 6.1. Życiorys naukowy

Urodziłam się 03 lutego 1989 roku w Hrubieszowie. W 2008 r. ukończyłam I Społeczne Liceum Ogólnokształcące w Zamościu, w klasie o profilu biologiczno-chemicznym. W tym samym roku rozpoczęłam studia licencjackie na kierunku chemia środków bioaktywnych i kosmetyków na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W trakcie studiów byłam członkiem Koła Naukowego „Bioaktywni”, w którym czynnie działałam biorąc udział w konferencjach dla studentów chemii i organizując dni otwarte Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. W roku 2011 ukończyłam niniejsze studia broniąc pracy licencjackiej pt.: „Wpływ  $\beta$ -cyklodekstryny jako potencjalnego interferenta na właściwości elektrody ibuprofenowej” pod kierunkiem dr Joanny Lenik.

Studia magisterskie rozpoczęłam na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 2011 roku na kierunku chemia kosmetyczna. Będąc członkiem Naukowego Koła Chemików uczestniczyłam w licznych konferencjach. Zostałam dwukrotnie wyróżniona w konkursie na najlepsze wystąpienie ustne zdobywając III miejsce podczas XI Ogólnopolskiego Sympozjum NKCh (26-28.10.2012 r.) oraz I miejsce podczas XII Ogólnopolskiego Sympozjum NKCh (22-24.03.2013 r.). W czerwcu 2013 roku uzyskałam tytuł magistra chemii, broniąc pracę pt. „Zastosowanie alg i ekstraktów algowych w preparatach kosmetycznych”. Promotorem mojej pracy była prof. UAM dr hab. Bogusława Łęska.

W 2013 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Chemii Supramolekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W trakcie tych studiów byłam wykonawcą dwóch grantów krajowych. Pierwszy projekt NCBiR: PBS1/A1/2/2012 pt. „Innowacyjna technologia ekstraktów glonowych - komponentów nawozów, pasz i kosmetyków”; cz. 4: "Ocena właściwości użytkowych ekstraktów glonowych jako składników kosmetyków" był realizowany w latach 2012-2015. Natomiast drugi grant o numerze NCN: 2014/13/B/NZ8/04690, pt. „Fizykochemiczne i biologiczne przyczyny ekologicznej dominacji zielenic nitkowatych w wodach śródlądowych” jest w trakcie realizacji. Byłam również wykonawcą międzynarodowego grantu Ministerstwa Edukacji i Nauki Republiki Kazachstanu MON RK nr 339-21 pt. „Opracowanie sposobu oczyszczania zanieczyszczonej wody przy użyciu makroskopowych glonów nitkowatych” (kierownik zadania: prof. dr hab. Akmaral U. Issayeva, Wydział Ekologii i Biotechnologii, Południowo-Kazachstański Państwowy Uniwersytet im. M. Auezova w Shymkencie).

Podczas studiów doktoranckich odbyłam dwa zagraniczne staże naukowe realizowane w ramach programu Erasmus+. W okresie od 01.03.2015 r. do 31.08.2015 r. realizowałam praktyki w Institute of Food Science Research – CIAL (CSIC) w Madrycie w Hiszpanii, pod kierunkiem dr Miguel Herrero. Podczas stażu zajmowałam się m.in. optymalizacją warunków ekstrakcji dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym do izolacji karotenoidów i polifenoli ze słodkowodnych makrozielenic, analizą *in vitro* właściwości antyoksydacyjnych otrzymanych ekstraktów i oznaczaniem karotenoidów za pomocą metody HPLC-DAD-MS. Kolejny staż odbyłam w Zakładzie Chemii Analitycznej w Universidad de Valencia pod kierunkiem prof. Carmen Molins-Legua od 01.03.2017 do 31.05.2017 r. Tematem prowadzonych badań była synteza hydrożeli i membran na bazie ulwanów izolowanych z *C. glomerata*, oraz immobilizacja różnych materiałów (enzymów, nanocząstek) w otrzymanych membranach. W okresie 25.01.2016 – 26.02.2016 r. odbyłam także staż krajowy na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego, gdzie zajmowałam się analizą *in vitro* właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów algowych.

Jestem współautorką dwunastu publikacji w czasopiśmie, w tym sześciu z listy filadelfijskiej, oraz siedmiu rozdziałów w monografiach naukowych. Brałam udział w czternastu konferencjach międzynarodowych oraz dwudziestu dwóch krajowych.

## 6.2. Lista publikacji

### Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

#### Publikacje w czasopismach

- [1] Messyasz B., Łęska B., **Fabrowska J.**, Pikosz M., Rój E., Cieślak A., Schroeder G., Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the cosmetic industry, *Open Chemistry* 13 (2015) 1108–1118 (IF = 1,272; punkty MNiSW = 14).
- [2] **Fabrowska J.**, Ibañez E., Łęska B., Herrero M., Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae, *Algal Research* 19 (2016) 237–245 (IF = 5,303; punkty MNiSW = 40).
- [3] Pankiewicz R., Łęska B., Messyasz B., **Fabrowska J.**, Sołoducha M., Pikosz M., First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae, *Algal Research* 19 (2016) 348–354 (IF = 5,303; punkty MNiSW = 40).
- [4] **Fabrowska J.**, Kapuścińska A., Łęska B., Feliksik-Skrobich K., Nowak I., *In vivo* studies and stability study of *Cladophora glomerata* extract as a cosmetic active ingredient, *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research* 74 (2) (2017) 633-641 (IF = 0,96; punkty MNiSW = 15).
- [5] **Fabrowska J.**, Łęska B., Schroeder G., Słodkowodna *Cladophora glomerata* jako nowy potencjalny surowiec kosmetyczny, *Chemik* 69 (8) (2015) 491–497 (IF = 0; punkty MNiSW = 8).

#### Rozdziały w monografiach

- [1] **Fabrowska J.**, Łęska B., Ulvany – biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy izolowane z zielenic, w: *Rośliny – przegląd wybranych zagadnień*, Kropiwiec K., Szala M. (red.), Wydawnictwo Naukowe Tygiel, Lublin, 2016, s. 204-220, ISBN 978-83-65598-13-4.

## Pozostałe publikacje

### Publikacje w czasopismach

[1] Messyasz B., Łęska B., **Fabrowska J.**, Pikosz M., Cieślak A., Schroeder G., Effects of organic compounds on the macroalgae culture of *Aegagropila linnaei*, *Open Chemistry* 13 (2015) 1040-1044.

[2] **Fabrowska J.**, Chlorofile i karotenoidy jako substancje biologicznie czynne z alg, *Zagadnienia Aktualnie Poruszane przez Młodych Naukowców* 2 (2015) 440-441.

[3] **Fabrowska J.**, Wykorzystanie różnych metod ekstrakcji do izolacji chlorofilu i karotenoidów z alg, *Zagadnienia Aktualnie Poruszane przez Młodych Naukowców* 2 (2015) 434-439.

[4] Schroeder G., Łęska B., Messyasz B., Pikosz M., **Fabrowska J.**, Wytwarzanie ekstraktu z biomasy makroglonów do produkcji kosmetyków, *Przemysł Chemiczny* 94(3) (2015) 405-407.

[5] **Fabrowska J.**, Ekstrakty z alg otrzymywane metodą ekstrakcji nadkrytycznej jako wartościowe surowce kosmetyczne, *Dokonania Młodych Naukowców* 2 (1) (2014) 177-180.

[6] **Fabrowska J.**, Nowoczesne metody otrzymywania ekstraktów z alg w przemyśle kosmetycznym, *Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki* 7 (1) (2014) 107-113.

[7] Schroeder G., Messyasz B., Łęska B., **Fabrowska J.**, Pikosz M., Rybak A., Biomasa alg słodkowodnych surowcem dla przemysłu i rolnictwa, *Przemysł Chemiczny* 92 (2013) 1380-1384.

### Rozdziały w monografiach

[1] Korzeniowska K., **Fabrowska J.**, Łęska B., Wieczorek P., Messyasz B., Rój E., Chojnacka K., Schroeder G., Optimization of methods of fatty acids extraction from biomass of *Schizochytrium limacinum*, w: Rój E. (red.), *Supercritical Fluid Applications, New Chemical Syntheses Institute, Puławy, 2016, 121-130, ISBN: 978-83-935354-1-5*.

[2] Messyas B., Pikosz M., Schroeder G., Łęska B., **Fabrowska J.**, Identification and ecology of macroalgae species existing in Poland, w: Kim S.-K., Chojnacka K. (red.), Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, Wiley-VCH, Weinheim, vol. 1, 2015, s. 15-40, ISBN: 978-3-527-33708-8.

[3] Schroeder G., Łęska B., **Fabrowska J.**, Messyas B., Pikosz M., Analysis of green algae extracts, w: Kim S.-K., Chojnacka K. (red.), Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, Wiley-VCH, Weinheim, vol. 1, 2015, s. 81-100, ISBN: 978-3-527-33708-8.

[4] **Fabrowska J.**, Łęska B., Schroeder G., Messyas B., Pikosz M., Biomass and extracts of algae as material for cosmetics, w: Kim S.-K., Chojnacka K. (red.), Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, Wiley-VCH, Weinheim, vol. 2, 2015, s. 681-706, ISBN: 978-3-527-33708-8.

[5] **Fabrowska J.**, Łęska B., Algae and their chelating properties, w: Rybachenko V.I. (red.), From molecules to functional architecture, Supramolecular interactions, East Publisher House, Donetsk, 2012, s. 495-511, ISBN: 978-966-317-108-1.

[6] Rybak A., Messyas B., Łęska B., Pikosz M., **Fabrowska J.**, Wydajność asymilacji azotu na przykładzie wybranych gatunków roślin wodnych, w: Schroeder G., Grzesiak P. (red.), Środowisko i Przemysł, Cursiva, Poznań, 2012, 11-42, ISBN: 978-83-62108-18-3.

## 6.3. Konferencje naukowe

### Konferencje międzynarodowe

[1] 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 18-22.06.2017, Praga, Czechy; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, poster pt.: “HPLC as a tool to valorize freshwater green macroalgae from Poland”.

[2] Algae Europe, 13-15.12.2016, Madryt, Hiszpania; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, poster pt.: „Bioactive compounds analysis in freshwater green macroalga *Cladophora glomerata*”.

[3] International Conference on Supercritical Fluid Technologies and Applications, 20-21.10.2016, Puławy; Korzeniowska K., **Fabrowska J.**, Łęska B., Wieczorek P., Messyasz B., Rój E., Chojnacka K., Schroeder G., współautor, wystąpienie ustne pt.: “Optimization of methods of fatty acids extraction from biomass of *Schizochytrium limacinum*”.

[4] 2nd International Young Scientists Symposium “Plants in Pharmacy and Nutrition”, 15-17.09.2016, Wrocław; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: “Chemical composition and bioactivity studies of freshwater green macroalga *Cladophora glomerata*”.

[5] 3rd International Conference Water Resources and Wetlands, 08-10.09.2016, Tulcea, Rumunia; Łęska B., **Fabrowska J.**, Messyasz B., Pikosz M., Pankiewicz R., współautor, poster 1 pt.: “Fatty acids as example of active compounds contained in macroalga *Cladophora glomerata*”; Messyasz B., Pikosz M., Łęska B., Pankiewicz R., **Fabrowska J.**, współautor, poster 2 pt.: “The influence of habitat factors on filamentous green algae development forming monospecies mats in flowing and stagnant waters”.

[6] 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on Separation Sciences, 03-06.07.2016, Toruń; **Fabrowska J.**, Muszyńska M., Łęska B., autor prezentujący, poster 1 pt.: “Ulvan isolation from freshwater macroalga *Cladophora glomerata* and study of its seasonal variability”; **Fabrowska J.**, Musioł A., Pankiewicz R., Łęska B., autor prezentujący, poster 2 pt.: “Phenolic compounds analysis in freshwater *Cladophora glomerata* extracts obtained by microwave assisted extraction and supercritical fluid extraction”.

[7] 2nd Polish-Kazakh Meeting: Relationship Between Chemistry and Biology, 28.06.2016, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: “Carotenoids analysis in freshwater green algae extracts obtained by supercritical fluid extraction”.

[8] 40 Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Techniczne „Chemistry for Agriculture”, 29.11-02.12.2015, Karpacz; Messyasz B., Pikosz M., **Fabrowska J.**, Łęska B., Schroeder G., współautor, poster pt.: „Zróżnicowanie mat glonów makroskopowych w różnych typach wód śródlądowych jako źródło biomasy do wykorzystania gospodarczego”.

[9] VIII Reunion de Expertos en Tecnologias de Fluidos Comprimidos, 16-18.09.2015, Kadyks, Hiszpania; **Fabrowska J.**, Herrero M., Ibañez E., Mendiola J. A., Łęska B., autor prezentujący, poster pt.: “Analysis of bioactive compounds in freshwater green algae extracts obtained by supercritical fluid extraction”.

[10] Sixth European Phycological Congress, 23-29.08.2015, Londyn, Wielka Brytania; Messyasz B., Łęska B., Pikosz M., **Fabrowska J.**, Schroeder G., współautor, poster 1 pt. “Characteristic of bioactive compounds from biomass of freshwater *Cladophora glomerata*”; Łęska B., Messyasz B., **Fabrowska J.**, Pikosz M., Schroeder G., współautor, poster 2 pt.: “The effect of different Cu (II) concentrations on adsorption yield using freshwater *Cladophora*”.

[11] The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, 07-10.06.2015, San Diego, USA; Pankiewicz R., Łęska B., Messyasz B., **Fabrowska J.**, Soloducha M., Pikosz M., współautor, poster 1 pt.: “First isolation of polisacharidic ulvans from cell wall of freshwater algae”; **Fabrowska J.**, Łęska B., współautor, poster 2 pt.: “Study of the efficiency of different extraction methods of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae”.

[12] First Polish-Kazakh Meeting: Relationship Between Chemistry and Biology, 03.12.2014, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Freshwater algae extracts as a cosmetic raw material”.

[13] Balt Silica 2014, 01-03.06.2014, Poznań; **Fabrowska J.**, Połaniecka A., Łęska B., autor prezentujący, poster pt.: „Silsesquioxanes as a novel materials for cosmetics industry”.

[14] XXXVIII Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Techniczne: Chemistry for Agriculture, 01.04.12-2013, Karpacz; Messyasz B., Pikosz M., Łęska B., **Fabrowska J.**, Schroeder G., współautor, poster 1 pt.: „Słodkowodne glony makroskopowe jako substrat ekstraktów – czynniki optymalizujące rozwój biomasy”; Łęska B., **Fabrowska J.**, Messyasz B., Pikosz M., Schroeder G., współautor, poster 2 pt.: „Pozyskiwanie glonów makroskopowych wykorzystywanych w ekstraktach w przemyśle kosmetycznym”.

## Konferencje krajowe

[1] 59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Poznaniu „Między nami jest chemia”, 19-23.09.2016, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Analiza karotenoidów w słodkowodnych makrozielenicach z wykorzystaniem metody HPLC-DAD-MS”.

[2] Konferencja Młodych Naukowców „Nowe Wyzwania dla Polskiej Nauki”, 03.04.2016, Gdańsk; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Słodkowodne makroglony jako źródło karotenoidów”.

[3] VIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2016 „Interdyscyplinarność Kluczem do Rozwoju”, 12-13.03.2016, Lublin; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Ulvany – biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy izolowane z zielenic”.

[4] IX Konferencja Młodych Naukowców w Poznaniu: Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 12.12.2015, Poznań; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Metody oznaczania właściwości antyoksydacyjnych in vitro ekstraktów algowych”.

[5] II Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców: Nowe Oblicze Nauk Przyrodniczych, 14.11.2015, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Ekstrakcja chlorofili i karotenoidów z alg i roślin wodnych”.

[6] 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku, Polska Chemia w Mieście Wolności, 21.-25.09.2015, Gdańsk; **Fabrowska J.**, Łęska B., Herrero M., Ibañez E., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Analiza właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów ze słodkowodnej makroalgi *Cladophora glomerata*”.

[7] IV Konferencja Młodych Naukowców z Okazji Światowego Dnia Wody, 12-13.03.2015, Poznań; Sołoducha M., **Fabrowska J.**, Łęska B., współautor, poster pt.: „Analysis of heavy metals in *Cladophora glomerata* extracts”.

[8] VII Konferencja Młodych Naukowców we Wrocławiu: Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 17.01.2015, Wrocław; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Wykorzystanie różnych metod ekstrakcji do izolacji chlorofili i karotenoidów z alg”.

[9] IX Poznańska Konferencja Naukowa: Chemia – Nowe Wyzwania dla Nauki i Przemysłu, 05.12.2014, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., Schroeder G., autor prezentujący, poster 1 pt.: „Wykorzystanie ekstrakcji w stanie nadkrytycznym do izolacji niepolarnych związków bioaktywnych z alg”; Schroeder G., Łęska B., Messyas B., **Fabrowska J.**, współautor, poster 2 pt.: „Od biomasy alg do produktów komercyjnych”.

[10] I Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców: Nowe Oblicze Nauk Przyrodniczych, 15.11.2014, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., Schroeder G., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Glony z polskich zbiorników wodnych jako źródło kwasów tłuszczowych”.

[11] 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego: Chemia – Nadzieje i Marzenia, 14–18.09.2014, Częstochowa; **Fabrowska J.**, Połaniecka A., Łęska B., autor prezentujący, poster 1 pt.: „*Cladophora glomerata* jako nowy potencjalny surowiec kosmetyczny”; Połaniecka A., **Fabrowska J.**, Łęska B., współautor, poster 2 pt.: „Ekstrakty algowe - właściwości i wykorzystanie w kosmetyce”.

[12] III Konferencja Młodych Naukowców z Okazji Światowego Dnia Wody, 13-14.03.2014, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, poster 1 pt.: „Glony jako bioakumulatory metali ciężkich”.

[13] V Konferencja Młodych Naukowców w Poznaniu: Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, 01.12.2013, Poznań; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, poster pt.: „Nowoczesne metody otrzymywania ekstraktów z alg w przemyśle kosmetycznym”.

[14] XXXVIII Ogólnopolska Szkoła Chemii, 01-05.05.2013, Stary Gierałtów; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Ekstrakcja nadkrytyczna – innowacyjna metoda otrzymywania wyciągów z alg jako komponentów kosmetyków”.

[15] XII Ogólnopolskie Sympozjum NKCh UAM, 22-24.03.2013, Jeziory; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Ekstrakcja nadkrytyczna – innowacyjna metoda otrzymywania wyciągów z alg jako komponentów kosmetyków”.

[16] II Konferencja Młodych Naukowców z Okazji Światowego Dnia Wody, 21-22.03.2013, Poznań; **Fabrowska J.**, Łęska B., autor prezentujący, poster pt: „Algae extracts as a cosmetic raw materials”.

[17] XXXVII Ogólnopolska Szkoła Chemii, 07-11.11.2012, Sobieszewo; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Algi i ich właściwości chelatujące”.

[18] Ogólnopolskie Sympozjum NKCh UAM, 26-28.10.2013, Jeziory; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Algi i ich właściwości chelatujące”.

[19] X Ogólnopolskie Sympozjum NKCh UAM, 22-25.03.2012, Jeziory; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Nowe kierunki zastosowań cyklodekstryn”.

[20] XXXV Ogólnopolska Szkoła Chemii, 09-12.11.2011, Karpicko; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, poster pt.: „Kompleksy inkluzyjne cyklodekstryn – nowe możliwości dla przemysłu farmaceutycznego”.

[21] XXXIV Ogólnopolska Szkoła Chemii, 29.04.-03.05.2011, Jarnołtówek; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Wpływ  $\beta$ -cyklodekstryny jako potencjalnego interferenta na właściwości elektrody ibuprofenowej”.

[22] XXXIII Ogólnopolska Szkoła Chemii, 10-14.11.2010, Jastrzębia Góra; **Fabrowska J.**, autor prezentujący, wystąpienie ustne pt.: „Silikony + produkty naturalne = przepis na kosmetyk idealny”.



## **7. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

### **Załącznik I**

Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material  
for agriculture and the cosmetic industry

## Research Article

## Open Access

Beata Messyasz\*, Bogusława Leska, Joanna Fabrowska, Marta Pikosz, Edward Roj,  
Adam Cieslak, Grzegorz Schroeder

# Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the cosmetic industry

DOI: 10.1515/chem-2015-0124

received February 12, 2015; accepted June 12, 2015.

**Abstract:** This study was undertaken to determine mineral content, amino acid and fatty acid composition of the freshwater macroalga – *Cladophora glomerata*. The studies were based on the content comparison in algal biomass collected from a lake and cultured in a laboratory. To determine the ability of copper cumulating by macroalgae, *Cladophora* was cultured in the medium supplemented with Cu ions. This study indicated that the relative abundance of metals in filaments decreased in the following order: Ca > K > Mg > Na > Fe > Cu > Zn > Pb > As > Ni > Cd > Mn > Cr > Co. Total protein content ranged from 14.45% in *Cladophora* from a lake to 26.55% in *Cladophora* from a laboratory. The main amino acids analyzed were aspartic and glutamic acid. The fatty acid content in the dry matter of the extract varied depending on the extraction method used: ethylene alcohol (19.0%), acetone (34.5%) or supercritical fluid extraction (62.5%). Freshwater *C. glomerata* due to the macrominerals, trace elements, amino and fatty acids composition in the extracts can be a valuable resource for nutritional and cosmetic applications.

**Keywords:** macroalgal biomass, amino acids, fatty acids, extraction, biosorption

## 1 Introduction

Extensive development of macroscopic algae in freshwater ecosystems more and more often form spatially large mats [1-3] and quickly create environmental and recreation problems in a reservoir. Therefore, there is an urgent need to exploit such biomass [4] due to the growing problem closely related to the development of the agricultural economy (intensification of fertilization increases the concentration of N and P in the water which efficiently accelerates algae growth) and tourism (preference for clean water without biomass of macroalgae). Filamentous green algae from the genus *Cladophora* from marine ecosystems have been the subject of numerous studies on the use of their biomass as a source of biofuel [5-7]. Such studies were carried out mainly on macroalgae forming a large biomass in marine ecosystems [8,9]. Many studies of marine green algae from the genus *Cladophora* indicate the occurrence in their cells of different bioactive compounds, such as unsaturated and saturated fatty acids [10-12], sterols, terpenoids [13], phenolic compounds [14], and others, that make them a very useful raw material for nutritional and pharmaceutical applications. So far, only a few studies have been conducted on freshwater *Cladophora* species and their use as a natural source of bioactive compounds. However, a wide range of primary and secondary metabolites were found in freshwater *Cladophora glomerata* (L.) Kütz, e.g.: carotenoids [15], minerals, vitamin A, C, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> [16], amino acids and proteins [17], fatty acids, sterols, terpenes, carbohydrates, glycosides [18], volatiles and enzymes [19].

Using such tests, systematic studies were carried out on algae in terms of their possible use in agriculture, animal nutrition and the food or cosmetics industry. Thus, one of the aims of this study was to analyze the elemental composition and to determine the amino acid and fatty

**\*Corresponding author: Beata Messyasz:** Department of Hydrobiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan, Umultowska 89, 61-614 Poznan, Poland, , E-mail: messyasz@amu.edu.pl

**Bogusława Leska, Joanna Fabrowska, Grzegorz Schroeder:** Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznan, Umultowska 89B, 61-614 Poznan, Poland

**Marta Pikosz:** Department of Hydrobiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan, Umultowska 89, 61-614 Poznan, Poland

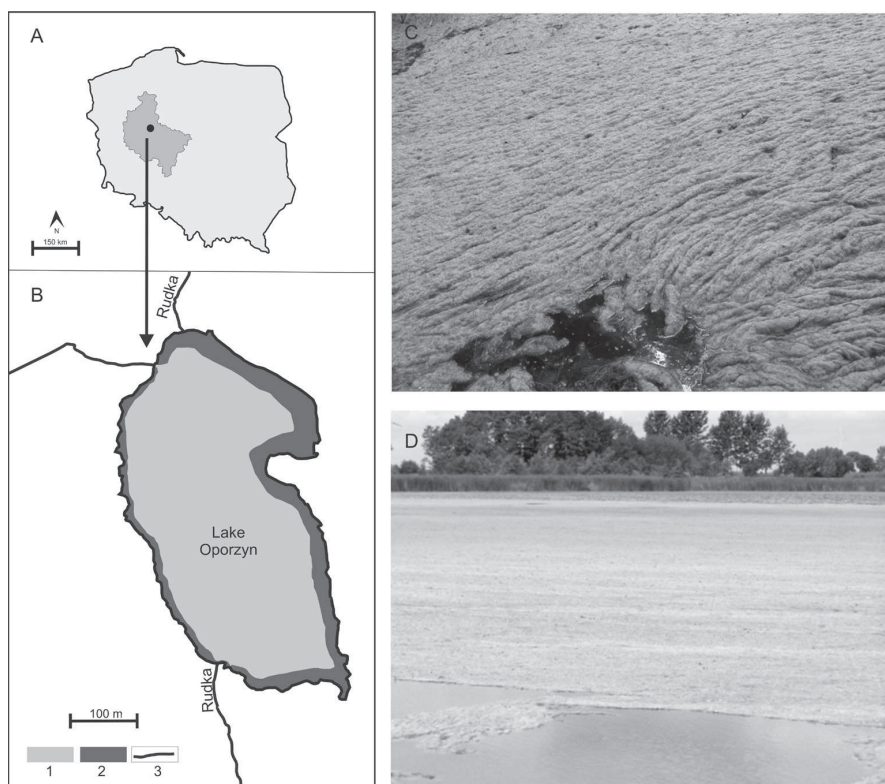
**Edward Roj:** Supercritical Extraction Department, Fertilizer Research Institute, Aleja Tysiaclecia Panstwa Polskiego 13a, 24-110 Pulawy, Poland

**Adam Cieslak:** Faculty of Animal Breeding and Biology, Poznan University of Life Science, Wolynska 33, 60-637 Poznan, Poland

 © 2015 Beata Messyasz et al., licensee De Gruyter Open.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 License.

Download Date | 9/8/15 3:30 PM



**Figure 1:** The study area in the Wielkopolska Region (Poland; A) with the indication of sampling station in Lake Oporzyn (B; 1 – the water surface area; 2 – the width of reed beds; 3 – a watercourse, a river) and a graphic presentation of the massive development of *Cladophora glomerata* in the form of dense mats (C, D).

acid content in the biomass of freshwater *Cladophora*. A negative factor for using macroscopic green algae, taking into account *Cladophora* biomass, can be *Cladophora*'s ability to accumulate heavy metals [20,21]. In recent years, the biosorption process using *Cladophora* species has been widely studied including such metals as chromium [22], lead [23], cadmium [24], selenium [25] and others [26]. At the same time, the controlled concentration of elements could be induced in the biosorption process into the algal biomass that would be useful in cosmetics or as dietary supplements. In this paper, the possibility of obtaining ecological components for cosmetic purposes by enriching the filamentous biomass of freshwater *Cladophora* with copper is also presented. Most of the literature sources concern the biosorption of copper (II) by marine *Cladophora* in wastewater treatment [27,28]. However, several studies have been conducted referring to the use of freshwater *Cladophora* as a biosorbent to remove copper (II) [26,29,30]. There is a lack of research of such processes in freshwater *C. glomerata*. Copper ions

presented in the studied material were selected for testing because they have anti-bacterial applications and can act as “free radical scavengers”. The question was asked whether the chemical composition of the biomass of freshwater macroscopic green algae, *Cladophora*, makes it a good raw material for commercial use.

## 2 Experimental procedure

### 2.1 Harvesting area of *Cladophora* biomass

The Oporzyn Lake is located near the village of Oporzyn, ca. 20 km north of Wagrowiec (in the northern part of the Wielkopolska region, Fig. 1). The lake is located in a hollow surrounded by hills with very steep slopes which facilitates the surface runoff from the surrounding farmland. It has an area of 15 ha and a mean depth of 1.2 m. The shore of the lake is covered with a wide

(to 10 m) and dense belt of rushes with *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Stued. and *Typha latifolia* L. as the dominant species. The lake is in the overgrowing phase and the pelagic zone is overgrown by *Ceratophyllum demersum* L. This submerged aquatic plant formed extremely dense layers that prevent access of light to the bottom of this lake and the development of other submerged plants.

Mats of filamentous green alga *C. glomerata* (L.) Kütz. of macroscopic size formed a large surface mat which freely float on the water surface (macroalgae coating); mat formation regularly repeated every year. Freshwater green algae were collected in the first week of July 2013 when dense mats of *Cladophora* tightly covered the water column of the shallow parts of Oporzyn Lake. Algae were collected manually from the middle of the mats floating on the surface of the lake water. Due to the fact that the mats were also observed in the pelagic zone, the biomass was harvested using boats applying a strip, a cable, or a special rake.

After the collection, fresh algal biomass (FM) was weighed immediately per 1 m<sup>2</sup> of the water surface. Then, the material was dried in a specialized drying oven until a dry matter (DM) having a water content of < 15% was obtained.

The basic physico-chemical parameters of the water (temperature, conduction and oxygen concentration as well as pH) at the examined sites with *Cladophora* were measured with the use of the *YSI Professional Plus* handheld multiparameter meter.

## 2.2 Macroalgae culture in the medium supplemented with Cu ions

In order to determine the ability of copper accumulation by macrogreen algae, *C. glomerata* from Oporzyn Lake was used. Filaments of *Cladophora* and water samples were collected in the natural habitat of the lake in September, 2013. In order to initiate the culture, samples of macroscopic green algae were carefully purified from organic matter and sand grains by hand. Then algal filaments (420 g of wet weight; one cell surface sorption area was 17.85 mm<sup>2</sup> and for a filament with 1 cm length this amounted to 119 cm<sup>2</sup>) were placed for 48 hours in distilled water at room temperature to acclimatize. Six liters of water from the lake and six liters of distilled water were filtered through Whatman GF/F glass fiber filters and sterilized. Glassware (1 liter flasks) were also sterilized. Algae were cultured in modified Wang's medium for a period of 7 and 14 days, respectively, at a constant temperature of 21°C and light intensity of 250 μmol photons m<sup>-2</sup> sek<sup>-1</sup> in a phytothron

(CONVIRON model CMP 6050) [31]. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O was used as the source of copper.

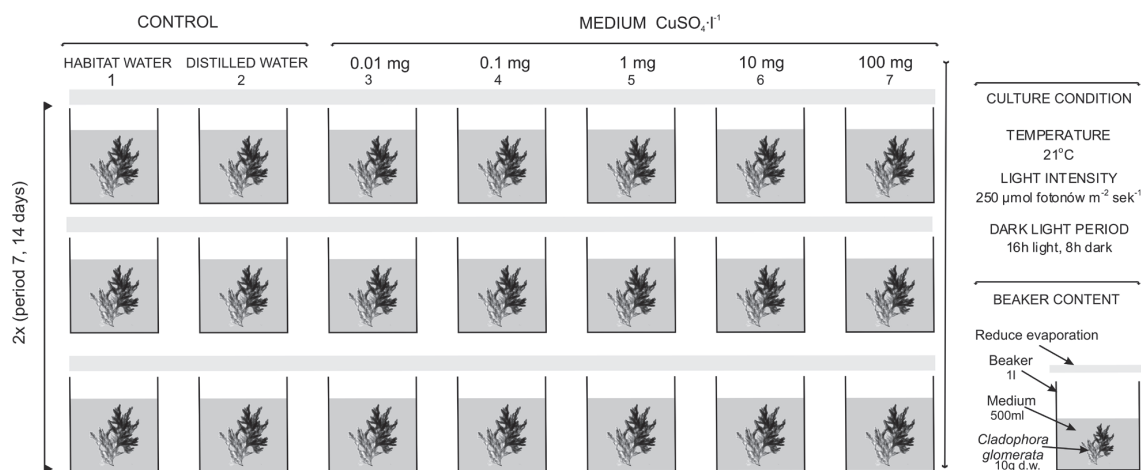
The experiment was composed of the control sample with water habitat (1) and five levels of enrichment of the medium with copper sulphate at different concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Each level was studied in triplicate using glass containers with 500 mL of medium and 10 g of fresh algae biomass (Fig. 2). Two series of experiments were performed; the first lasted for 7 days, the second for 14 days.

Each time, after completion of these series of experiments, the FM of *Cladophora* filaments was determined, as well as their DM after drying in a laboratory oven for 2 hours at the temperature of 105°C. Next, the filaments were put into plastic 100 mL containers.

## 2.3 Biomass, elements and amino acids analysis

The samples of *C. glomerata* collected from the lake and cultured in a laboratory were analyzed to determine dry biomass, ash, total protein, crude fiber and crude fat content. The process of element analysis was started with mineralization of dry biomass. The samples of 0.2 to 0.3 g of the dried *Cladophora* biomass were placed in Teflon reactors, then 10 mL of 65% nitric acid (V) (Sigma) was added, and left for 24 hours. The mineralization was conducted in a CEM Mars Xpress microwave oven. Process parameters were as follows: a first stage at a power of 800 W, temperature of 100°C, and time of 30 minutes; was followed by a second stage, power 800 W, temperature 130°C, time 30 minutes. After the mineralization, the samples were diluted with distilled water to 25 mL. Afterwards, the content of each selected element Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu, As, Cd, Ni, Pb, Cr, Mn and Co, was determined in the samples. The elemental analysis was carried out in Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (Varian ICP-OES VISTA-MPX) by ICP-OES method. The concentration of each element was expressed as μg g<sup>-1</sup> or mg g<sup>-1</sup> DM.

The algae samples were analyzed according to the AOAC [32], protocol no. 934.01 for dry matter, and method no. 942.05 for ash. Crude protein was determined with a Kjeldahl Automatic 16210 analyzer (method no. 976.05), crude fat with a Soxhlet System HT analyzer (method no. 2003.05), and crude fiber with a Tecator Fibertec System I (method no. 978.10). The content of N-free extractives was calculated as 1000 – (crude protein + crude fat + ash + crude fibre) and expressed as g kg<sup>-1</sup> DM. The samples of ground algae were subjected to acid hydrolysis with 6 M



**Figure 2:** Graphical summary of the macroalgae culture conditions in the medium supplemented with Cu ions composed in seven ranks for a period 7 and 14 days.

HCl at 110°C for 23 hours. Amino acids were determined using an AAA 400 amino acid analyser (INGOS, Czech Republic) with ion exchange chromatography. Post column ninhydrin-based detection in a sodium citrate buffer was used. The ninhydrin amino acid derivatives were detected using a column packing of OSTION Lg ANB (column height: 35 × 0.37 cm) at 570 nm for primary amino acids and at 440 nm for secondary amino acids.

## 2.4 Biomass extraction

The classical method of extraction (Soxhlet) was used. Separately, ethylene alcohol and acetone were used as solvents, in the proportion 1 g of dry *Cladophora* biomass for 25 ml of solvent. In the recent years, more and more attention has been paid to the applications of clean processes such as supercritical fluid extraction (SFE) which are used to isolate natural biologically active compounds from different raw materials, such as plants, food by-products, and micro- and macroscopic algae. Carbon dioxide is the most common solvent used as the supercritical fluid because of its moderate critical temperature (31.3°C) and pressure (72.9 atm); moreover it is considered to be a "green solvent" [33]. In the case of Supercritical Fluid Extraction of *Cladophora* biomass, the methods previously described in detailed by Roj et al. [34] and Kostrzewa et al. [35] were used. The extractions of *Cladophora* were carried out using the multi-purpose pilot unit for supercritical fluid extraction at three different pressures: 300 bar, 500 bar and 700 bar, at 45°C. A second extraction was performed at 700 bar and at 45°C. Pure

CO<sub>2</sub> was used as solvent, and samples were taken every 30 minutes.

## 2.5 Fatty acids analysis in extract

Analysis of fatty acids as methyl esters was carried out using gas chromatography (GC) combined with a mass detector from Thermo Fisher Scientific. In the analytic system, the chemical constituents were separated in a chromatography column and, then, were directed into the Mass Spectrometry Detector (MSD) where they were subjected to an electron beam and were fragmented. The resulting ion mixture was then monitored using one of the two techniques, SCAN or SIM. In the SCAN procedure, the detector swept a desired range of mass to charge ratio ( $m/z$ ) successively until the total area was covered. To identify a peak shape, 5 to 10 scans of each constituent were necessary. The Selected Ion Monitoring (SIM) method can monitor only a few selected ions. In this case a SCAN technique was used to analyze the extract composition. The methyl esters of fatty acids were prepared in compliance with the PN-EN ISO 5509 standard for "Plant and animal oils and fats". Preparation of methyl esters of fatty acids and the PN-EN ISO 5508 standard "Oils and plant and animal fats". An analysis of the methyl esters was carried out by gas chromatography using the TMSH (trimethylsulfonium oxide) based method. 10 mg of liquid sample was solved in 500 μL of t-butyl-methyl ether and slightly heated, if necessary. Then 250 μL of TMSH was added and the solution obtained was shaken intensely. The prepared solution was ready to be injected into a chromatographic column.

Chemical identification of the mass spectral peaks was done by comparison of retention times of the obtained peaks with available pattern peaks. The mass spectrum contains a number of peaks that present a relationship of ionic current vs.  $m/z$ , and was used to determine the structure to identify the chemical compound. The  $m/z$  ratio provides information on formula mass weight or its part. The identification can be confirmed by comparison of retention times. The quantitative analysis was based on external standards. It is assumed that standard samples and analyte constituents generate identical output signals if they contain the same components.

## 3 Results

### 3.1 Habitat of freshwater *Cladophora*

The mass appearance of *C. glomerata* in the late June period may result from the great fertility of the Rudka river water flowing into the lake. Average concentrations of  $N-NO_3^-$ ,  $N-NH_4^+$ ,  $P-PO_4^{3-}$  and total iron in this period were  $0.51 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1.08 \text{ mg L}^{-1}$ , and  $0.19 \text{ mg L}^{-1}$ , approximately. The value of the electrolytic conductivity fluctuated around  $900 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ , irrespective of the location and time of measurement. During *Cladophora* massive development, the pH value in the surface water ranged between 7.86 and 8.31. Concentrations of oxygen were changeable and they measured to  $8.4 \text{ mg L}^{-1}$  in the littoral zone and  $4.3 \text{ mg L}^{-1}$  in the central part of the lake.

Filamentous green alga *Cladophora* occurred generally in two forms – submerged and free-floating on the water surface. The submerged filaments of *Cladophora* consisted solely of juveniles, while the free-floating, on the water surface mats were formed by mature and dying forms. Submerged filaments of macroalgae were often tangled in *Ceratophyllum demersum* growing on more than 80% of the bottom of the lake. *Cladophora* biomass concentration appeared in a volume of  $600 \text{ m}^3$  to  $5000 \text{ m}^3$  tightly covering the water surface of the lake. In the period from May to July, quantitative proportions varied between submerged form (juvenile phase) and free-floating (mature phase and the dying). In May, the forms of the young was dominant and covered more than 85% of the lake. In June, during the decline in the share of submerged forms of *Cladophora*, the share of free-floating forms on the surface of the water increased at the same time.

### 3.2 Macroalgae culture in the medium supplemented with Cu ions

Table 1 presents the elemental composition observed in the *Cladophora* filaments ( $\text{mg g}^{-1} \text{ DM}$ ) cultured in the laboratory during supplementation of copper ions. Generally, it was observed that, with the increase of copper content in the culture medium, the copper content in the cultivated biomass also increased. In excess of the concentration of  $2.50 \text{ mg Cu L}^{-1}$  in the culture medium, a rapid increase in the concentration of copper in the biomass was observed, both in the case of 7 days and 14 days of exposure to copper. In the case of 7 days of exposure, copper content in biomass increased from 1.3 to  $3.9 \text{ mg g}^{-1}$  of DM (from  $2.50$  to  $24.96 \text{ mg Cu L}^{-1}$  of medium, respectively); while in the case of 14 days of exposure, copper content increased significantly more – from 1.3 to  $8.5 \text{ mg g}^{-1}$  of DM (from  $2.50$  to  $24.96 \text{ mg Cu L}^{-1}$  of medium, respectively).

### 3.3. Biomass analysis

The analysis of biomass was carried out to determine dry biomass, ash, total protein, crude fiber, crude fat, selected elements and amino acids content in *C. glomerata*. The results shown in Table 2 indicate that the dry biomass content was similar both in *Cladophora* from the lake and in *Cladophora* cultured in the laboratory. The ash content was higher in *Cladophora* biomass collected from the lake, whereas, the total protein, crude fiber and crude fat amount was higher in *Cladophora* cultured in the laboratory conditions.

In the elemental analysis, there was detected the content of selected elements, such as: Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Cu, As, Cd, Ni, Pb, Cr, Mn and Co in *C. glomerata* biomass. Table 3 shows the elemental composition

**Table 1:** Elemental composition observed in the freshwater *Cladophora* filaments ( $\mu\text{g g}^{-1}$  or  $\text{g g}^{-1} \text{ DM}$ ).

Element	The element content [ $\text{g g}^{-1} \text{ DM}$ ]	Element	The element content [ $\mu\text{g g}^{-1} \text{ DM}$ ]
Ca	$146.2 \pm 3.4$	As	$0.53 \pm 0.05$
Mg	$3.63 \pm 0.02$	Cd	$0.07 \pm 0.01$
Na	$0.47 \pm 0.02$	Ni	$0.15 \pm 0.03$
K	$17.59 \pm 0.22$	Pb	$0.80 \pm 0.09$
Fe	$0.19 \pm 0.01$	Cr	$0.01 \pm 0.001$
Zn	$0.03 \pm 0.01$	Mn	$0.09 \pm 0.03$
Cu	$0.05 \pm 0.01$	Co	$0.01 \pm 0.001$

**Table 2:** Analysis of algal biomass collected from the lake and cultured in laboratory conditions.

The content of the substance [%]	<i>Cladophora</i> from the lake	<i>Cladophora</i> cultured in the laboratory
Dry biomass	95.56	94.47
Ash	39.25	14.69
Total protein	14.45	26.59
Crude fiber	15.60	27.19
Crude fat	0.78	1.87

**Table 3:** The content of amino acids in *Cladophora glomerata* biomass (g/100g of total protein).

Amino acid [g/100g of total protein]	<i>Cladophora</i> from the lake	<i>Cladophora</i> cultured in the laboratory
Aspartic acid	10.52	11.5
Threonine	4.57	3.62
Serine	4.35	3.11
Glutamic acid	12.46	7.80
Proline	4.51	5.11
Cysteine	1.51	2.71
Glycine	5.13	3.78
Alanine	5.46	3.88
Valine	5.40	3.16
Methionine	0.82	0.80
Isoleucine	3.36	1.84
Leucine	6.58	3.82
Tyrosine	2.83	5.06
Phenylalanine	4.32	2.84
Histidine	2.17	3.65
Lysine	4.78	5.13
Arginine	7.23	7.92

observed in the freshwater *Cladophora* filaments ( $\mu\text{g g}^{-1}$  or  $\text{mg g}^{-1}$  of DM). The results show that the studied biomass of freshwater *C. glomerata* collected from the lake was characterized by the highest calcium content of the detected metals. Furthermore, *Cladophora* biomass contained also large amounts of potassium, magnesium, sodium and iron. Lead, arsenic and nickel occurred in the highest concentrations between other unfavorable heavy metals. While chromium and cobalt were detected in the lowest amounts in the biomass.

As far as amino acids analysis is concerned, the content of amino acids in algal biomass (g/100 g of total protein) is presented in Table 4. It can be observed that glutamic acid

**Table 4:** Elemental composition observed in the *Cladophora* filaments ( $\text{g g}^{-1}$  DM) cultured in the laboratory during supplementation of copper ions.

Elements content [ $\text{g g}^{-1}$ DM]	Habitat water	0.002 mg $\text{Cu L}^{-1}$	0.02 mg $\text{Cu L}^{-1}$	0.25 mg $\text{Cu L}^{-1}$	2.50 mg $\text{Cu L}^{-1}$	24.96 mg $\text{Cu L}^{-1}$
Period of 7 days						
Cu	0.05 $\pm 0.01$	0.6 $\pm 0.1$	0.7 $\pm 0.1$	1.8 $\pm 0.3$	1.3 $\pm 0.4$	3.9 $\pm 1.2$
Na	0.6 $\pm 0.1$	2.2 $\pm 0.1$	2.6 $\pm 0.3$	2.6 $\pm 0.3$	1.7 $\pm 0.2$	2.1 $\pm 0.7$
K	2.7 $\pm 0.1$	3.4 $\pm 0.7$	3.4 $\pm 0.5$	2.6 $\pm 1.3$	1.6 $\pm 0.3$	1.1 $\pm 0.3$
Ca	62.3 $\pm 1.3$	70.7 $\pm 4.5$	24.8 $\pm 2.8$	54.9 $\pm 1.3$	105.2 $\pm 3.0$	14.8 $\pm 1.3$
Mg	2.9 $\pm 0.1$	31 $\pm 0.1$	4.2 $\pm 0.3$	3.4 $\pm 0.1$	3.2 $\pm 0.3$	2.5 $\pm 0.6$
Period of 14 days						
Cu	0.05 $\pm 0.01$	0.8 $\pm 0.5$	0.4 $\pm 0.2$	1.2 $\pm 0.2$	1.3 $\pm 0.1$	8.5 $\pm 1.0$
Na	0.6 $\pm 0.1$	1.8 $\pm 0.1$	2.2 $\pm 0.2$	1.9 $\pm 0.2$	1.6 $\pm 0.1$	1.5 $\pm 0.2$
K	2.7 $\pm 0.1$	5.0 $\pm 1.6$	10.0 $\pm 1.0$	6.3 $\pm 1.8$	3.6 $\pm 0.2$	1.3 $\pm 0.1$
Ca	62.3 $\pm 1.3$	73.2 $\pm 6.7$	156.9 $\pm 5.2$	195.2 $\pm 4.2$	53.9 $\pm 5.8$	121.4 $\pm 0.4$
Mg	2.9 $\pm 0.1$	4.8 $\pm 0.5$	5.3 $\pm 0.1$	4.3 $\pm 0.2$	4.1 $\pm 0.4$	3.5 $\pm 0.3$

and aspartic acid were detected in the highest content in *C. glomerata* collected from the lake. In addition, the alga was found to be a rich source of arginine, leucine, alanine, glycine and valine.

### 3.4 Fatty acids analysis in extract

Table 5 shows the changes in fatty acid concentrations in extracts of the freshwater *C. glomerata* biomass with respect to the type of extraction. The differences in fatty acids composition were noticed depending on the extraction method and solvent. It was observed that the highest amounts of detected fatty acids, both saturated and unsaturated, were obtained using supercritical fluid extraction. The saturated fatty acids ranged from C9:0

**Table 5:** Changes in fatty acid concentrations in extract of the freshwater *Cladophora* biomass with respect to the type of extraction.

Polyunsaturated/ saturated fatty acid	% weight of fatty acids in dry matter of the extract		Supercritical extraction-CO <sub>2</sub>
	Extraction solvent: EtOH	Soxhlet method solvent: Aceton	
C9:0	1.9	1.6	2.0
C10:0	n.d.	n.d.	n.d.
C11:0	n.d.	n.d.	n.d.
C12:0	0.1	0.2	n.d.
C14:0	2.7	3.0	12.5
C16:0	5.9	7.1	17.4
C18:0	0.4	0.8	0.6
C20:0	n.d.	n.d.	n.d.
C22:0	n.d.	n.d.	0.2
C16:1 ( <i>n</i> -7)	1.9	2.8	4.9
C18:1 ( <i>n</i> -9)	1.0	1.4	9.3
C18:2 ( <i>n</i> -6)	1.9	3.0	6.5
C18:3 ( <i>n</i> -3)	1.7	2.2	5.2
C18:3 ( <i>n</i> -6)	n.d.	n.d.	n.d.
C18:4 ( <i>n</i> -3)	1.5	3.0	3.1
C20:4 ( <i>n</i> -6)	n.d.	n.d.	0.4
C20:5 ( <i>n</i> -3)	n.d.	n.d.	0.4
C22:1 ( <i>n</i> -9)	n.d.	n.d.	n.d.
C22:6 ( <i>n</i> -3)	n.d.	n.d.	n.d.
The content of fatty acid (% weight) in the dry matter of the extract	19.0	36.5	62.5
Polyunsaturated/ saturated fatty acid ratio in the dry matter of the extract	0.72	0.83	0.91

n.d.= not detected. Limit detection 0.1%weight

to C22:0 in our studies. The C16:0 and C14:0 fatty acids were dominant in obtained extracts. The C18:1 and C18:2 unsaturated fatty acids occurred in the highest amounts among other unsaturated fatty acids in extracts obtained by the supercritical fluid extraction method. The C22:0 saturated fatty acid was detected in the largest percentage in the case of supercritical fluid extraction, and the C12:0 saturated fatty acid was found in the lowest amount in case of solvent extraction.

## 4 Discussion

Formed macroalgae coating covered almost the entire surface of the water of the lake. The biomass of filamentous mats of *Cladophora* developed in 2013 (June, July) at a relatively constant level on the Oporzyn Lake and was 674 g DM m<sup>-2</sup> (5896 g FMm<sup>-2</sup>). The importance of *Cladophora* as a raw material for bioactive compounds is well documented for marine ecosystems [9-12], but our present studies of using a natural source of primary and secondary metabolites are based on macroalgal freshwater biomass. The result of significant copper increase in the case of 14 days of exposure may be explained due to the limited concentration of 2.50 mg Cu L<sup>-1</sup> in the medium, above which there was significantly higher biosorption of copper by *Cladophora*. According to our observations, excessively high concentrations of Cu may cause disturbances in the synthesis of chlorophyll and discoloration algae thalli. Further exposure of the algal culture to high levels of copper above 2.50 mg Cu L<sup>-1</sup> acted lethally on the thalli of *Cladophora*. The biosorption of copper using *Cladophora* biomass has been widely investigated in recent years. Deng et al. [27] analyzed the ability of marine green alga *Cladophora fascicularis* (Mertens ex Ag.) Kütz. to absorb copper (II) from aqueous solutions and showed that this alga was characterized by one of the highest adsorption capacities for Cu<sup>2+</sup> between others algal biosorbents [28]. Our studies confirmed the ability of *Cladophora*'s effective copper biosorption, with the highest copper adsorption capacity of 8.5 mg g<sup>-1</sup>, which corresponds to 0.13 mmol g<sup>-1</sup>. Apart from studies on marine *Cladophora* species, there are also a few literature data concerning freshwater *Cladophora* as a biosorbents. Thus, in one of them, it was found that the freshwater *Cladophora fracta* (O.F. Müller ex Vahl) Kütz. may remove Cu with the highest efficiency (up to 2.388 mg g<sup>-1</sup>) compared to other investigated metals: Zn, Cd and Hg [26]. Studies on another freshwater alga, *Cladophora crispata* (Roth) Kütz., exhibited the highest Cu (II) uptake capacity of 1.03 mmol g<sup>-1</sup> of biomass [30]. Afterwards, the effect of different Cu (II) concentrations on the adsorption yield using freshwater *Cladophora* was also evaluated. The results show that the adsorption rates increased with the increasing copper concentrations up to 150–200 mg Cu L<sup>-1</sup>. The maximum equilibrium adsorption rate was estimated as 16.73 mg g<sup>-1</sup> at copper concentration of 204.2 mg Cu L<sup>-1</sup>. In comparison to our results, the same group obtained adsorption capacity of 3.27 mg g<sup>-1</sup> *Cladophora* biomass at the concentration of 25 mg Cu L<sup>-1</sup> [32], whereas we noticed 8.5 mg Cu g<sup>-1</sup> biomass at the same concentration of Cu in the medium after the period of 14 days.

On the other hand, we noticed that the different copper concentrations in the culture medium affected the content of other elements in algae biomass. The effect of supplementation with various substances to bioactive compounds in freshwater *Cladophora* has been studied in several publications. Nechev et al. [36] reported differences in lipid and fatty acid content in freshwater *C. glomerata* after treatment with lead ions. Other research showed that the addition of phosphate to the medium enhanced the production of carotenoids and chlorophylls in freshwater *Cladophora* [15]. The same group demonstrated the influence of increased phosphorus concentration to increase in protein, vitamin A, P,  $\beta$ -carotene, lutein and zeaxanthin contents and decrease in carbohydrate content [16]. In our studies, in the case of 7 days of exposure to copper, the sodium content in biomass increased with increasing copper concentration in the culture medium up to the concentration of 0.25 mg Cu L<sup>-1</sup>, and afterwards the concentration of the sodium content decreased and increased again. Whereas, after the period of 14 days of exposure to copper, the amount of sodium in biomass increased up to a concentration of 0.02 mg Cu L<sup>-1</sup>, and then it decreased. Furthermore, during the 7 days of exposure to copper, the potassium content in algae biomass was at a similar level up to the concentration of 0.02 mg Cu L<sup>-1</sup>, and then, it decreased. In the case of 14 days of exposure to copper, the potassium amount in biomass increased up to the concentration of 0.02 mg Cu L<sup>-1</sup>, and then, it decreased. However, there was no correlation between the copper content in the culture medium and the calcium content in algae biomass. Finally, the magnesium amount in biomass increased up to the concentration of 0.02 mg Cu L<sup>-1</sup>, and it decreased after exceeding that concentration during a 7 day exposure to copper. A similar correlation for magnesium was observed in the case of 14 days of exposure to copper. To summarize, in most cases, the investigated element content in algae biomass increased up to the concentration of 0.02 mg Cu L<sup>-1</sup> in the culture medium, and in excess of the concentration, the element content decreased with the highest copper concentration. Thus, we demonstrated that copper may affect freshwater *C. glomerata* metabolism indicating, that supplementation with the appropriate amount of Cu could enhance macro- and microelements production in this alga. Since heavy metals are common in the natural environment, trace amounts of contamination may be present as some components of cosmetics. European Union legislation does not regulate, in detail, what the maximum amounts of heavy metals are allowed. Each cosmetic must be safe and, therefore, the heavy metal content is taken into account when assessing the safety

of specific cosmetic. As the copper in cosmetics acts as a disinfectant and accelerates wound healing, its content in cosmetics do not pose a risk to health. The results of our study indicate that the bioaccumulation of copper in the culture of *Cladophora* biomass is at a level enabling the use of these algae in cosmetics. However, in the case of products of plant origin, the copper content in food products should not exceed 1.0 mg kg<sup>-1</sup> of the product.

Study of biomass of freshwater macroalgae as a source of fatty acids, amino acids and other bioactives is not very popular in contrast to marine algae. Chemical composition was well studied, for example, among brown algae – *Padina pavonica* (L.) Thivy [37], red algae – *Ceramium virgatum* Roth [38] and green algae – *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek [39]. Different genus of marine green algae, e.g.: *Cladophora*, *Codium*, *Chaetomorpha* and *Ulva*, which are rich in fatty acids (especially: palmitic, myristic, behenic, palmitoleic, oleic and linoleic acids), may be potentially used for nutritional and pharmaceutical applications [40]. However, few sources refer to fatty acids content in freshwater *C. glomerata* [18].

To sum up, the contents of the studied metals decreased in the following order: Ca > K > Mg > Na > Fe > Cu > Zn > Pb > As > Ni > Cd > Mn > Cr > Co. In contrast, Khuantairong and Traichaiyaporn [16] reported the highest content of magnesium in freshwater *Cladophora*. They evaluated the following content of studied elements: Mg > Fe > Ca > K > Zn in *Cladophora* biomass.

In the literature, there is no evident interest in amino acid content in freshwater *Cladophora*. However, marine *C. vagabunda* (L.) Hoek was investigated, and it was characterized by a similar amino acid composition (glutamic acid, aspartic acid, glycine, valine, lysine, histidine, arginine) [17] as the freshwater *C. glomerata*. Moreover, our results show that amino acid content varies in *Cladophora* biomass from the lake and in *Cladophora* biomass cultured in the laboratory. However, in most cases, amino acid concentration in biomass was higher in *Cladophora* collected from the lake. The exceptions were aspartic acid, proline, cysteine, tyrosine, histidine, lysine and arginine, which were detected in higher amounts in *Cladophora* cultured under laboratory conditions. As a result, freshwater *Cladophora* from its natural habitat may be a potentially better amino acid source for cosmetic raw material than the same alga cultured in the laboratory. This is a very important aspect from the economical point of view, because cultivating of algae biomass in a laboratory is much more expensive than the harvesting of algae from their natural habitat.

In extracts from algae biomass, fatty acids ranged from 9 to 22 carbons in length and were determined

both as saturated and unsaturated compounds [41]. The number of double bonds in the fatty acid chains, however, never exceeds 6 and almost all of the unsaturated fatty acids are *cis* isomers [42]. The fatty acids are recovered from the biomass algae by an extraction process, which can be carried out using solvents in the Soxhlet method or supercritical fluid extraction using supercritical CO<sub>2</sub> [43,44]. In our studies, it was observed that the highest amounts of detected saturated and unsaturated fatty acids were obtained using supercritical fluid extraction. Higher efficiency of supercritical fluid extraction in obtaining bioactive substances from a natural sources as compared to other extraction methods has been proven in many studies [45,46]. Our results indicate that the content of fatty acids in extracts from *Cladophora* can be used as a significant supplement in animal feed.

It is interesting to observe a relatively large amount of the palmitoleic acid (C16:1), both in extracts obtained by supercritical fluid extraction and by solvent extraction, which rarely occurs in algae and is characterized by its strong antioxidative and anti free radical properties. We also noticed relatively high content of essential fatty acids – linoleic (C18:2; *n*-6) and  $\alpha$ -linoleic acid (C18:3; *n*-3) in obtained extracts, which make these extracts potentially valuable sources for food, feed and cosmetics production. According to others studies concerning fatty acid composition in extracts from marine *Cladophora*, the alga contained the most amount of palmitic acid (C16:0) among others fatty acids [11-13] as in our research. *C. vagabunda* was found to be a rich source of C20:4 (*n*-6) fatty acid, which was the main unsaturated fatty acid in contrast to the freshwater *C. glomerata*, where we detected this acid in traces, and where the C18:1 acid was the dominant unsaturated fatty acid. What is more, we noticed the higher content of C16:1 acid, and essential fatty acids: C18:2 and C18:3 in *C. glomerata* in comparison to research on *C. vagabunda* [12]. Furthermore, another species – *Cladophora coelothrix* Kütz. was characterized by high C18:1 fatty acid content, what made it the major one between unsaturated fatty acids in the alga, as is the case with our results in *C. glomerata*. In contrast to our studies, the C16:1, C18:2 and C18:3 fatty acids were not detected in *C. coelothrix* [10]. Afterwards, extracts obtained from *Cladophora sericooides* Børgesen turned out to be rich in C16:0 and C18:1 fatty acids, which were the dominant ones comparably to our results. The C16:1, C18:2 and C18:3 fatty acids were also detected in *C. sericooides* [11]. Khalid et al. [18] found that the dominant was saturated C16:0 fatty acid which was similar to our studies. In contrast to our results, the C18:0 was detected in high amounts, whereas, the C14:0 was found in low concentration. Also, the

C16:3 fatty acid was found as the major unsaturated fatty acid while we did not detected this acid in *C. glomerata* extracts. Other differences were found in content of C16:1, C18:1 and C18:3 fatty acids, which were not detected [18], in comparison to our results. Summarizing, the changes in fatty acid composition in *Cladophora* extracts are evident and may depend on such factors as: extraction technique, solvents used, algae species and their natural habitat.

## 5 Conclusions

1. Lake Oporzyn in Poland is a convenient place for harvesting macroalgae of the *Cladophora* genus which is very important for obtaining organic biomass with commercial applications.
2. Amino acid content in *Cladophora* biomass indicates a very interesting new material which could be potentially used in animal feed as a feed supplement.
3. As a result of bioaccumulation, it is possible to obtain very high copper concentration in the culture of algae biomass, far in excess of the amount necessary for animal nutrition in this biomass. Using this technology, it is absolutely essential to control the amount of copper in the biomass because it can be a toxic.
4. The number and type of fatty acids and the ratio of unsaturated to saturated fatty acids in the extract of freshwater *Cladophora* biomass indicate that the extract can be a valuable supplement in human food, as well as a great supplement in animal feed. The extract obtained with the supercritical extraction process may also be used as a component in cosmetics: masks, creams and scrubs.

**Acknowledgements:** This project is financed in the framework of grant entitled – Innovative technology of seaweed extracts – components of fertilizers, feed and cosmetics (PBS/1/A1/2/2012) contributed by the National Centre for Research and Development in Poland.

## References

- [1] Higgins S.N., Malkin S.Y., Todd Howell E., Guildford S.J., Campbell L., Hiriart-Baer V., Heckey R.E., An ecological review of *Cladophora glomerata* (*Chlorophyta*) in the Laurentian Great Lakes, *J. Phycol.*, 2008, 44, 839-854.

- [2] Messyasz B., Rybak A., Abiotic factors affecting the development of *Ulva* sp. (Ulvoiphyceae, Chlorophyta) in freshwater ecosystems, *Aquatic Ecol.*, 2011, 45, 75-87.
- [3] Messyasz B., Rybak A., Pikosz M., Szendzina L., Fertility effects on *Ulva* thalli mass development in inland waters of Poland, *Biol. Animală*, 2013, 69-82.
- [4] Schroeder G., Messyasz B., Leska B., Fabrowska J., Pikosz M., Rybak A., Biomass of freshwater algae as raw material for the industry and agriculture. *Przem. Chem.* 92, 1380-1384, (in Polish).
- [5] Hossain A.B.M.S., Salleh A., Boyce A.N., Chowdhury P., Naquiddin M., Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy, *Am. J. of Biochem. and Biotech.*, 2008, 4, 250-254.
- [6] Kumar P., Suseela M.R., Toppo K., Physico-Chemical Characterization of Algal oil: a Potential Biofuel. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 2011, 2, 493-497.
- [7] Khala G., Ghazala B., Biodiesel production from algae, *Pak. J. Bot.*, 2012, 44, 379-381.
- [8] Gao K., McKinley K.R., Use of macroalgae for marine biomass production and CO<sub>2</sub> remediation- a review, *J. Appl. Phycol.*, 1994, 6, 45-60.
- [9] Sauze F., Increasing the productivity of macroalgae by the action of a variety of factors, In: Stub A., Chartier A., Schleser P., Schleser G. (Eds.), *Energy from Biomass*, Elsevier Applied Science, London, 1983.
- [10] Carballeira N.M., Sostre A., Stefanov K., Popov S., Kujumgiev A., Dimitrova-Konaklieva S., Tosteson C.G., Tosteson T.R., The fatty acid composition of a vibrio alginolyticus associated with the alga *Cladophora coelothrix*. Identification of the novel 9-methyl-10-hexadecenoic acid, *Lipids*, 1997, 32, 1271-1275.
- [11] Heiba H.I., Al-Easa H.S., Rizk A.F.M., Fatty acid composition of twelve algae from the coastal zones of Qatar, *Plant Food Hum. Nutr.*, 1997, 51, 27-34.
- [12] Horincar V.B., Parfene G., Tyagi A.K., Gottardi D., Dinică R., Guerzoni M.E., Bahrim G., Extraction and characterization of volatile compounds and fatty acids from red and green macroalgae from the Romanian Black Sea in order to obtain valuable bioadditives and biopreservatives, *J. Appl. Phycol.*, 2014, 26, 551-559.
- [13] Elenkov I., Georgieva T., Hadjieva P., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S., Terpenoids and sterols in *Cladophora vagabunda*, *Phytochemistry*, 1995, 38, 457-459.
- [14] Soltani S., Saadatmand S., Khavarinejad R., Nejadstarrari T., Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz in Caspian Sea Coast, Iran, *Afr. J. Biotechnol.*, 2011, 10, 7684-7689.
- [15] Khuantairong T., Traichaiyaporn S., Enhancement of carotenoid and chlorophyll content of an edible freshwater alga (*Kai: Cladophora* sp.) by supplementary inorganic phosphate and investigation of its biomass production, *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 2012, 6, 1-11.
- [16] Khuantairong T., Traichaiyaporn S., The nutritional value of edible freshwater alga *Cladophora* sp. (Chlorophyta) grown under different phosphorus concentrations, *Int. J. Agric. Biol.*, 2011, 13, 297-300.
- [17] Rani G., Changes in protein profile and amino acids in *Cladophora vagabunda* (Chlorophyceae) in response to salinity stress, *J. Appl. Phycol.*, 2007, 19, 803-807.
- [18] Khalid M.N., Shameel M., Ahmad V.U., The bioactivity and phytochemistry of two species of *Cladophora* (Siphonocladophyceae) from Sindh, *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences*, 2012, 49, 113-121.
- [19] Verdel E.F., Kline P.C., Wani S., Woods A.E., Purification and partial characterization of haloperoxidase from fresh water algae *Cladophora glomerata*, *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 2000, 125, 179-187.
- [20] Lee Y.C., Chang S.P., The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora* filamentous macroalgae, *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 5297-5304.
- [21] Rybak A., Messyasz B., Leska B., The accumulation of metal (Co, Cr, Cu, Mn and Zn) in freshwater *Ulva* (Chlorophyta) and its habitat, *Ecotoxicology*, 2013, 22, 558-573.
- [22] Deng L., Zhang Y., Qin J., Wang X., Zhu X., Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by nonliving green algae *Cladophora albida*, *Miner. Eng.*, 2009, 22, 372-377.
- [23] Deng L., Su Y., Su H., Wang X., Zhu X., Sorption and desorption of lead (II) from wastewater by green algae *Cladophora fascicularis*, *J. Hazard. Mater.*, 2007, 143, 220-225.
- [24] Sternberg S.P.K., Dorn R.W., Cadmium removal using *Cladophora* in batch, semi-batch and flow reactors, *Bioresour. Technol.*, 2002, 81, 249-255.
- [25] Tuzen M., Sari A., Biosorption of selenium from aqueous solution by green algae (*Cladophora hutchinsiae*) biomass: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies, *Chem. Eng. J.*, 2010, 158, 200-206.
- [26] Ji L., Xie S., Feng J., Li Y., Chen L., Heavy metal uptake capacities by the common freshwater green alga *Cladophora fracta*, *J. Appl. Phycol.*, 2012, 24, 979-983.
- [27] Deng L., Su Y., Su H., Wang X., Zhu X., Biosorption of copper (II) and lead (II) from aqueous solutions by nonliving green algae *Cladophora fascicularis*: Equilibrium, kinetics and environmental effects, *Adsorption*, 2006, 12, 267-277.
- [28] Deng L., Zhu X., Wang X., Su Y., Su H., Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by green alga *Cladophora fascicularis*, *Biodegradation*, 2007, 18, 393-402.
- [29] Aksu Z., Kutsal T., Determination of kinetic parameters in the biosorption of copper (II) on *Cladophora* sp., in a packed bed column reactor, *Process Biochem.*, 1998, 33, 7-13.
- [30] Ozer A., Ozer D., Ekiz H.I., The equilibrium and kinetic modelling of the biosorption of copper (II) ions on *Cladophora crispate*, *Adsorption*, 2004, 10, 317-326.
- [31] Andersen R.A., *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, London, 2005.
- [32] AOAC, Horwitz W., Latimer W., *Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis*, 18th Edition, Gaithersburg Maryland, USA, 2007.
- [33] Mendes R.L., Nobre B.P., Cardoso M.T., Pereira A.P., Palavra A.F., Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, *Inorga Chim Acta*, 2003, 356, 328-334.
- [34] Roj E., Dobrzynska-Inger A., Grzeda K., Kostrzewa D., Supercritical extraction of plant materials, *Przem. Chem.*, 2013, 92, 1358-1363 (in Polish).
- [35] Kostrzewa D., Dobrzynska-Inger A., Roj E., Experimental data on xanthohumol solubility in supercritical dioxide, *Fluid Phase Equilibria*, 2013, 360, 445-450.
- [36] Nechev J., Ivanova A., Khotimchenko S., Boytcheva E., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S., Stefanov K., Lipid changes

- in the freshwater macroalga *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (Chlorophyta) after lead treatment, *C. R. Acad. Bulgare Sci.*, 2003, 56, 71-76.
- [37] Tabarasa M., Rezaei M., Ramezani Z., Waaland J.R., Rabiei R., Fatty acids, amino acids, mineral contents, and proximate composition of some brown seaweeds, *J. Phycol.*, 2012, 48, 285-292.
- [38] Horincar V.B., Parfene G., Tyagi A.K., Gottardi D., Dinica R., Guerzoni M.E., Bahrim G., Extraction and characterization of volatile compounds and fatty acids from red and green macroalgae from the Romanian Black Sea in order to obtain valuable bioadditives and biopreservatives, *J. Appl. Phycol.*, 2014, 26, 551-559.
- [39] Elenkov I., Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S., Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*, *Phytochemistry*, 1996, 39-44.
- [40] Pereira H., Barreira L., Figueredo F., Custódio L., Vizetto-Duarte C., Polo C., Rešek E., Engelen A., Varela J., Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Macroalgae: Potential for Nutritional and Pharmaceutical Applications, *Mar. Drugs*, 2012, 10, 1920-1935.
- [41] Grierson S., Strezov V., Bray S., Mummacari R., Danh L.T., Foster N., Assessment of Bio-oil Extraction from *Tetraselmis chui* Microalgae Comparing Supercritical CO<sub>2</sub>, Solvent Extraction, and Thermal Processing, *Energy Fuels*, 2012, 26, 248-255.
- [42] Medina A.R., Grima E.M., Gimenez A.G., Ibanez M.J., Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids, *Biotechnology Advances*, 1998, 16, 517-580.
- [43] Halim R., Danquah M.K., Webley P.A., Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnology Advances*, 2012, 30, 709-732.
- [44] Sahena F., Zaidul I.S.M., Jinap S., Karim A.A., Abbasa K.A., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M., Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review, *J. Food Engin.*, 2009, 95, 240-253.
- [45] Ibañez E., Herrero M., Mendiola J.A., Castro-Puyana M., Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates, In: Hayes M., Springer U.S. (Eds.), *Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications*, New York, 2012.
- [46] Klejduš B., Lojková L., Plaza M., Šnoblova M., Šterbová D., Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 2010, 1217, 7956-7965.

## **Załącznik II**

Supercritical fluid extraction as a tool to valorize  
underexploited freshwater green algae



## Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae



Joanna Fabrowska<sup>a</sup>, Elena Ibañez<sup>b,\*</sup>, Bogusława Łęska<sup>a</sup>, Miguel Herrero<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Adam Mickiewicz University in Poznań, Faculty of Chemistry, Umultowska 89b, 61-614 Poznań, Poland

<sup>b</sup> Laboratory of Foodomics, Institute of Food Science Research (CIAL-CSIC), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 June 2016

Received in revised form 8 August 2016

Accepted 5 September 2016

Available online xxxx

#### Keywords:

Freshwater algae

*Cladophora glomerata*

*Ulva flexuosa*

*Chara fragilis*

Carotenoids

Supercritical fluid extraction

Antioxidant activity

### ABSTRACT

Water reservoirs in Poland such as rivers, lakes and ponds are a rich source of freshwater green macroalgae that can be exploited as a good source of biologically active compounds, once an appropriate process has been developed and the metabolites and biological activity of the different species have been demonstrated. With this goal, in the present work a supercritical fluid extraction process (SFE) has been studied to extract carotenoids and phenolic compounds from *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis*. Optimization of the parameters involved in the SFE process (temperature, pressure and % ethanol as co-solvent) has been carried out by using a 3-level factorial experimental design and different responses have been evaluated simultaneously (extraction yield, total carotenoids, total phenols and antioxidant activity). Optimized conditions include the use of 40 °C, 300 bar and 11.4% ethanol as co-solvent. Under these conditions, *C. fragilis* extracts were the richest in total carotenoids and total phenols (24.90 mg fucoxanthin equivalents g<sup>-1</sup> extract and 30.20 mg gallic acid equivalents g<sup>-1</sup> extract, respectively), whereas those produced from *U. flexuosa* possessed the highest antioxidant activity (0.944 mmol trolox equivalents g<sup>-1</sup> extract). The chemical characterization of the different extracts, carried out by HPLC-DAD-MS, allowed the tentative assignment of diverse carotenoids, chlorophylls and related compounds in the studied algae; among them some described for the first time on these species. Hence, extracts obtained from the studied algae using SFE can be considered of potential interest in cosmetic, food and pharmaceutical industry as a way to valorize these underexploited materials.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nowadays, algae have found a good number of applications in various industries, as cosmetic, pharmaceutical, food and agriculture, due to the variety of bioactive compounds these organisms possess [1–5]. Literature shows plenty of data regarding marine algae, their chemical composition and applications [2–4,6–8]. However, as far as freshwater algae are concerned, their properties are poorly understood because just a few investigations related to analysis of bioactive compounds in these algae have been reported [9–13]. Water reservoirs in Poland such as rivers, lakes and ponds are a rich source of freshwater green macroalgae, with an important growing rate which can be revalorized if a proper identification of metabolites and biological activity is carried out. This is especially interesting for freshwater algae such as *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis*.

*Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (*Chlorophyta*, *Ulvophyceae*) is filamentous green macroalga commonly occurring in freshwater ecosystems [14]. Freshwater *C. glomerata* has been shown to be a natural source of carotenoids [15–20] including β-carotene, lutein, zeaxanthin,

astaxanthin, violaxanthin, loroxanthin, antheraxanthin and 9-*cis* neoxanthin, as well as of phenolic compounds [15,16,21]. *Ulva flexuosa* subsp. *pilifera* (Kütz.) (*Chlorophyta*, *Ulvophyceae*) is a green tubular macroalgae occurring mostly in marine, but also in freshwater reservoirs [22]. So far, research has been focused on marine species from *Ulva* genera and most of them concerning *Ulva lactuca* [23–26]. Indeed, the knowledge on the composition and activity of *U. flexuosa* remains scarce. Marine *Ulva* species are well known sources of characteristic carbohydrates, called ulvans [26] which have been related to a number of bioactivities [27–29]. Our recent studies have shown the presence of ulvans also in freshwater *Ulva* species [30]. Regarding *Chara fragilis* A.N. Desvaux (*Charophyta*, *Charophyceae*), this is a small macroalga of highly branched green or light grey thallus, which was found both in marine and freshwater habitats [31]. Biochemical characteristic of algae from freshwater *Charophyta* phylum is hardly known. Some researches related to fatty acids and sterols composition in *Chara* species were conducted [32,33]. Also carotenoids such as lutein, neoxanthin, zeaxanthin, violaxanthin, fucoxanthin, β-, α- and γ-carotene [34] have been described, although this species remains largely unknown from a chemical composition perspective.

Nowadays, different advanced green extraction techniques, such as supercritical fluid extraction (SFE) are widely used to isolate bioactive

\* Corresponding author.

E-mail address: [elena.ibanez@csic.es](mailto:elena.ibanez@csic.es) (E. Ibañez).

compounds from natural sources. In SFE, solvents above their critical pressures and temperatures are employed resulting in an easier diffusion through solid materials and therefore faster extraction yields [7, 35]. Usually supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) is used as a solvent in SFE due to its mild critical conditions, non-toxicity and low-cost [8]. SC-CO<sub>2</sub> is suitable for isolation of non-polar compounds, for this reason, in the case of extraction of medium polarity natural bioactives, the addition of a co-solvent such as ethanol is necessary [36]. As a result, SFE has found numerous applications to recover biologically active components from algae, allowing the extraction of labile or easily oxidizable compounds [8,37]. Predominantly, SFE has been used for carotenoids isolation from marine macroalgae species, for instance for the recovery of fucoxanthin [38–41]. Some phenolic compounds were also extracted from seaweeds using SFE [42]. In contrast to marine algae, literature shows a few examples of SFE applications to isolate bioactive compounds from freshwater algae [11].

Bearing this in mind, the main aim of this work was to develop SFE-based processes as a green and environmentally friendly approach to revalorize different freshwater green macroalgae species from Poland such as *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis* and to proceed to their chemical and functional characterization. For this purpose, extraction conditions were optimized to maximize extraction yield, as well as amount of isolated bioactive compounds (carotenoids, phenols) and antioxidant activity in the obtained extracts. Afterwards, *in vitro* assays including total carotenoids, chlorophylls and phenols, as well as antioxidant activity (TEAC) were carried out for extracts obtained under optimum conditions to determine their antioxidant properties. Furthermore, the evaluation of carotenoids and chlorophylls in the extracts using HPLC-DAD-MS was attempted to define the chemical composition of studied freshwater green macroalgae species from Poland for the first time.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Algae material and chemicals

Three species of freshwater green algae were used in the study: *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis*. Samples were collected manually from freshwater reservoirs located in Greater Poland region (Poland). Specifically, *C. glomerata* and *U. flexuosa* were harvested from Nielba river, in July 2014 and August 2014, respectively, whereas *C. fragilis* was collected from Wielkowiejskie Lake in January 2015. After harvesting, fresh algal biomass was weighed and dried in a drying chamber FD with forced air (Binder) under the temperature of 35 °C until a dry matter having a water content of <15% was obtained. Then, dry algae were milled using a laboratory mill with grinding tank.

Carbon dioxide (99% purity), purchased from Carburios Metálicos (X50S, Barcelona, Spain), and ethanol (99.5%), provided by VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France), were used for supercritical fluid extraction (SFE). Ultrapure water was obtained from a Millipore system (Billerica, MA, USA). Fucoxanthin, chlorophyll *a*, gallic acid, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, ≥97%) and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, ≥99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Folin-Ciocalteu phenol reagent was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Methanol and methyl tert-butyl ether (MTBE) provided by LabScan (Gliwice, Poland), were used for HPLC-DAD-MS analysis.

### 2.2. Supercritical fluid extraction

The extractions were carried out using home-made SFE instrument. Fig. 1 shows the scheme of the apparatus. CO<sub>2</sub> from a cylinder (1) is compressed with a pump (2), preheated inside a tube with the proper dimensions (8) placed in the oven (7), and through the extraction cell (9) containing the algae material. CO<sub>2</sub> pressure and flow rate are controlled by a micrometering valve (3) and a back pressure regulator

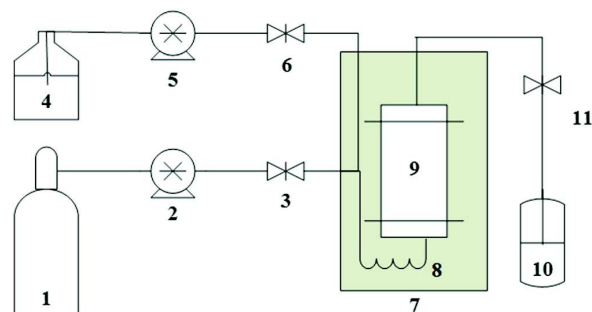


Fig. 1. Schematic diagram of supercritical fluid extraction apparatus: 1 – CO<sub>2</sub> cylinder; 2 – CO<sub>2</sub> pump; 3 – micrometering valve; 4 – co-solvent reservoir; 5 – co-solvent pump; 6 – micrometering valve; 7 – oven; 8 – preheating tube; 9 – extraction cell; 10 – collection vial; 11 – back pressure regulator.

(11). Co-solvent is added by pumping it from a reservoir (4) to the extraction cell using an HPLC pump (5); co-solvent flow is regulated through a micrometering valve (6). Afterwards, the obtained extract is collected in a collection vial (10) by depressurization of the system. For each extraction, 0.5 g of dried algae biomass was used with a CO<sub>2</sub> flow rate of 2 ml min<sup>-1</sup>. Each extraction was carried out for 2 h in triplicate. Extraction conditions for all algae were selected based on an experimental design conducted for *C. glomerata*. After extraction, the resulting extracts were collected in vials and the residual ethanol was evaporated under vacuum to calculate extraction yield. Then, dried extracts were diluted with ethanol to concentrations from 10 to 20 mg ml<sup>-1</sup> and stored at –20 °C and protected from light until analysis.

### 2.3. Experimental design

To optimize extraction conditions a 3-level factorial experimental design 3<sup>3</sup> (including three central points) was used based on three factors: temperature (40–60 °C), pressure (100–300 bar) and percentage of ethanol as co-solvent (0–15%). The effect of the factors on different responses, including extraction yield (%), total carotenoids content, total phenolic content (TPC) and antioxidant activity (TEAC assay) was studied. A total of 15 experiments were conducted in a randomized order (as shown in Table 1) for *C. glomerata*. The experimental design and data analysis were carried out using response surface methodology (RSM) with Statgraphics Centurion XVI® (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) software. The effects of the independent factors on the response variables in the separation process were assessed using the pure error, considering a level of confidence of 95% for all the variables. The effect of each factor and its statistical significance, for each of the response variables, was analyzed from the standardized Pareto chart. The response surfaces of the respective mathematical models were also obtained, and the significances were accepted at  $p \leq 0.05$ . A multiple response optimization was carried out by the combination of experimental factors, looking for maximizing the desirability function for the responses in the extracts. Afterwards, the optimum extraction conditions obtained for *C. glomerata* were used for the extraction of the rest of the algal species, i.e., *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis*.

### 2.4. In vitro assays

#### 2.4.1. Total carotenoids and chlorophylls determination

Total carotenoids and chlorophylls content in the algal extracts was evaluated spectrophotometrically following the method described by Liechenthaler [43] with some modifications. Briefly, ethanolic extracts were diluted with methanol to obtain concentrations in the range from 0.1 to 0.5 mg ml<sup>-1</sup>. Then, 300 µl of each extracts were transferred to a 96-well microplate. The absorbance was measured at 470 nm, 652 nm and 665 nm in a microplate spectrophotometer reader

**Table 1**

Experimental design matrix including extraction conditions and results for each response variable studied for the optimization of the SFE of the green macroalga *Cladophora glomerata*. Values presented are mean  $\pm$  sd.

Exp.	SFE extraction conditions			Extraction yield [%]	Total carotenoids content [mg FE g <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	Total phenols content [mg GAE g <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	Antioxidant activity TEAC [mmol TE g <sup>-1</sup> ] <sup>c</sup>
	Temp. [°C]	Pressure [bar]	Ethanol [%]				
1	50	200	7.5	3.0	18.20 $\pm$ 0.09	13.36 $\pm$ 0.90	0.250 $\pm$ 0.008
2	50	200	7.5	2.6	15.12 $\pm$ 0.55	12.37 $\pm$ 0.50	0.201 $\pm$ 0.010
3	50	200	7.5	3.0	19.25 $\pm$ 0.65	12.57 $\pm$ 0.42	0.247 $\pm$ 0.008
4	40	100	7.5	2.7	18.34 $\pm$ 0.49	12.06 $\pm$ 0.40	0.230 $\pm$ 0.005
5	40	300	7.5	3.1	19.24 $\pm$ 0.30	14.80 $\pm$ 0.47	0.344 $\pm$ 0.012
6	60	100	7.5	3.7	16.59 $\pm$ 0.58	10.56 $\pm$ 0.27	0.296 $\pm$ 0.017
7	60	300	7.5	3.3	21.50 $\pm$ 0.55	16.10 $\pm$ 0.75	0.313 $\pm$ 0.005
8	50	100	0	0.6	1.69 $\pm$ 0.04	2.26 $\pm$ 0.21	0.022 $\pm$ 0.002
9	50	300	0	0.9	6.17 $\pm$ 0.24	4.64 $\pm$ 0.15	0.060 $\pm$ 0.001
10	50	100	15	5.3	14.22 $\pm$ 0.86	14.25 $\pm$ 0.59	0.257 $\pm$ 0.007
11	50	300	15	3.6	15.58 $\pm$ 0.45	14.05 $\pm$ 0.76	0.230 $\pm$ 0.006
12	40	200	0	0.6	2.38 $\pm$ 0.01	2.65 $\pm$ 0.24	0.032 $\pm$ 0.003
13	60	200	0	0.9	3.57 $\pm$ 0.22	5.63 $\pm$ 0.32	0.027 $\pm$ 0.002
14	40	200	15	4.3	12.72 $\pm$ 0.35	13.86 $\pm$ 0.15	0.222 $\pm$ 0.009
15	60	200	15	4.1	13.04 $\pm$ 0.00	13.37 $\pm$ 0.35	0.186 $\pm$ 0.005
<i>U. flexuosa</i>	40	300	11.4	0.4	5.68 $\pm$ 0.15	12.18 $\pm$ 2.48	0.944 $\pm$ 0.137
<i>C. fragilis</i>	40	300	11.4	1.0	24.90 $\pm$ 1.61	30.20 $\pm$ 4.96	0.476 $\pm$ 0.017

<sup>a</sup> mg fucoxanthin equivalents g<sup>-1</sup> extract.

<sup>b</sup> mg gallic acid equivalents g<sup>-1</sup> extract.

<sup>c</sup> mmol trolox equivalents g<sup>-1</sup> extract.

Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Winooski, VT). Fucoxanthin was used as carotenoid standard and chlorophyll *a* was used as chlorophylls standard to obtain calibration curves. Total carotenoids content was expressed as mg of fucoxanthin per g of extract, whereas total chlorophylls were expressed as mg of chlorophyll *a* per g of extract. All analyses were done in duplicate.

#### 2.4.2. Total phenols content (Folin-Ciocalteu method)

Total phenols content (TPC) in the obtained extracts was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method [44] with some modifications [45]. Thus, 10  $\mu$ l aliquot of extract solution (concentration range from 10 to 20 mg ml<sup>-1</sup>) and 600  $\mu$ l of ultrapure water were mixed, to which 50  $\mu$ l undiluted Folin-Ciocalteu reagent added. After 1 min, 150  $\mu$ l of 20% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were added and the volume was made up to 1.0 ml with water. The samples were incubated for 2 h at 20 °C in the darkness. Afterwards, 300  $\mu$ l of each reaction mixture were transferred to a 96-well microplate. The absorbance was measured at 760 nm in a microplate spectrophotometer reader Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Winooski, VT). Standard curves with serial gallic acid solutions were used for calibration. The phenolic content was expressed as mg of gallic acid (GAE) per g of extract. All analyses were done in triplicate.

#### 2.4.3. Antioxidant activity determination: TEAC assay

The antioxidant activity of the obtained algal extracts was determined using the Trolox Equivalents Antioxidant Capacity (TEAC) methodology [46]. The analyses were carried out according to Re et al. [47] with some modifications. ABTS<sup>•+</sup> radical was generated by the reaction of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate in the dark at room temperature (25 °C) during 16 h before its use. The aqueous ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with 5 mM phosphate buffer (pH 7.4) until an absorbance of 0.7 ( $\pm$  0.02) at 734 nm was achieved. Afterwards, 1 ml of ABTS<sup>•+</sup> solution was mixed with 10  $\mu$ l of extracts (5 different concentrations) and 300  $\mu$ l of the mixture were transferred into a 96-well microplate. The absorbance was measured at 734 nm every 5 min during 45 min in a microplate spectrophotometer reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Trolox was used as a reference standard. Results were expressed as mmol of Trolox per g of extract. These values were obtained from five different concentrations of each extract tested (between 0.5 and 15 mg ml<sup>-1</sup>) in the assay giving a linear

response between 20% and 80% blank absorbance. All analyses were done in triplicate.

#### 2.5. HPLC-DAD-MS-based chemical characterization

The chromatographic separation of the extracts obtained in the optimum conditions was performed using an Agilent 1200 series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) consisting in a binary pump, an autosampler and a diode-array detector (DAD), directly coupled to an ion trap mass spectrometer (Agilent ion trap 6320) with an APCI (atmospheric pressure chemical ionization) interface.

To evaluate carotenoids and chlorophylls profiles, a YMC-C30 reversed-phase column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m particle diameter, YMC Europe, Schermbeck, Germany) was used. A mixture of methanol-MTBE-water (90:7:3 v/v/v, A) and methanol-MTBE (10:90 v/v, B) was employed as mobile phase using the following gradient elution: 0 min, 0% B; 20 min, 5% B; 25 min, 20% B; 30 min, 35% B; 35 min, 80% B; 40 min, 100% B; 50 min, 100% B. The flow rate was 0.6 ml min<sup>-1</sup>, and the injection volume 10  $\mu$ l, whereas the UV-Vis detection was performed at 450 and 660 nm (recorded spectra from 240 to 770 nm). APCI-MS detection under positive ionization mode was employed, using the following conditions: dry temperature: 350 °C; mass range: *m/z* 150–1300; dry gas flow rate: 5 l min<sup>-1</sup>; nebulization pressure: 60 psi.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of supercritical fluid extraction conditions

An experimental design was applied to optimize the SFE extraction conditions so that extracts with the maximum amount of bioactive compounds (carotenoids and phenols) and the highest antioxidant activity possible were obtained. Optimization was carried out using *C. glomerata* and the optimum conditions were subsequently employed for the rest of green algae studied in the present work. Therefore, a three-level factorial design was set-up using three factors: extraction temperature (40, 50 and 60 °C), pressure (100, 200 and 300 bar) and ethanol (co-solvent) content (0%, 7.5% and 15% ethanol). The extraction time was set at 2 h based on our previous experience with the extraction of natural matrices [48]. Four different response variables were selected, i.e. extraction yield, total carotenoids content, total phenols content and

antioxidant activity. The obtained results are summarized in Table 1. As can be seen, higher extraction yields were obtained using 15% ethanol as modifier, thus confirming the presence of more polar compounds in the algae that were favorably solubilized by increasing the ethanol content. On the other hand, the most-favorable conditions to maximize total carotenoids and total phenols recoveries were obtained using the highest temperature (60 °C) and pressure (300 bar) tested combined with the use of 7.5% ethanol as co-solvent. Interestingly, the extract which presented the highest antioxidant activity was produced using similar pressure and proportion of co-solvent but lower extraction temperature (40 °C). This has been previously observed for the extraction of

thermolabile antioxidants from natural sources [49,50]. In any case, the use of neat SC-CO<sub>2</sub> (without co-solvent) always provided the lowest extraction yields, as well as the lowest total carotenoids, total phenols content and antioxidant activity. This is in agreement with previous results obtained in which the addition of ethanol as co-solvent in SFE resulted in more efficient extraction of bioactive compounds, such as phenolic compounds [49] and carotenoids [51]. The use of ethanol significantly increases the amount of carotenoids such as lutein, neoxanthin, zeaxanthin, astaxanthin and  $\beta$ -carotene, recovered both from macroalgae [51] and microalgae [52] compared to the use of neat SC-CO<sub>2</sub>.

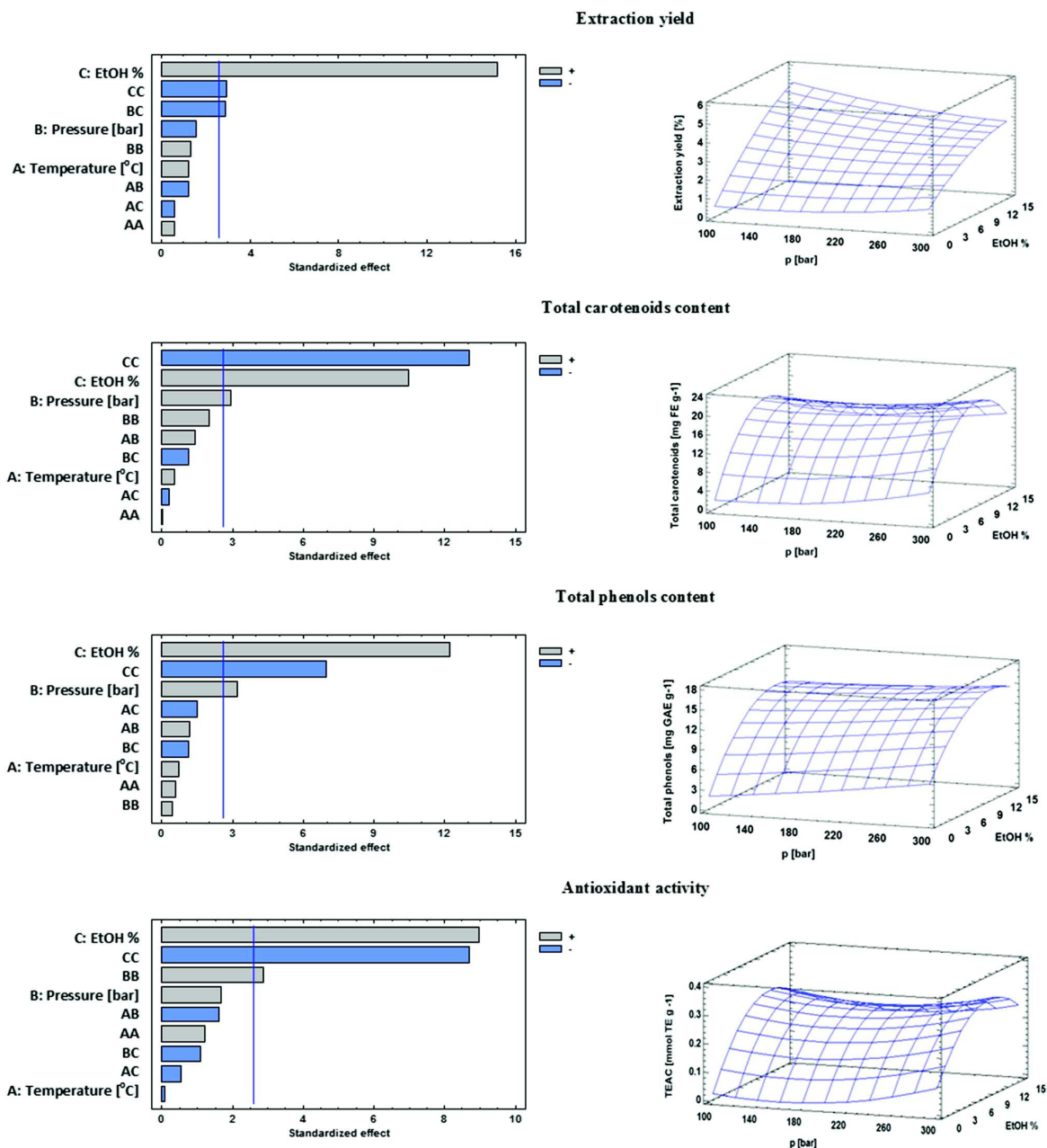


Fig. 2. Standardized Pareto charts for the four response variables studied in the experimental design (grey and blue bars show negative and positive effects, respectively), and their corresponding response surfaces. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 2 shows the standardized Pareto charts for the four response variables studied and their corresponding response surfaces. Different bar shadings indicate positive and negative effects of the factors on the response variables whereas the vertical line tests the significance of the effects at the 95% confidence level. As can be seen, ethanol content was always the most important factor. In general, analyzing the ANOVA for the four different responses considered (Table 2), ethanol content was significant for its linear and quadratic coefficients for all the response variables while pressure was only significant for total carotenoids and total phenols content. The quadratic term of pressure and the interaction pressure  $\times$  ethanol content were significant for antioxidant activity and extraction yield, respectively. As can be observed, determination coefficients were higher than 0.97 for all the studied models and the lack of fit was not significant, showing that the model was appropriate to describe the region explored. By analyzing the surface plots for each variable, it can be observed that the extraction conditions needed to maximize the different response variables were not always the same. Extraction yield hardly depended on temperature and pressure. Response surfaces of total carotenoids and total phenols content had a similar behavior, with values slightly increasing according to an increment on pressure whereas temperature did not have a marked influence. In the case of antioxidant activity, this variable increased with pressure, at the lowest tested temperatures. In order to consider the four response variables at the same time, a multiple response optimization was carried out including extraction yield, total carotenoids, total phenols and antioxidant activity, considering that all the variables had the same importance (weight). The optimum global extraction conditions provided by the statistical model included the use of 40 °C as extraction temperature, 300 bar as process pressure and 11.4% ethanol as co-solvent. Similar extraction parameters, that mean relatively low temperatures, high pressures and the addition of ethanol, were also described in other works concerning SFE. Wu et al. [53] recovered more phenolic compounds from wine rice less using lower extraction temperatures (30 °C). Similar results were observed in studies of Braga et al. [50], where the temperature in the range of 30–50 °C, the pressure of 100–300 bar and the addition of ethanol were used to extract antioxidants from pine bark. The application of 10% of ethanol as a modifier in SFE resulted in higher extraction yield of carotenoids from microalga *Scenedesmus* sp. [51]. Moreover, the addition of ethanol influences the more efficient isolation of phenols from rosemary [49]. In our case under optimal extraction conditions, predicted values of 3.7%, 18.95 mg fucoxanthin equivalents  $g^{-1}$  and 15.29 mg GAE  $g^{-1}$ , were obtained for extraction yield, total carotenoids and total phenols contents, respectively, whereas the predicted TEAC value was 0.347 mmol TE  $g^{-1}$

for *C. glomerata*. Moreover, an overall desirability value of 0.855 was obtained. The theoretical values provided by the model were very similar to those experimental values obtained in the closest extraction conditions studied included in the experimental design, that is, those of experiment 5 (40 °C, 300 bar and 7.5% ethanol), as can be clearly appreciated in Table 1. Once the optimum extraction conditions were confirmed for the freshwater green macroalga *C. glomerata* samples, the use of these parameters was employed for the two other investigated species: *U. flexuosa* and *C. fragilis*. This decision was based on the fact that the three studied species grew in the same habitat (freshwater) and belong to the same group (green algae). Moreover, similar chemical composition (carotenoids, chlorophylls) was expected. Under those conditions, the attained extracts were studied in terms of *in-vitro* assays and were chemically characterized by HPLC-MS in order to correlate their chemical composition with their activities.

### 3.2. Study of freshwater green macroalgae: *Cladophora glomerata*, *Ulva flexuosa* and *Chara fragilis*

Results obtained for *in vitro* assays for extracts produced under the optimum SFE conditions for *U. flexuosa* and *C. fragilis* are summarized in Table 1. As can be seen, extracts obtained from *C. fragilis* were characterized by the highest amounts of total carotenoids and phenols. Therefore, this alga was found as the species with the highest content of antioxidants (carotenoids, phenols) among the three tested algae. So far, no previous studies had confirmed the freshwater *C. fragilis* as a rich source of carotenoids and phenols. Results obtained by Kartal et al. [16] for total phenols content in freshwater *C. hispida* shown that the algae contained far much smaller amounts of these compounds (2.82 mg GAE  $g^{-1}$ ) in contrast to our studies for *C. fragilis* (30.20 mg GAE  $g^{-1}$ ). Also *C. glomerata* turned out to be a species with relatively high total carotenoids and phenols content, as well as the antioxidant activity. Freshwater *C. glomerata* investigated by Khuantrairong & Traichaiyaporn [18] was characterized by extremely lower total carotenoids content (0.889 mg  $g^{-1}$ ), compared to the sample studied in our work (16.59 mg  $g^{-1}$ ). However, biodiversity as well as the influence of growing and environmental conditions may be responsible for these differences, as *C. glomerata* harvested in Thailand was shown to contain even higher amount of total phenols, reaching 184 mg GAE  $g^{-1}$  [15]. Moreover, accordingly, higher values of antioxidant activity were also obtained (0.92 mmol TE  $g^{-1}$ ) [15].

Among the studied samples, *U. flexuosa* was the species with the lowest total phenols content (Table 1). However, interestingly, a direct relationship between total phenols or total carotenoids and antioxidant

**Table 2**

Regression coefficients (values of variables are specified in their original units) and statistics for the fit obtained by multiple linear regression.

Terms of the model	Extraction yield [%]		Total carotenoids content [mg FE $g^{-1}$ ]		Total phenols content [mg GAE $g^{-1}$ ]		Antioxidant activity TEAC [mmol TE $g^{-1}$ ]	
	Estimate	p-Value	Estimate	p-Value	Estimate	p-Value	Estimate	p-Value
Constant	0.1189		10.5546		10.5217		0.3052	
Temp.	−0.0336	0.2743	−0.1068	0.6335	−0.3700	0.5200	−0.0132	0.9459
Pressure	0.0039	0.1787	−0.0854	0.0328*	−0.0262	0.0251*	−0.0002	0.1522
Ethanol %	0.5727	0.0000*	3.5953	0.0001*	2.5521	0.0001*	0.0579	0.0003*
Temp. $\times$ temp.	0.0009	0.5977	−0.0005	0.9517	0.0035	0.5953	0.0002	0.2789
Temp. $\times$ pressure	−0.0002	0.2832	0.0010	0.2136	0.0007	0.2854	−0.00002	0.1639
Temp. $\times$ ethanol %	−0.0013	0.5787	−0.0029	0.7698	−0.0116	0.1985	−0.0001	0.6245
Pressure $\times$ pressure	0.00002	0.2489	0.00014	0.1064	0.00003	0.6785	0.000004	0.0353*
Pressure $\times$ ethanol %	−0.0006	0.0359*	−0.0010	0.3182	−0.0009	0.3207	−0.00002	0.3243
Ethanol % $\times$ ethanol %	−0.0091	0.0327*	−0.1698	0.0000*	−0.0753	0.0009*	−0.0024	0.0003*
Statistics for goodness of fit of the model								
R <sup>2</sup>	0.981		0.984		0.977		0.973	
RSD	0.337		1.406		1.171		0.029	
P	0.802		0.593		0.889		0.845	
RRSD (%)	1.70		4.95		5.75		0.15	

R<sup>2</sup> – determination coefficient, RSD – residual standard deviation, P – value of the lack-of-fit test for the model, RRSD – residual standard deviation expressed as a percentage of the mean value of the response; \* significant coefficients of the model.

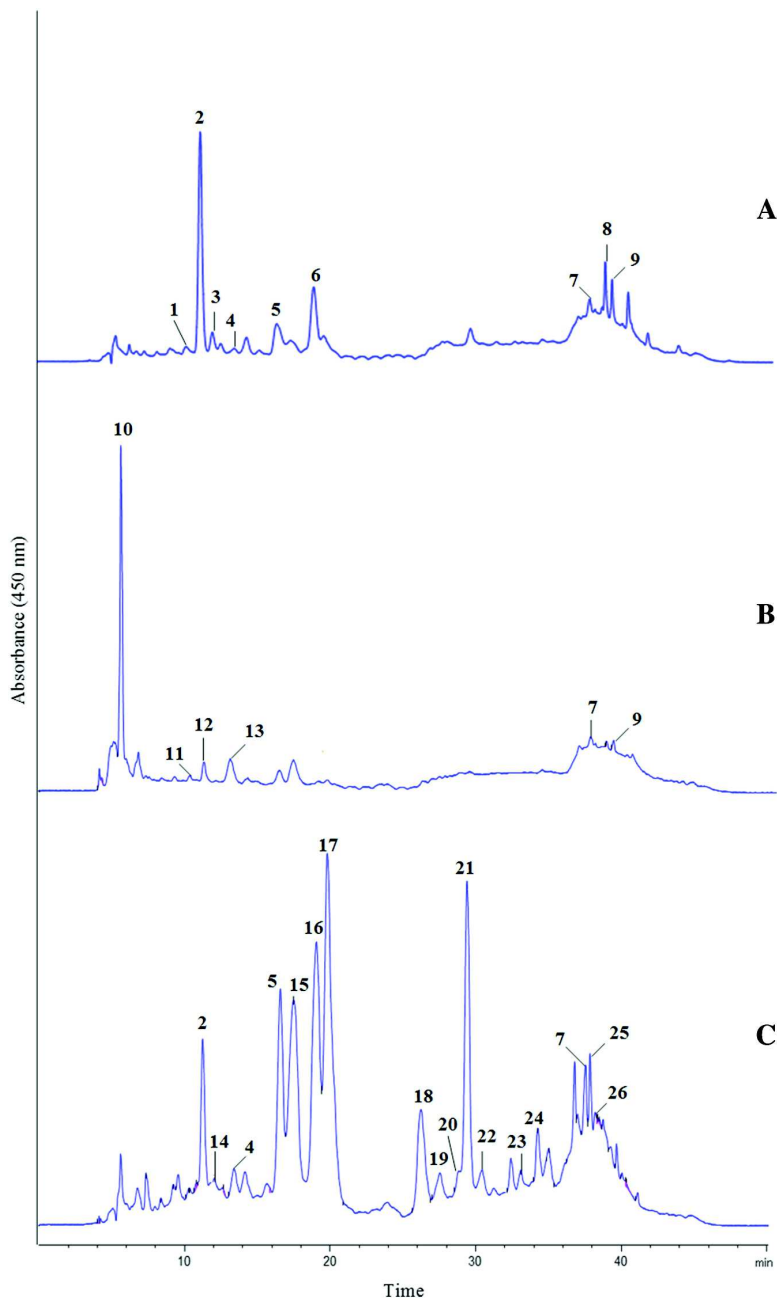
activity was not observed as the highest antioxidant activity was presented in *U. flexuosa* extracts. Thus, the high antioxidant activity of *U. flexuosa* may result from the presence of other relatively polar compounds, such as sulfated polysaccharides [30,54]. There is a lack of information concerning *in vitro* assays of freshwater *U. flexuosa* in the literature, although the sample studied contained more total phenols than others marine *U. flexuosa* ( $2.674 \text{ mg GAE g}^{-1}$ ) [55].

In order to shed more light on the compounds that could be responsible for the antioxidant activity determined in these samples, a HPLC-MS-based chemical characterization of the extracts obtained under the optimum SFE conditions was carried out.

### 3.3. Chemical characterization of freshwater green macroalgae SFE extracts

The generated SFE extracts were chemically characterized using an HPLC-DAD-MS method. Thanks to the use of both DAD and MS detectors, it was possible to collect the UV-Vis and MS spectra of the separated compounds, thus allowing the tentative identification of the most relevant components in each sample. Fig. 3 shows the chromatograms obtained for the studied samples. The information related to the tentatively assigned peaks is summarized in Table 3.

As it can be observed, the carotenoids composition varied depending on the sample studied; only fucoxanthin and astaxene occurred in both



**Fig. 3.** Chromatograms (450 nm) obtained for the three freshwater green macroalgae species studied. A) *Cladophora glomerata*, B) *Ulva flexuosa*, C) *Chara fragilis*. For peak identification, see Table 3.

**Table 3**  
Identification of carotenoids and chlorophylls in the extracts from the three freshwater green macroalgae species studied including their UV–Vis and MS spectra characteristics.

Peak number	Rt [min]	[M + H] <sup>+</sup>	Main fragments	UV–Vis maxima [nm]	Proposed compound
<i>Cladophora glomerata</i>					
1	10.2	583.6	567, 458, 402	450	NI
2	11.3	659.7	642, 624, 581, 563, 489, 483, 238, 221	432, 447, 467	Fucoxanthin
3	12.2	661.5	641, 607, 581, 551	340, 428	NI
4	13.4	663.9	636, 608, 553, 497	438, 467	NI
5	16.4	593.0	441, 204, 150	452	Astacene
6	18.9	955.0	922, 836, 709, 473, 675, 645	430, 455, 635	
7	37.5	888.0	844, 732, 664, 610, 594, 518	410, 506, 533, 609, 665	Hydroxypheophytin a
8	38.7	886.0	858, 630, 608	413, 435, 600, 665	NI
9	39.0	872.0	840, 856, 838, 594, 547, 533	409, 507, 536, 610, 666	Pheophytin a
<i>Ulva flexuosa</i>					
10	5.5	549.0	459, 444, 346	466, 600, 651	NI
11	10.2	584.0	457, 401	454	Deinoxanthin
12	11.2	654.4	582, 568, 443, 430, 419, 402	449, 470s	Siphonaxanthin
13	12.8	614.2	600, 582, 557, 569, 551, 542, 483	434, 586, 629, 650	Chlorophyllide a
7	37.5	888.0	873, 844, 666, 610, 594	409, 502, 532, 610, 667	Hydroxypheophytin a
9	39.0	872.4	855, 840, 812, 594, 547, 533	408, 505, 536, 608, 666	Pheophytin a
<i>Chara fragilis</i>					
2	11.2	659.9	642, 624, 580, 561, 489, 483, 237, 221	432, 448, 468	Fucoxanthin
14	12.1	587.6	570, 551, 533, 494, 481, 446	426, 448	Micromonol
4	13.4	663.8	608, 553, 497	438, 470	NI
5	16.6	593.4	440, 203	456	Astacene
15	17.5	924.7	670, 645, 592, 576, 524, 494	464, 599, 650	Hydroxychlorophyll b
16	19.0	905.9	628	467, 601, 648	Chlorophyll b
17	19.8	1014.8	967, 689	455, 635	NI
18	26.2	910.0	912, 632, 892, 837	427, 663, 615	Hydroxychlorophyll a
19	27.5	954.3	909, 869, 725, 678	421, 656	NI
20	28.8	894.0	877, 861, 834, 614, 569, 540	431, 619, 666	Chlorophyll a
21	29.4	569.6	552, 511, 476, 462, 457, 415, 392	419, 442, 472	Lutein
22	30.5	954.4	907, 866, 821, 676, 629		NI
23	33.1	456.0	365, 351	448, 473	Citranaxanthin
24	34.3	635.7	618, 601, 582, 565, 548, 545, 539, 526, 509	419, 441, 467	Mastraxanthin
7	37.5	888.0	873, 842, 666, 610, 592, 531, 519	407, 502, 533, 609, 667	Hydroxypheophytin a
25	37.9	904.8	886, 626, 539	400, 670	NI
26	38.5	918.0	887, 736, 699	400, 670	NI

NI – Not Identified.

*C. glomerata* and *C. fragilis* extracts. The extract from *C. fragilis* was characterized by the largest number of diverse carotenoids, whereas the extract from *U. flexuosa* was the poorest source of carotenoids, in good agreement also with the quantitative amounts previously determined (Table 1). Fucoxanthin was the carotenoid detected in the highest amount in *C. glomerata* extracts. This compound is a well-known strong antioxidant, which typically occur in brown algae [56,57]. So far, fucoxanthin has not been found in freshwater *Cladophoraceae* and generally is not a typical carotenoid for green algae; however, Mikami and Hosokawa [58] proposed two biosynthetic pathways for fucoxanthin in brown algae based on  $\beta$ -carotene conversion to fucoxanthin from diadinoxanthin and from neoxanthin. There are few carotenogenic genes involved in fucoxanthin biosynthetic pathway present both in brown and green algae [58]. Hence, the presence of fucoxanthin in green algae may result from biotransformations of different carotenoids, which is still not fully understood. *C. glomerata* extract also contained other carotenoids that could not be completely identified, excepting astacene, which had not been detected in freshwater *C. glomerata* in previous studies. With regard to *U. flexuosa* extracts, two other carotenoids could be tentatively identified, namely deinoxanthin and siphonaxanthin. On the other hand, *C. fragilis* extracts contained a higher variety of components. Lutein was the most relevant among the identified carotenoids, which also included fucoxanthin, micromonol, astacene, citranaxanthin, and mastraxanthin. Regarding the activities associated to those components, lutein is well-known to possess anti-free radical properties and is widely used in cosmetic and food industry [59]. Moreover previous studies have also pointed out this carotenoid as the main one on freshwater *Charophytes* collected in Austrian lakes, being fucoxanthin similarly present [34].

Concerning the rest of pigments, other compounds could be also tentatively assigned, as summarized in Table 3, being mainly chlorophyll-related compounds. Chlorophyll *a* and chlorophyll *b* are characteristic chlorophylls for green algae, and consequently, they have previously been detected in high amounts in freshwater *C. glomerata* [18] freshwater *Chara* species [34] and in various marine *Ulva* species [60]. Nevertheless, in our studies these compounds were not detected in either *C. glomerata* or *U. flexuosa*, but only some related derivatives. On the contrary, chlorophylls *a* and *b* were present in *C. fragilis* SFE extracts.

As above mentioned, the chemical composition of freshwater *C. fragilis* and *U. flexuosa* in terms of carotenoids has not been so far described. Therefore, this contribution shows the first available tentative data in this line. With regard to freshwater *C. glomerata* some investigations related to carotenoids composition have been conducted [15–17, 19,20]. However, in our studies other carotenoids have been tentatively detected, which have not been found in the freshwater species so far.

#### 4. Conclusions

In the present work SFE has been employed to obtain extracts from freshwater green macroalgae: *C. glomerata*, *U. flexuosa* and *C. fragilis* naturally occurring in inland waters in Poland. The main aim of the study was to valorize the studied algae by approaching their chemical composition and biological activity which has not been described so far. To do that, an experimental design was used to optimize the extraction conditions in order to maximize the selected response variables (extraction yield, total carotenoids, total phenols and antioxidant activity) which included the use of 40 °C, 300 bar as extraction temperature and

pressure, respectively, and 11.4% ethanol as co-solvent. At the mentioned conditions, *C. fragilis* extracts were the richest in total carotenoids and total phenols whereas those produced from *U. flexuosa* possessed the highest antioxidant activity. The chemical characterization of those extracts, carried out by HPLC-DAD-MS, allowed the tentative assignment of diverse carotenoids and chlorophylls and related compounds in the studied algae. Different carotenoids have been described for the first time on these species. To sum up, the investigated freshwater green algae from polish water reservoirs contained bioactive compounds and exhibited antioxidant properties and, thus, they may be considered as new raw materials for the cosmetic, food or pharmaceutical industries. Hence, the developed process can be considered as an alternative for the valorization of these underexploited materials through the isolation of bioactive components.

### Acknowledgments

This project is partially financed in the framework of grant 2014/13/B/NZ8/04690 entitled: “Physicochemical and biological causes of ecological dominance of filamentous green algae in freshwater ecosystems” from the Polish National Science Centre in years 2015–2018. The authors would like to thank Project AGL2014-53609-P (MINECO, Spain) for financial support. M. H. would like to thank MICINN for his “Ramón y Cajal” research contract.

### References

- [1] K. Chojnacka, A. Saeid, I. Michalak, The possibilities of the application of algal biomass in the agriculture, *Chemik* 66 (11) (2012) 1235–1248.
- [2] J. Fabrowska, B. Łęska, G. Schroeder, Freshwater *Cladophora glomerata* as a new potential cosmetic raw material, *Chemik* 69 (8) (2015) 491–497.
- [3] M.F. De Jesus Raposo, A.M. Bernardo de Moraes, R.M. Santos, C. de Moraes, Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications, *Mar. Drugs* 13 (5) (2015) 2967–3028.
- [4] J.J. Milledge, B.V. Nielsen, D. Bailey, High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* (2015) (article in press).
- [5] A.M. Sanghvi, Y.M. Lo, Present and potential industrial applications of macro- and microalgae, *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 2 (2010) 187–194.
- [6] C. Grosso, P. Valentão, F. Ferreres, P.B. Andrade, Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds, *Mar. Drugs* 13 (2015) 3182–3230.
- [7] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae, a review, *Food Chem.* 98 (2006) 136–148.
- [8] M. Herrero, A.P. Sánchez-Camargo, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction, *Trends Anal. Chem.* 71, 26–38.
- [9] J. Fabrowska, B. Łęska, G. Schroeder, B. Messyasz, M. Pikosz, Biomass and extracts of algae as material for cosmetic, in: S.-K. Kim, K. Chojnacka (Eds.), *Marine Algae Extracts: Processes, Products, Applications*, Wiley, Weinheim 2015, pp. 681–706.
- [10] M.N. Khalid, M. Shameel, V.U. Ahmad, The bioactivity and phytochemistry of two species of *Cladophora* (*Siphonocladophyceae*) from Sindh, *Proc. Pak. Acad. Sci.* 49 (2012) 113–121.
- [11] B. Messyasz, B. Łęska, J. Fabrowska, M. Pikosz, E. Róji, A. Cieślak, G. Schroeder, Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the cosmetic industry, *Open Chem.* 13 (2015) 1108–1118.
- [12] G. Schroeder, B. Łęska, B. Messyasz, M. Pikosz, J. Fabrowska, Extraction of macroalgae biomass for cosmetics industry, *Przem. Chem.* 94 (3) (2015) 405–407.
- [13] G. Schroeder, B. Messyasz, B. Łęska, J. Fabrowska, M. Pikosz, A. Rybak, Biomass of freshwater algae as raw material for the industry and agriculture, *Przem. Chem.* 92 (7) (2013) 1380–1384.
- [14] W.K. Dodds, D.A. Gudder, The ecology of *Cladophora*, *J. Phycol.* 28 (1992) 415–427.
- [15] D. Amornlerdpison, K. Mengumphan, S. Thumvijit, Y. Peerapornpisal, Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalgae, *Cladophora glomerata* Kütz. *Thai J. Agric. Sci.* 44 (5) (2011) 283–291.
- [16] M. Kartal, I. Orhan, M. Abu-Asaker, F.S. Senol, T. Atici, B. Sener, Antioxidant and anticholinesterase assets and liquid chromatography-mass spectrometry preface of various fresh-water and marine macroalgae, *Pharmacogn. Mag.* 5 (20) (2009) 291–297.
- [17] T. Khuantairong, S. Traichaiyaporn, The nutritional value of edible freshwater alga *Cladophora* sp. (*Chlorophyta*) grown under different phosphorus concentrations, *Int. J. Agric. Biol.* 13 (2011) 297–300.
- [18] T. Khuantairong, S. Traichaiyaporn, Enhancement of carotenoid and chlorophyll content of an edible freshwater alga (*Kai: Cladophora* sp.) by supplementary inorganic phosphate and investigation of its biomass production, *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 6 (2012) 1–11.
- [19] C. Welker, P. de Negro, M. Sarti, Green algal carotenoids and yellow pigmentation of rainbow trout fish, *Aquac. Int.* 9 (2001) 87–93.
- [20] Y. Yoshii, T. Hanyuda, Carotenoid compositions of *Cladophora* balls (*Aegagropila linnaei*) and some members of the *Cladophorales* (*Ulvophyceae*, *Chlorophyta*): their taxonomic and evolutionary implication, *J. Phycol.* 40 (2004) 1170–1177.
- [21] C. Akküz, D. Arslan, A. Ünver, M.M. Özcan, B. Yılmaz, Chemical composition, total phenolic and mineral contents of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Kütz. and *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. seaweeds, *J. Food Biochem.* 35 (2011) 513–523.
- [22] R. Fletcher, The occurrence of “green tides” – a review, in: W. Schramm, S. Nienhuis (Eds.), *Marine Benthic Vegetation; Recent Changes and the Effects of Eutrophication*, Springer-Verlag, New York 1996, pp. 7–43.
- [23] C. Boisvert, L. Beaulieu, C. Bonnet, E. Pelletier, Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of three species of edible seaweeds, *J. Food Biochem.* 39 (2015) 377–387.
- [24] H.M. Khairy, M.A. El-Sheikh, Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt, Saudi J. Biol. Sci. 22 (2015) 623–630.
- [25] S.M.M. Shanab, E.A. Shalaby, E.A. El-Fayoumy, *Enteromorpha compressa* exhibits potent antioxidant activity, *J. Biomed. Biotechnol.* 726405 (2011) 1–11.
- [26] S. Sharmila, L. Jeyanthi Rebecca, Phytochemical analysis of *Enteromorpha flexuosa* and *Ulva lactuca*: a comparative study, *Int J Pharm. Bio. Sci* 5 (4) (2014) 830–834.
- [27] O.M. Ahmed, R.R. Ahmed, Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells in vitro and in vivo, *J. Cancer Sci. Ther.* 6 (2014) 2002–2008.
- [28] H. Qi, T. Zhao, Q. Zhang, Z. Li, Z. Zhao, R. Xing, Antioxidant activity of different molecular weight sulphated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (*Chlorophyta*), *J. Appl. Phycol.* 17 (2005) 527–534.
- [29] I. Wijesekara, R. Pangestutia, S.-K. Kim, Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 14–21.
- [30] R. Rankiewicz, B. Łęska, B. Messyasz, J. Fabrowska, M. Sołoduha, M. Pikosz, First isolation of polysaccharidic ulvans from cell wall of freshwater algae, *Algal Res.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.025>.
- [31] <http://www.algaebase.org/Accessed15.10.06>.
- [32] S.M. Khaliq-Uz-Zaman, S. Shameel, M. Shameel, S.M. Leghari, V.U. Ahmad, Bioactive compounds in *Chara corallina* var. *wallichii* (A. Br.) R. D. Wood (*Charophyta*), *Pak. J. Bot.* 30 (1) (1998) 19–31.
- [33] G.W. Patterson, K.C. McKenna, W.R. Lusby, M.A. Bisson, Sterols of the *Charophyceae*, *J. Nat. Prod.* 54 (1991) 1141–1143.
- [34] M. Schagerl, C. Pichler, Pigment composition of freshwater *charophyceae*, *Aquat. Bot.* 67 (2000) 117–129.
- [35] A.P. Sánchez-Camargo, J.A. Mendiola, E. Ibáñez, M. Herrero, Supercritical fluid extraction, in: J. Reedjik (Ed.), *Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, MA, Elsevier, Waltham, 2014.
- [36] M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Supercritical fluid extraction: recent advances and applications, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2495–2511.
- [37] M. Herrero, M. Castro-Puyana, J.A. Mendiola, E. Ibáñez, Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 67–83.
- [38] M. Goto, H. Kanda, E.Y. Wahyudiono, S. Machmudah, Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether, *J. Supercrit. Fluids* 96 (2015) 245–251.
- [39] P. Pérez-López, E.M. Balboa, S. González-García, H. Domínguez, G. Feijoo, M.T. Moreira, Comparative environmental assessment of valorization strategies of the invasive macroalgae *Sargassum muticum*, *Bioresour. Technol.* 161 (2014) 137–148.
- [40] M.-K. Roh, M.S. Uddin, B.-S. Chun, Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13 (2008) 724–729.
- [41] A.T. Quitain, T. Kai, M. Sasaki, M. Goto, Supercritical carbon dioxide extraction of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 5792–5797.
- [42] A. Tanniou, L. Esteban Serrano, L. Vandanjon, E. Ibáñez, J.A. Mendiola, S. Cerantola, N. Kervarec, S. La Barre, L. Marchal, V. Stiger-Pouvreau, Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model, *Talanta* 104 (2013) 44–52.
- [43] H.K. Liechenthaler, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biobiomembranes, *Methods Enzymol.* 148 (1978) 350–382.
- [44] O. Folin, V. Ciocalteu, On tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *J. Biol. Chem.* 73 (1927) 627–650.
- [45] M. Kosar, H.J.D. Dorman, R. Hiltunen, Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species, *Food Chem.* 91 (2005) 525–533.
- [46] N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407–412.
- [47] R. Re, P. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [48] A. Taamalli, D. Arráez-Román, E. Barrajón-Catalán, V. Ruiz-Torres, A. Pérez-Sánchez, M. Herrero, E. Ibáñez, V. Micol, M. Zarrouk, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 1817–1825.
- [49] A.P. Sánchez-Camargo, A. Valdés, G. Sullini, V. García-Cañas, A. Cifuentes, E. Ibáñez, M. Herrero, Two-step sequential supercritical fluid extracts from rosemary with enhanced anti-proliferative activity, *J. Funct. Foods* 11 (2014) 293–303.

- [50] M.E.M. Braga, R. Santos, I.J. Seabra, R. Facanali, M.O.M. Marques, H.C. de Sousa, Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2008) 37–48.
- [51] V. Abrahamsson, I. Rodriguez-Meizoso, C. Turner, Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 63–68.
- [52] J.-L. Pan, H.-M. Wang, C.-Y. Chen, J.-S. Chang, Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by supercritical carbon dioxide fluid with ethanol modifier, *Eng. Life Sci.* 12 (2012) 638–647.
- [53] J.J. Wu, J.C. Lin, C.H. Wang, T.T. Jong, H.L. Yang, S.L. Hsu, J.C. Chieh-Ming, Extraction of antioxidative compounds from wine lees using supercritical fluids and associated anti-tyrosinase activity, *J. Supercrit. Fluids* 50 (1) (2009) 33–41.
- [54] P. Shao, M. Chen, Y. Pei, P. Sun, In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophyten seaweeds *Ulva fasciata*, *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 295–300.
- [55] M. Farasat, R.-A. Khavari-Nejad, S.M. Bagher Nabavi, F. Namjooyan, Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf, Iran, *J. Pharm. Res.* 13 (1) (2014) 163–170.
- [56] A. Fung, N. Hamid, J. Lu, Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*, *Food Chem.* 136 (2013) 1055–1062.
- [57] S.Z. Moghadamtousi, H. Karimian, R. Khanabdali, M. Razavi, M. Firoozinia, K. Zandi, H.A. Kadir, Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae, *Sci. World J.* 768323 (2014) 1–10.
- [58] K. Mikami, M. Hosokawa, Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 13763–13781.
- [59] R. Shegokar, K. Mitri, Carotenoid lutein: a promising candidate for pharmaceutical and nutraceutical applications, *J. Diet. Suppl.* 9 (3) (2012) 183–210.
- [60] S. Dere, N. Dalkiran, D. Karacaoglu, G. Yildiz, E. Dere, The determination of total protein, total soluble carbohydrate and pigment contents of some macroalgae collected from Gemlik-Karacaali (Bursa) and Erdek-Ormanli (Balikesir) in the Sea of Marmara, Turkey, *Oceanologia* 45 (3) (2003) 453–471.

## **Załącznik III**

First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls  
of freshwater algae



## First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae



R. Pankiewicz<sup>a,\*</sup>, B. Łęska<sup>a</sup>, B. Messyasz<sup>b</sup>, J. Fabrowska<sup>a</sup>, M. Sołoducha<sup>a</sup>, M. Pikosz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Chemistry, Umultowska 89b, 61-614 Poznań, Poland

<sup>b</sup> Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Biology, Department of Hydrobiology, Umultowska 89, 61-614 Poznań, Poland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 September 2015

Received in revised form 25 February 2016

Accepted 26 February 2016

Available online 5 March 2016

#### Keywords:

*Ulva flexuosa*

*Cladophora glomerata*

Ulvans

Freshwater algae

Isolation

### ABSTRACT

For the first time polysaccharidic ulvans have been isolated from freshwater green macroalgae *Ulva flexuosa* and *Cladophora glomerata*. One of the main components of ulvan is 3-sulfated rhamnoglucuronan showing a wide range of interesting properties and being a source of rare sugars. The production of mono- and oligosaccharides from this polysaccharide can potentially be applied in cosmetic, pharmaceutical and food industry. In this paper a new and effective method for the isolation of ulvans from freshwater algae is described. The substance has been characterized after enzymatic hydrolysis by Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy and elemental analysis. FT-IR spectroscopy permits identification of the band characteristic of the sulfonic acid groups, specific for this kind of polysaccharides. With increasing size of the thalli, the amount of ulvans in the algae cells increases. Hence, freshwater green macroalgae *U. flexuosa* and *C. glomerata* were found as a new source of polysaccharidic ulvans that can be considered to be potentially used in medicine, pharmacy, food and cosmetic industry.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recently, in phycological, biochemical and medical literature a lot of information about bioactive compounds in marine algae has appeared [1,2]. Many authors have been interested in the marine *Ulva* genus and in particular in ulvans – a group of complex sulfated polysaccharides (SPs) composed of sulfate ester, uronic acids, xylose, rhamnose and glucose [2]. These compounds have been widely investigated, however, their chemical structure, occurrence and properties are not fully understood. Ulvans are water and alkali soluble [3], semi-crystalline compounds with hydroscopic properties [4]. These natural polymers are specific of green algae and occur in *Ulva* genus. So far, ulvans have been found only in the following marine species of *Ulva*: *Ulva lactuca* [5, 6], *Ulva rigida* [7,8], *Ulva armoricana*, *Ulva rotundata*, *Ulva scandinavica*, *Ulva olivascens*, *Ulva gigantea* [9], *Ulva clathrata* [10], *Ulva conglobata* [11], *Ulva fasciata* [12], *Ulva pertusa* [13] and *Ulva flexuosa* [14]. There are no reports in literature about the occurrence of ulvans in freshwater *Ulva* species. Polysaccharides are very interesting bioactive compounds, because of their physical, chemical properties and their potential for therapeutic application (i.e., antiviral activity, immuno-inflammatory activity). Sulfated polysaccharides (SPs) isolated from algae include agars and

alginate which are produced in red algae (i.e., *Chondrus ocellatus*), fucoidanes isolated from brown algae (i.e., *Laminaria japonica*) and ulvans from green algae (i.e., *Ulva linza*) [15]. Polysaccharides may occur in cell walls or as food reserves, and more specifically ulvans are widespread in the intercellular space and fibrillar walls of the two-cell layer-thick thallus [16]. Kylin [17], in 1913, used for the first time the term “ulvan” to define different fractions of SPs in the cell wall of *U. lactuca*. Nowadays SPs have been only prepared from marine algae belonging to the genera *Ulva* (38%), *Enteromorpha* (14%), *Monostroma* (14%) and the others (34%) [18]. Ulvan extracted from the cell wall of *Ulva*, *Enteromorpha* represents about 8–29% of the algae dry weight [1].

Pioneering investigation of ulvans was conducted on *U. lactuca* by Brading et al. in 1954, who proposed the structure of the sulfated polysaccharides and reported that they could be linked to glucose or rhamnose [5]. Afterwards, it was proven that also uronic acids, arabinose, xylose and glucuronic acids could be the components of the polysaccharides occurring in *U. lactuca* [6]. The name “ulvan” was proposed for the first time in 1993 by Lahaye and Axelos [19]. In later studies of *U. rigida* it was assumed that ulvans are mainly composed of glucuronic acid and sulfated rhamnose [7,19]. In further studies, the presence of iduronic acid as a constituent of ulvans has been shown [7]. Ulvans also have been found in other species of marine *Ulva* genus, such as: *U. armoricana*, *U. rotundata*, *U. scandinavica*, *U. olivascens* and *U. gigantea* by Lahaye et al. [9]. Polysaccharides in these algae were mainly composed of rhamnose, glucuronic acid, sulfate and traces of galactose. The major repeating units in the

\* Corresponding author.

E-mail address: [radek@px.pl](mailto:radek@px.pl) (R. Pankiewicz).

polysaccharide chain are ulvanobiuronic acid 3-sulfate A and B together with 1,4-linked-D-glucuronan as blocks within ulvan or as a separate glucuronan [9]. An important aspect of the ulvan study is the ultrastructure of these compounds. Haug has discovered that ulvans are able to create gels in the presence of calcium ions and boric acid [20]. It has been found that the SPs can also bind other metal ions, such as Al, Pb, Zn, Mn and Cu [1]. Robic et al. have proposed a three-dimensional spherical structure of ulvans, which may be formed in the presence of bivalent cations and boric acid [21,22]. Ulvan nanospheres are able to aggregate creating 'raspberry-like' structures connected by fiber-like constituents, which can be made of proteins, glucuronan and/or extended ulvan segments [22].

*Cladophora glomerata* (Chlorophyta, Ulvophyceae) is common in all types of freshwater ecosystems and can produce with time an important amount of biomass forming dense, seasonal blooms in lakes in nutrient-enriched waters [23]. *C. glomerata*, like other Chlorophyta species, has a two-layered polysaccharide cell wall, the inner one is made of cellulose and the outer one is chitinous/pectin, though cellulose is the main structural polysaccharide in the *Cladophora* [24]. For *C. glomerata* from lakes, in one cell the surface sorption area is 17.85 mm<sup>2</sup> per cell and for a filament of 1 cm in length this area amounts to 119 cm<sup>2</sup> [25].

Nowadays, biological properties and applications of ulvans are a very important topic. Ulvans exhibit a wide range of activities as bioactive compounds. What is more, these compounds are cytocompatible and are considered as non-toxic [26]. Ulvans have been found to show antioxidant properties [27–32], thus they are able to act as free-radical inhibitors or scavengers. The scavenging activity of ulvan towards superoxide and hydroxyl radicals, as well as metal chelating activity has been shown in vitro [27,30,33]. Moreover, the latest investigation of Qui and Sun on rats [32] has demonstrated the antioxidant activity in vivo of high sulfate content derivative of polysaccharides from *U. pertusa*. Another important property of ulvan is anticancer activity. There are different mechanisms of anticancer agent activity, including antioxidant, antiproliferative and antitumor [34]. The antiproliferative activity of ulvan polysaccharides has been investigated by Ahmed et al. [35]. Results from his group indicated antiproliferative and antitumor cytotoxic effects against EAC-cells, hepatoma (HepG2) and colon carcinoma (HCT116) human cell line [35]. Other authors have demonstrated the antiproliferative activities of ulvan towards human cancer cells, particularly to the breast adenocarcinoma cells [36]. SPs isolated from *Ulva* species exhibit immune stimulating properties [37–39]. This property of ulvan can be applied in therapy for diseases in which the immune system is impaired. Furthermore, anticoagulant activity of ulvan has been detected [11,36,40,41]. Ulvans have acted as heparin-like anticoagulant agents, and thus, could be potentially used in a therapy of cardiovascular and cerebrovascular diseases, for example, as a cure for hemophilia [18,34,42]. Antihyperlipidemic activity is another example of beneficial properties of ulvan in medical treatment. It has been shown that SPs from *U. pertusa* are able to regulate lipid metabolism by reduction of plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol [43, 44]. Also derivatives of ulvans from *U. pertusa*, such as acetylated ulvans and high sulfate content ulvans, show antihyperlipidemic activity [45]. Ulvan also has been found to show antiviral activity [36,46] towards herpes simplex virus type 1 (HSV-1) [47], and antiadhesive properties towards bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* [48]. All ulvan properties described above are mainly important for medical applications, in particular for the production of certain elements of medical devices. The gelling ability of ulvans [20–22] and specifically their ability to uptake water [49], make these compounds a potential biomaterial for biomedical applications, such as wound dressing and drug release systems [49–53]. What is more, the antioxidant activity of SPs may be applied in the cosmetic industry. Due to the ulvan's ability to enhance skin tissue regeneration [53] they may also be considered as bioactive compounds in the production of novel anti-aging and regenerating types of cosmetics. As natural anionic polymers, ulvans may be used as surfactants in cosmetics and detergent production [54]. Ulvans can also

constitute a raw material for the production of diet supplements or a functional food due to their antioxidant, immunostimulating, as well as antihyperlipidemic properties. To sum up, ulvans isolated from different *Ulva* species show lots of interesting properties as novel bioactive compounds for several applications in medicine, pharmacy, as well as in food and cosmetic industry.

So far, ulvans have been isolated from marine species of *Ulva* [5–14]. To the best of our knowledge the isolation of these sulphated polysaccharides from freshwater macroalgae species as their new source has not been reported so far. Thus, the first aim of the study was to determine whether the freshwater green macroalgae (*U. flexuosa*, *C. glomerata*) contain ulvans – polysaccharides, which have been isolated so far only from marine algae. After their successful extraction an attempt was made to modify the process of isolation to obtain the highest performance. The general aim of the study was to carry out the ulvan isolation process from macroalgae of the class of freshwater green algae *U. flexuosa* and *C. glomerata*. The biomass of algae used in the study came from Wielkopolska (Poland, Europe) reservoirs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Freshwater algae and environmental conditions

The freshwater macrophytic algae (Ulvophyceae, Chlorophyta) came from the west part of Poland (Central Europe; Fig. 1). *C. glomerata* (L.) Kütz. was collected from Lake Oporzynskie (N52°55', E17°9') and *U. flexuosa* subsp. *pilifera* (Kütz.) M.J. Wynne from the Nielba river (N52°48', E17°12'). Lake Oporzynskie is a shallow, eutrophic reservoir (average depth = 1.2 m) that is in the overgrowing phase, mostly by *Ceratophyllum demersum* L. Every year, both in the littoral and pelagic zone, the thalli of *C. glomerata* (L.) Kütz. develop massively, tightly covering the whole surface of the water [25]. This systematic appearance of macroalgae in the form of mats in Lake Oporzynskie drew our attention to the possibility of using the readily available biomass as raw material in various sectors of economy and industry.

### 2.2. Microscopic analyses

Microscopic images were taken using a camera (ProgRes® SpeedXT core 3, Jenoptik) connected to a light microscope (Axioskop 2 MOT Zeiss). Measurements of the length and width of cells, cell wall, pyrenoids and nuclei were made at ×20, ×40 and ×100 magnification. Pyrenoids in the chloroplasts were stained with Lugol's solutions and the nuclei by 1% acetocarmine.

### 2.3. Macroalgal biomass – harvesting area of *U. flexuosa* and *C. glomerata*

The biomass of algae *U. flexuosa* and *C. glomerata* used in the study was originally obtained from Wielkopolska Region (North Poland, Europe) reservoirs (Fig. 1). The biomass of algae *U. flexuosa* was harvested in the summer of 2014. Mats of filamentous green alga *C. glomerata* (L.) Kütz. of macroscopic size formed a large surface mat, which freely floated on the water surface (macroalgae coating); mat formation was regularly repeated every year. Freshwater green algae (*C. glomerata*) were collected week by week, starting from the first week of May 2015 to the middle of June 2015, when dense mats of *Cladophora* tightly covered the water column of the shallow parts of Lake Oporzynskie. Samples of green algae were collected manually from the middle of the mats floating on the surface of the lake water. As the mats were also observed in the pelagic zone, the biomass was harvested using boats applying a strip, a cable, or a special rake. After the collection, fresh algal biomass (FM) was weighed immediately per 1 m<sup>2</sup> of the water surface. Algae material was washed and dried at 40 °C, for 40 min after harvesting. Then, the material was dried in a special drying oven until a dry matter (DM) of water content of <15% was obtained.



Fig. 1. Map showing geographical localities of sampling sites – a star symbol is a point of sample collection.

#### 2.4. Procedure of ulvan isolation

Ulvans were obtained from dry biomass of freshwater green macroalgae *U. flexuosa* and *C. glomerata*. A general procedure to extract ulvan was based on the procedure developed by Alves et al. [4] and Costa et al. [55]. Soxhlet extraction (7 h) of 100 g of dried and homogenized algae with 1 L of dichloromethane and acetone mixture (1:1) was conducted to remove most of the lipids and coloring matter. The residual of algae matter was dried and subjected to hot water extraction with 3 L of distilled water for a total of 7 h at 75–85 °C, on a boiling water bath, under continuous stirring. After filtration through a cotton cloth, the aqueous extracts were centrifuged, and the liquid supernatant was filtered. The water extract was concentrated until 10–20% of its initial value in a rotary evaporator. The next step was enzymatic hydrolysis conducted according to Paradossi et al. [56]. For this purpose the concentrated extract was treated with  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich) in the quantity of 250  $\mu$ L for 10 g of dried algae at 20 °C for 30 min. Then, pH was adjusted to 7.5 using 20 mM sodium phosphate buffer solution pH 7.5 (Fluka) and sodium phosphate tribasic dodecahydrate (Sigma-Aldrich) and the temperature was brought to 37 °C for treatment with protease. Afterwards, the extract was deproteinized by proteinase digestion with 100  $\mu$ L of proteinase K from *Tritirachium album* (Sigma-Aldrich) per 10 g of dried algae at 37 °C for 24 h. The enzymatic digestion was stopped by heating the solution to 80 °C for 10 min.

Afterwards, the solution was centrifuged, filtered, precipitated with 3 vol. of ethanol and left in a fridge for 24 h. Finally, the obtained precipitate was washed consecutively with ethanol, acetone and diethyl ether.

The yield of polysaccharide resulting from this extraction methodology was 2.67–16.14% of the total dry mass.

#### 2.5. FT-IR spectroscopy analysis

The samples of obtained ulvans were subjected to FT-IR measurements in 200 mg KBr pellets. The mass of samples was in all cases 1 mg per pellet. The FT-IR spectra were recorded using an IFS 66/s FT-IR spectrophotometer (Bruker), equipped with a MCT detector (125 scans, resolution 2  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 2.6. Elemental analysis

The elemental analysis was carried out on Vario EL III (Elementar Analysen system GmbH Germany) equipped with a standard CHNS detector. The mass of each sample was 20 mg. Every analysis was repeated three times with differences less than 0.2%.

#### 2.7. $^1\text{H}$ NMR analysis

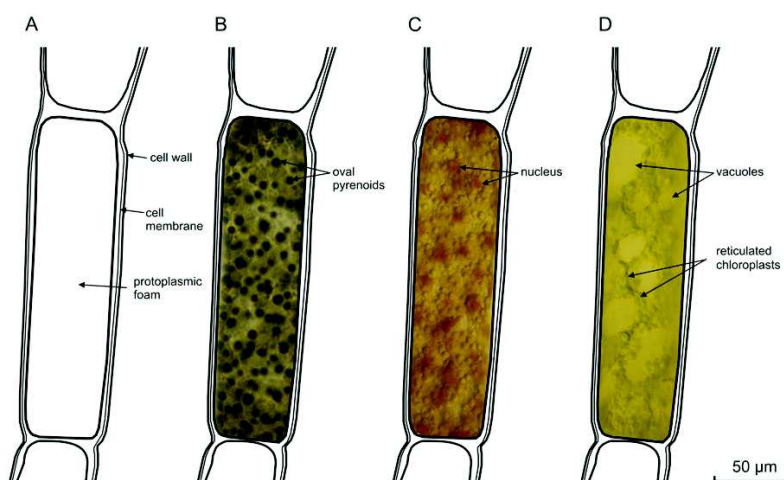
The  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on a DPX-400 spectrometer (Bruker) operating at 400.13 MHz. Typical spectral parameters were used for  $^1\text{H}$  NMR: spectral width 12 kHz, number of data points 65.5 K, 0.488 Hz per point digital resolution, acquisition time 4.09 s, relaxation delay 1 s, pulse width 7.8  $\mu$ s, number of scans 16. The temperature was maintained and measured with Eurotherm BV-T 2000 to an accuracy of 1 K.

Table 1

Characteristic features of freshwater green algae [values: minimum–maximum (standard deviations – SD), n = 100].

Taxon features	<i>Cladophora glomerata</i>	<i>Ulva flexuosa</i> subsp. <i>pilifera</i>
Macroalgae structure	Filamentous green algae	Tubular green algae
Dominant algae forms	Free-floating in lake	Attached to the bottom and free-floating in river
Thalli characteristic	Thallus is a uniseriate (constructed of cells in a single row)	Thallus is a multi-row (cells arrange into longitudinal and crosswise rows)
Thalli branching	Branched, cross-wall	Proliferations
Thalli color	Bright/light green	From yellow to brightly green
Cell shape	Cylindrical, highly elongated	Rectangular
Cell width ( $\mu\text{m}$ )	33–61 (7.8)	20–26 (1.9)
Cell length ( $\mu\text{m}$ )	125–276 (41.5)	24–31 (1.8)
Ratio of length to width	3.5–6.2 (0.7)	1.2–1.6 (0.1)
Cell wall structure	Two-layer	Two-layer
Cell wall thicknesses ( $\mu\text{m}$ )	3.2–4.3 (0.3)	1.1–2.3 (0.4)
Shape of chloroplasts	Reticulate	Parietal
Diameter of pyrenoids	4.8–7.1 (0.7)	7.2–9.9 (0.7)
Diameter of nuclei	6.7–9.7 (0.9)	n.d.

n.d. – no data.



**Fig. 2.** Cell structure of *Cladophora glomerata*: A – cell shape, B – many pyrenoids in a cell stained by Lugol's solution, C – multi-nuclei in a cell stained by the acetocarmine, D – reticulated chloroplasts and vacuoles.

### 2.8. Statistical analysis

Morphological data of *C. glomerata* and *U. flexuosa* cells were subjected to basic statistical analyses (minimum, maximum, standard deviations – SD). Measurements for each variable were taken on 100 cells of each algal species. The extraction procedure of ulvans was performed five times for each harvest. Kruskal–Wallis One-way ANOVA was performed to test if thickness of cell wall differed significantly between months and was performed using the STATISTICA ver. 10 for Windows (StatSoft, Inc. 2010). The Kruskal–Wallis Test (KW-T) was also used for statistical analysis in order to evaluate the differences in the values for the ratio of saccharide rings to sulfate group in molecules between particular species ( $n = 21$ ) and harvesting months ( $n = 18$ ).

## 3. Results and discussion

The aim of this study was to check for the presence of polysaccharides (ulvans) in cells of the green algae forming mats in freshwater lakes. Until now plenty of studies on ulvans have been conducted including only marine species of the genus *Ulva*. There have been no studies of this type using thalli of green macroalgae freshwater species, rapidly proliferating, from the genus *Cladophora*, or *Ulva* and belonging to the same class *Ulvophyceae*. The chemical analyses performed in this study for the presence of ulvans in the macroscopic filamentous green algae, synthesized in the cell wall as a result of biotic stress and in a period with few macroalgal thalli (a community in the early stages of development), have been the first ever of this type. *Cladophora*'s filaments, *Ulva*'s thalli and its cells were subjected to morphological analysis (Table 1). Filaments of examined filamentous green algae from Lake Oporzynskie have only a few short branches and were brightly green.

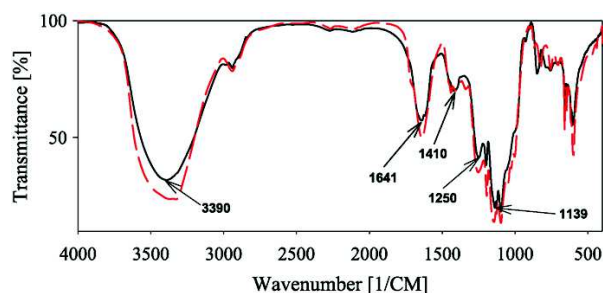
**Table 2**  
The extraction yield [%, (standard deviations – SD),  $n = 5$ ] ulvans depending on the time of harvest.

Algae	Harvest time	Yield [%]
<i>Ulva flexuosa</i>	05.03.2014	2.67 (0.20)
<i>Cladophora glomerata</i>	05.09.2015	4.79 (0.40)
<i>Cladophora glomerata</i>	05.16.2015	8.09 (0.60)
<i>Cladophora glomerata</i>	05.22.2015	12.91 (1.0)
<i>Cladophora glomerata</i>	05.31.2015	14.76 (0.90)
<i>Cladophora glomerata</i>	06.09.2015	16.23 (1.2)
<i>Cladophora glomerata</i>	06.13.2015	16.14 (0.88)

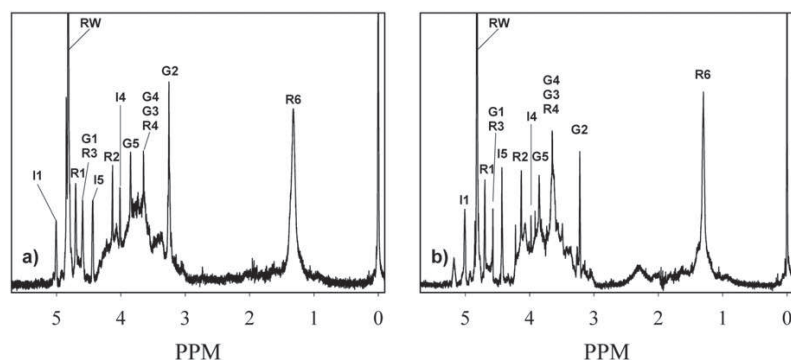
The vegetative cells of *C. glomerata* (Fig. 2) had a cylindrical shape and were densely filled with a reticulated chloroplast. The chloroplasts contained numerous oval pyrenoids, of around 50 pieces densely arranged in a cell. Characteristic of *Cladophora* species is the presence of many nuclei in a cell. The cells could be short or long, their size varied in a wide range, so the measurements were also performed over a wide range. Dimensions of the cell size varied from 125 to 276  $\mu\text{m}$  in length and from 33 to 61  $\mu\text{m}$  in width (values of SD was indicated a low measurements dispersion around the mean). The cell lengths were almost 3–6 times greater than widths. The mean thickness of the cell wall varied from 3.2 to 4.3  $\mu\text{m}$ . A slight increase in the thickness of the cell wall was observed between the samples from May to June 2015, but it was not a statistically significant change (KW-T (1; 100) = 0.0179;  $p = 0.8936$ ).

*U. flexuosa* subsp. *pilifera* from the lowland Nielba river represents tubular type of thalli structure with cells arranged into longitudinal and crosswise rows. A cell contained parietal chloroplast with 2 or 3 pyrenoids. The thickness of cell wall in *C. glomerata* was significantly greater than in *U. flexuosa* subsp. *pilifera*.

Many authors studying sulfated polysaccharides from *Ulva* have focused on the extraction of these compounds. It is well known that ulvans are soluble in water and in alkali solutions [3]. This fact was used in the proposed procedure of ulvan extraction. Ulvans can be effectively extracted using water [3,4,56] and hot water extraction at temperatures in the range of 80–90 °C gave higher extraction yields [57–59]. Other methods to isolate ulvans are based on the use of alkali solutions, such as sodium carbonate solution [5], as well as acidic solutions



**Fig. 3.** The FT-IR spectra of ulvans isolated from *Ulva flexuosa* (—) and *Cladophora glomerata* (---).



**Fig. 4.**  $^1\text{H}$  NMR spectra recorded at 20 °C of ulvan from freshwater algae *Ulva flexuosa* (4a) and *Cladophora glomerata* (4b). Letters I, R, and G and numbers correspond to protons in iduronic acid, rhamnose 3-sulfate, and glucuronic acid, respectively. RW means a signal from residual water.

[6,60]. The addition of calcium chelating agents, such as ammonium oxalate or ethylenediaminetetraacetic acid results in sequestering calcium ions and disrupting chemical bonds formed by ulvan in the presence of calcium ions within the cell wall of algae [6,57], which facilitates ulvan extraction. In fact, the extract obtained from *Ulva* species using polar solvents is contaminated by amino acids and peptides [5,9]. In this case, traditional extraction combined with enzymatic extraction is used to isolate ulvans [4,9]. Hence, enzymatic treatment with proteinase K [4,9, 56] or precipitation with trichloroacetic acid [58] can be applied to remove amino acids. Afterwards, starch-like materials can be removed from the extract using  $\alpha$ -amylase [4,9,55,56,58]. To eliminate other contaminants, such as polyphenols, chlorophylls and volatile compounds responsible for the odor, activated charcoal is usually used [4,60]. In our studies we used hot water extraction combined with enzymatic hydrolysis to obtain ulvans from investigated freshwater green macroalgae species. The yield of ulvans resulting from this extraction methodology was 2.67–16.14% of total dry mass.

Table 2 shows the contents of ulvans in *U. flexuosa* and *C. glomerata* depending on the date of sampling. The samples were collected during the main growing season of freshwater algae, which in Poland lasts from May to July. In *C. glomerata* an increase in the content of ulvans in dry algal matter with time was clearly observed. In early May the ulvan content in the dry matter of *C. glomerata* was 4.79%, and it increased to more than 16% in June (with low values of SD). This increase in the content of ulvans is associated with the thickening and strengthening of the cell walls of algae, which is necessary to maintain the consistency of large mats.

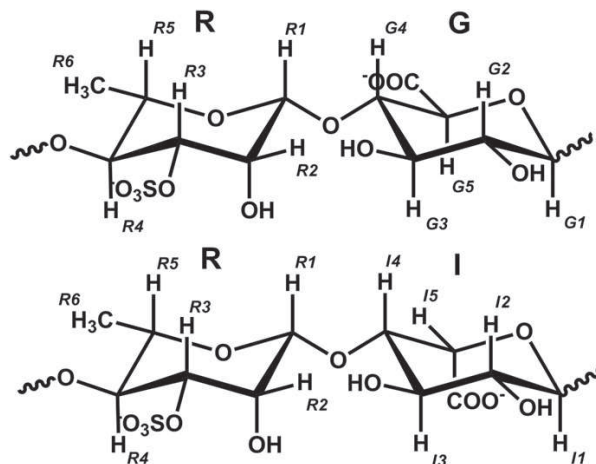
Analysis of ulvans obtained by the detailed extraction methods is the principal step in the analytical process. However, the exact chemical structure and composition, as well as the molecular weight of ulvan is not well-known and they can vary depending on the algae species [9], seasonality [61], methods of algae stabilization treatments (drying) before extraction [62] and extraction methodologies [63,64]. FT-IR spectroscopy is highly suitable for characterization of ulvans, because it permits the identification of functional groups, such as: ether sulfate, hydroxyl and carboxyl group, as well as ether glycosidic bridges [4,65], characteristic of these compounds.

All the samples were studied by FT-IR in the mid-infrared region. The FT-IR spectra of ulvans from *U. flexuosa* and *C. glomerata* are given in Fig. 3. Both spectra are very similar showing signal characteristic of both saccharide and sulfate groups. The most characteristic are the bands assigned to the  $\nu(\text{OH})$  stretching vibrations of OH groups at  $3390\text{ cm}^{-1}$  as well as the band assigned to the  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$  stretching vibrations, from ether groups, at about  $1140\text{ cm}^{-1}$ . The presence of two bands with maxima at  $1410$  and  $1641\text{ cm}^{-1}$  assigned to the  $\nu(\text{C}=\text{O})$  stretching symmetric and asymmetric (respectively) vibrations of  $\text{COO}^-$  groups, strongly suggests the existence of ulvans in anionic form. In these spectra we can also distinguish a signal with a maximum at  $1250\text{ cm}^{-1}$  assigned

to the  $\nu(\text{S}=\text{O})$  asymmetric stretching vibrations from  $\text{RO}-\text{SO}_3^-$  group, whose presence distinguishes ulvans from other saccharides [3].

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of ulvans isolated from *C. glomerata* is similar to that of ulvans isolated from *U. flexuosa* (Fig. 4) and is in good agreement with the literature [1]. The high number of possible disaccharide sequences and distributions in addition to other structural irregularities complicates the analysis of the signals that distribute within a narrow chemical shift range in the spectra. Fig. 4 shows the  $^1\text{H}$  NMR spectrum recorded at 20 °C of ulvan from freshwater algae *U. flexuosa* (4a) and *C. glomerata* (4b) samples. Letters I, R, and G and numbers correspond to protons in iduronic acid, rhamnose 3-sulfate, and glucuronic acid, respectively (Fig. 5). RW refers to the signal of the residual water in the samples.

Table 3 shows the percentage of elements in the obtained ulvans determined by elemental analysis. Knowing the percentage of sulfur and carbon atoms in the molecules, we can calculate the ratio of the saccharide rings to sulfate groups. This ratio varies from 1.54 to 0.91 (with low values of S), which is in good agreement with the results obtained for algae from saline waters [55]. Within the vegetation time, the number of sulfate groups is observed to increase with respect to the amount of saccharide rings in the molecules, which can be related to the need for formation of more resistant cell walls. Significant statistical differences ( $p > 0.05$ ) were found considering the specific green algae species (KW-T (1;21) = 6.0908;  $p = 0.0136$ ; Fig. 6) and the time of sampling (KW-T (1;18) = 12.8692;  $p = 0.0003$ ; Fig. 7).



**Fig. 5.** Fragment of ulvans structure with proton numbering. Letters I, R, and G represent iduronic acid, rhamnose 3-sulfate, and glucuronic acid rings. The numbers correspond to the numbering order of protons in the individual rings.

**Table 3**

The elemental content (C, H, S) [% (standard deviations – SD), n = 3] in ulvans and the ratio of saccharide rings to sulfate group (calculation based on percent carbon).

Algae	Harvest time	%C	%H	%S	Saccharide rings/sulfate group ratio
<i>Ulva flexuosa</i>	07.03.2014	22.94 (0.20)	4.01 (0.05)	7.05 (0.070)	1.45
<i>Cladophora glomerata</i>	05.09.2015	23.42 (0.18)	4.12 (0.045)	6.87 (0.060)	1.52
<i>Cladophora glomerata</i>	05.16.2015	22.86 (0.18)	4.25 (0.045)	7.02 (0.032)	1.45
<i>Cladophora glomerata</i>	05.22.2015	23.88 (0.18)	4.61 (0.040)	6.91 (0.060)	1.54
<i>Cladophora glomerata</i>	05.31.2015	18.99 (0.10)	3.66 (0.025)	8.99 (0.030)	0.94
<i>Cladophora glomerata</i>	06.09.2015	19.11 (0.20)	3.81 (0.050)	8.87 (0.069)	0.96
<i>Cladophora glomerata</i>	06.13.2015	18.64 (0.05)	3.71 (0.010)	9.13 (0.020)	0.91

#### 4. Conclusions

The first isolation of ulvans from freshwater macroscopic algae *U. flexuosa* and *C. glomerata* has been successfully carried out in this study. The resulting amounts of ulvans depend on the thickness of the cell wall and increase with increasing amounts of thallus on the lake. In particular, this phenomenon has been observed for *C. glomerata* in late May and early June 2015, when the length to width ratio increased from 3.50 to 6.12. This observation was also confirmed by the increasing amount of ulvans.

During the vegetation period, algal mats, composed mainly of *C. glomerata*, cover approx. 0.1 km<sup>2</sup> of the 0.12 km<sup>2</sup> surface of Lake

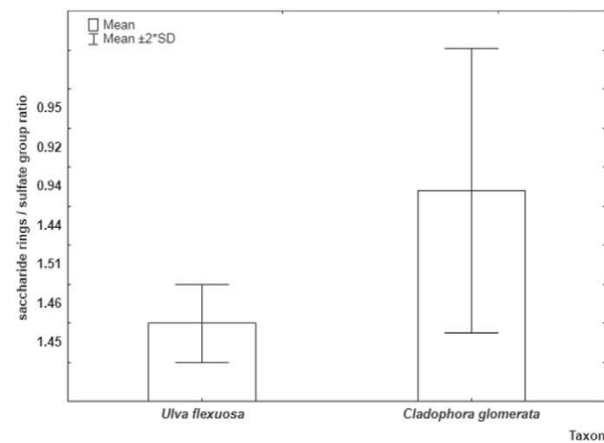
Oporzynskie. From this surface area approx. 3.5 tons of dry weight of algae can be collected. From this biomass it is possible to extract approx. 560 kg of pure ulvans. Lake Oporzynskie is a natural reservoir and does not require fertilization or any other measures for the maintenance of crops except for harvest and subsequent processing of biomass. Taking into regard a wide range of biological activities and possibilities of application of ulvans in medicine, pharmacy, food and cosmetic industry, the isolation of ulvans from investigated freshwater green macroalgae seems to be potentially interesting and economically advantageous.

#### Acknowledgments

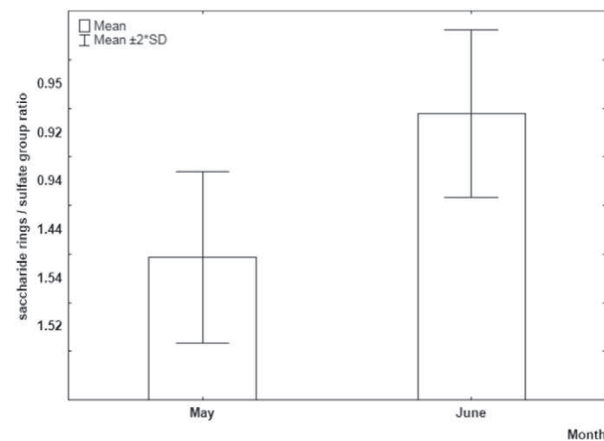
This project is financed in the framework of grant 2014/13/B/NZ8/04690 entitled: “Physicochemical and biological causes of ecological dominance of filamentous green algae in freshwater ecosystems” from the Polish National Science Centre in years 2015–2018.

#### References

- [1] A. Robic, M. Lahaye, Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds, *Biomacromolecules* 6 (2007) 1765–1774.
- [2] G. Jiao, G. Yu, J. Zhang, H.S. Ewart, Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae, *Mar. Drugs* 9 (2011) 196–223.
- [3] B. Ray, M. Lahaye, Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (*Ulvales*, *Chlorophyta*). Extraction and chemical composition, *Carbohydr. Res.* 274 (1995) 251–261.
- [4] A. Alves, S.G. Caridade, J.F. Mano, R.A. Sousa, R.L. Reis, Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 2194–2200.
- [5] J.W.E. Brading, M.M.T. Georg-Plant, D.M. Hardy, The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca* – purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide, *J. Chem. Soc.* 319–324 (1954).
- [6] A.F. Abdel-Fattah, M. Edrees, A study on the polysaccharide content of *Ulva lactuca* L. *Qual. Plant. Mater. Veg.* 22 (1972) 15–22.
- [7] M. Lahaye, B. Ray, Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva “rigida”* (*Ulvales*, *Chlorophyta*) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides, *Carbohydr. Res.* 283 (1996) 161–173.
- [8] B. Quemener, M. Lahaye, C. Bobin-Dubigeon, Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography, *J. Appl. Phycol.* 9 (1997) 179–188.
- [9] M. Lahaye, E. Alvarez-Cabal Cimadevilla, R. Kuhlenkamp, B. Quemener, V. Lognonne, P. Dion, Chemical composition and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (*Ulvales*, *Chlorophyta*), *J. Appl. Phycol.* 11 (1999) 1–7.
- [10] E. Hernández-Garibay, J. Zertuche-González, I. Pacheco-Ruiz, Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides, from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh, *J. Appl. Phycol.* 23 (2010) 537–542.
- [11] W. Mao, X. Zang, Y. Li, H. Zhang, Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity, *J. Appl. Phycol.* 18 (2006) 9–14.
- [12] R. Paulert, V. Talamini, J.E.F. Cassolato, M.E.R. Duarte, M.D. Nosedá, A. Smania, M.J. Stadnik, Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Plant Dis. Protect.* 116 (2009) 263–270.
- [13] Y. Pengzhan, L. Ning, L. Xiguang, Z. Gefei, Z. Quanbin, L. Pengcheng, Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*), *Pharmacol. Res.* 48 (2003) 543–549.
- [14] B. Castelar, R.P. Reis, A. Carolina dos Santos Calheiros, *Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (*Chlorophyta*, *Ulvophyceae*) cultivation in Brazilian tropical waters: recruitment, growth, and ulvan yield, *J. Appl. Phycol.* 26 (2014) 1989–1999.
- [15] A. Synytsya, J. Čopíková, W.J. Kim, Y.I. Park, Cell Wall Polysaccharides of Marine Algae, in: S.-K. Kim (Ed.), Springer Handbook of Marine Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2015, pp. 543–590.
- [16] C. Bobin-Dubigeon, M. Lahaye, F. Guillon, J.L. Barry, D.J.J. Gallant, Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp. cell-wall polysaccharides, *J. Sci. Food Agric.* 75 (1997) 341–351.
- [17] H. Kylin, Biochemistry of sea algae, *Phys. Chem.* 83 (1913) 171–197.



**Fig. 6.** Box-plot of saccharide rings/sulfate group ratio for *Cladophora glomerata* and *Ulva flexuosa* (Kruskal–Wallis Test,  $p > 0.05$ ).



**Fig. 7.** Box-plot of saccharide rings/sulfate group ratio in *Cladophora glomerata* for May and June (Kruskal–Wallis Test,  $p > 0.05$ ).

- [18] L. Wang, X. Wang, X. Wu, R. Liu, Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years, *Mar. Drugs* 12 (2014) 4984–5020.
- [19] M. Lahaye, M.A.V. Axelos, Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.), *Carbohydr. Polym.* 22 (1993) 261–265.
- [20] A. Haug, The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulphated polysaccharide from *Ulva lactuca*, *Acta Chem. Scand. B* 30 (1976) 562–566.
- [21] M. Lahaye, F. Inizan, J. Vigouroux, NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation, *Carbohydr. Polym.* 36 (1998) 239–249.
- [22] A. Robic, C. Gaillard, J.F. Sassi, Y. Lerat, M. Lahaye, Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds, *Biopolymers* 8 (2009) 654–664.
- [23] W.K. Dodds, D.A. Gudder, The ecology of *Cladophora*, *J. Phycol.* 28 (1992) 415–427.
- [24] C. Van Den Hoek, Revision of the European Species of *Cladophora*, E.J. Brill, Leiden, 1963.
- [25] B. Messyasz, B. Łęska, J. Fabrowska, M. Pikoż, E. Rój, A. Cieślak, G. Schroeder, Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the cosmetic industry, *Open Chem.* 13 (2015) 1108–1118.
- [26] A. Alves, R.A. Sousa, R.L. Reis, In vitro cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharides extracted from green algae, *Phytother. Res.* 27 (2013) 1143–1148.
- [27] H. Qi, Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang, X. Niu, Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*) in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.* 37 (2005) 195–199.
- [28] H. Qi, T. Zhao, Q. Zhang, Z. Li, Z. Zhao, R. Xing, Antioxidant activity of different molecular weight sulphated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (*Chlorophyta*), *J. Appl. Phycol.* 17 (2005) 527–534.
- [29] H. Qi, Q. Zhang, T. Zhao, R. Hu, K. Zhang, Z. Li, In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2441–2445.
- [30] H. Qi, X. Liu, J. Ma, Q. Zhang, Z. Li, In vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*), *J. Med. Plants Res.* 4 (2010) 2445–2451.
- [31] S. Mezghani, I. Bourguiba, I. Hfaiedh, M. Amri, Antioxidant potential of *Ulva rigida* extracts: protection of hela cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity, *Biol. Bull.* 225 (2013) 1–7.
- [32] H. Qi, Y. Sun, Antioxidant activity of high sulfate content derivative of ulvan in hyperlipidemic rats, *Int. J. Biol. Macromol.* 76 (2015) 326–329.
- [33] L.S. Costa, G.P. Fidelis, S.L. Codeiro, R.M. Oliveira, D.A. Sabry, R.B.G. Câmara, L.T.D.B. Nobre, M.S.S.P. Costa, J. Almeida-Lima, E.H.C. Farias, E.L. Leite, H.A.O. Rocha, Biological activities of sulphated polysaccharides from tropical seaweeds, *Biomed. Pharmacol. J.* 64 (2010) 21–28.
- [34] I. Wijesekara, R. Pangestutia, S.-K. Kim, Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 14–21.
- [35] O.M. Ahmed, R.R. Ahmed, Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells in vitro and in vivo, *J. Cancer Sci. Ther.* 6 (2014) 2002–2008.
- [36] H.H.A. El-Baky, F.K.E. Baz, G.S.E. Baroty, Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L., *Acad. J. Cancer Res.* 2 (2009) 1–11.
- [37] R. Castro, I. Zarra, J. Lamas, Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes, *Aquaculture* 229 (2004) 67–78.
- [38] R. Castro, M.C. Piazzon, I. Zarra, J. Leiro, M. Noya, J. Lamas, Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides, *Aquaculture* 254 (2006) 9–20.
- [39] J.M. Leiro, R. Castro, J.A. Arranz, J. Lamas, Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh, *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 879–888.
- [40] M. Maeda, T. Uehara, M. Takeshita, Polysaccharide composition or polysaccharide having heparinoid activity, process for producing the same, and anticoagulant containing the same as active agent Patent EP 0475383 18 March 1992.
- [41] B.A. Daniels, Seaweed extract composition for retardation of cardiovascular disorders and preservation of healthy cardiovascular function US Patent US 2004/0170645 2 September 2004.
- [42] H. Jiao, X. Shang, Q. Dong, S. Wang, X. Liu, H. Zheng, X. Lu, Polysaccharide Constituents of Three Types of Sea Urchin Shells and Their Anti-Inflammatory Activities, *Mar. Drugs* 13 (2015) 5882–5900.
- [43] P.Z. Yu, Q.B. Zhang, N. Li, Z.H. Xu, Y.M. Wang, Z.E. Li, Polysaccharides from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity, *J. Appl. Phycol.* 15 (2003) 21–27.
- [44] H. Qi, L. Huang, X. Liu, D. Liu, Q. Zhang, S. Liu, Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*), *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1637–1640.
- [45] H. Qi, X. Liu, J. Zhang, Y. Duan, X. Wang, Q. Zhang, Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 270–272.
- [46] B. Kaefler, C. Benard, M. Lahaye, H.M. Blottiere, C. Cherbut, Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells, *Planta Med.* 65 (1999) 527–531.
- [47] J.B. Lee, K. Hayashi, M. Maeda, T. Hayashi, Antihyperlipidemic activities of sulphated polysaccharides from green algae, *Planta Med.* 70 (2004) 813–817.
- [48] V. Gadenne, L. Lebrun, T. Jouenne, P. Thebault, Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 112 (2013) 229–236.
- [49] A. Alves, R.A. Sousa, R.L. Reis, Processing of degradable ulvan 3D porous structures for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101A (2013) 998–1006.
- [50] A. Alves, E.D. Pinho, N.M. Neves, R.A. Sousa, R.L. Reis, Processing ulvan into 2D structures: cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications, *Int. J. Pharm.* 426 (2012) 76–81.
- [51] A. Morelli, F. Chiellini, Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: functionalization and hydrogel preparation, *Macromol. Chem. Phys.* 211 (2010) 821–832.
- [52] G. Toskas, R.-D. Hund, E. Laourine, C. Cherif, V. Smyrniotopoulos, V. Roussis, Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva rigida*, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 1093–1102.
- [53] P. Chandika, S.-C. Ko, W.-K. Jung, Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 24–35.
- [54] R. Covis, T. Vives, C. Gaillard, M. Benoit, T. Benvegno, Interactions and hybrid complex formation of anionic algal polysaccharides with a cationic glycine betaine-derived surfactant, *Carbohydr. Polym.* 121 (2015) 436–448.
- [55] C. Costa, A. Alves, P. Pinto, R.A. Sousa, E. Silva, R.L. Reis, A. Rodrigues, Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 537–546.
- [56] G. Paradossi, F. Cavalieri, L. Pizzoferrato, A.M. Liquori, A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*, *Int. J. Biol. Macromol.* 25 (1999) 309–315.
- [57] A. Robic, C. Rondeau-Mouro, J.F. Sassi, Y. Lerat, M. Lahaye, Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (*Ulvales*, *Chlorophyceae*), *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 206–216.
- [58] J.P. McKinnell, E. Percival, Structural investigations on watersoluble polysaccharide of green seaweed *Enteromorpha compressa*, *J. Chem. Soc.* (1962) 3141–3148.
- [59] M. Yamamoto, Physicochemical studies on sulfated polysaccharides extracted from seaweeds at various temperatures, *Agric. Biol. Chem. Tokyo* 44 (1980) 589–593.
- [60] C.C. Gosselin, A. Holt, P.A. Lowe, Polysaccharides of *Enteromorpha* species, *J. Chem. Soc.* (1964) 5877–5880.
- [61] A. Robic, J.-F. Sassi, P. Dion, Y. Lerat, M. Lahaye, Seasonal variability of physico-chemical and rheological properties of ulvan from two *Ulva* species (*Chlorophyta*) of Brittany coast, *J. Phycol.* 45 (2009) 962–973.
- [62] A. Robic, J.-F. Sassi, M. Lahaye, Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (*Chlorophyta*) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 344–352.
- [63] H. Yaich, H. Garna, S. Besbes, J.-P. Barthélemy, M. Paquot, C. Blecker, H. Attia, Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast, *Food Hydrocoll.* 40 (2014) 53–63.
- [64] H. Yaich, H. Garna, S. Besbes, M. Paquot, C. Blecker, H. Attia, Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*, *Food Hydrocoll.* 31 (2013) 375–382.
- [65] A. Robic, D. Bertrand, J.-F. Sassi, Y. Lerat, M. Lahaye, Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (*Ulvales*, *Chlorophyta*) by FT-IR and chemometrics, *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 451–456.

## **Załącznik IV**

*In vivo* studies and stability study of *Cladophora glomerata*  
extract as a cosmetic active ingredient

## IN VIVO STUDIES AND STABILITY STUDY OF *CLADOPHORA GLOMERATA* EXTRACT AS A COSMETIC ACTIVE INGREDIENT

JOANNA FABROWSKA<sup>1\*</sup>, ALICJA KAPUŚCIŃSKA<sup>1</sup>, BOGUSŁAWA ŁĘSKA<sup>1</sup>,  
KATARZYNA FELIKSIK-SKROBICH<sup>2</sup> and IZABELA NOWAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Adam Mickiewicz University in Poznan, Faculty of Chemistry, Umultowska 89 b, 61-614 Poznań, Poland

<sup>2</sup>Regional Hospital in Poznań, Skin Diseases Department, Juraszów 7/19, 60-479 Poznań, Poland

**Abstract:** Marine algae are widely used as cosmetics raw materials. Likewise, freshwater alga *Cladophora glomerata* may be a good source of fatty acids and others bioactive agents. The aims of this study was to find out if the addition of the extract from the freshwater *C. glomerata* affects the stability of prepared cosmetic emulsions and to investigate *in vivo* effects of the extract in cosmetic formulations on hydration and elasticity of human skin. Extract from the freshwater *C. glomerata* was obtained using supercritical fluid extraction (SFE). Two forms of O/W emulsions were prepared: placebo and emulsion containing 0.5% of *Cladophora* SFE extract. The stability of obtained emulsions was investigated by using Turbiscan Lab Expert. Emulsions were applied by volunteers daily. Corneometer was used to evaluate skin hydration and cutometer to examine skin elasticity. Measurements were conducted at reference point (week 0) and after 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> week of application. The addition of *Cladophora* extract insignificantly affected stability of the emulsion. The extract from *C. glomerata* in the emulsion influenced the improvement of both skin hydration and its elasticity. Thus, freshwater *C. glomerata* extract prepared *via* SFE method may be considered as an effective cosmetic raw material used as a moisturizing and firming agent.

**Keywords:** freshwater green macroalgae, supercritical fluid extraction, corneometer, cutometer

Algae are well known and commonly used cosmetics raw materials containing a wide range of biologically active compounds. *Cladophora glomerata* is a filamentous green macroalga occurring both in marine and in freshwater habitat. Most of research concern marine species of the genus *Cladophora* and indicate the occurrence of such bioactive phytochemicals as: unsaturated and saturated fatty acids (1, 2), sterols, terpenoids (3), amino acids, proteins (4), phenolic compounds (5) and others. However, also a few studies have been reported concerning the content of bioactive substances in freshwater *C. glomerata* (L.) (Kütz), e.g.: fatty acids (FAs) (6), sterols, terpenes, carbohydrates, glycosides (7), sulfated polysaccharides (8), amino acids (6), phenolic compounds, carotenoids (9) and volatiles (10). Hence, different biological activities, such as: antioxidant (9), antibacterial, antifungal (7) and antiprotozoal (10), have been described for the freshwater genus.

Due to the occurrence of various bioactive agents and their beneficial effects, algae extracts are

one of the most popular natural cosmetic ingredients on the market (11). The extraction process involves the separation of a substance from a matrix based on diffusion using appropriate solvents. Therefore, it allows the isolation of active metabolites from algae. In recent years, supercritical fluid extraction (SFE) with CO<sub>2</sub> as a green solvent has been frequently used for isolation of bioactive compounds from algae (9, 12, 13). SFE allows for the fast extraction rate and high yield of receiving bioactives with a low consumption of organic solvents, as well as it is a suitable method for obtaining thermally labile substances (14). Thanks to SFE, extracts with higher amounts of bioactive agents, and thereby much superior cosmetic activity can be obtained in a shorter time compared to conventional extraction methods.

Because of a relatively high amount of fatty acids in freshwater *C. glomerata* species (6, 7), extracts from this algae could be useful as cosmetics ingredient. Fatty acids contained in the extracts may act as emollients, which protect skin against the loss

\* Corresponding author: e-mail: joanna.fabrowska@amu.edu.pl

of water, as well as function as antiinflammatory, antiallergic and antioxidant agents. Moreover, fatty acids may indirectly affect the stimulation of the skin hydration and elasticity (15, 16). In our previous studies, we isolated sulfated polysaccharides from freshwater *C. glomerata* (8). Polysaccharides are able to uptake water in skin, hence, they are used as moisturizing agents in cosmetology (15, 17). We also found that *C. glomerata* extract obtained by SFE method is a rich source of carotenoids and phenolic compounds (9). These bioactive metabolites possess antioxidant properties (9, 15). To sum up, the use of SFE may allow to obtain algae extracts rich in different bioactive agents utilized as valuable cosmetics ingredients with beneficial effects on skin: moisturizing and anti-aging.

The goal of this work was the preparation of oil-in-water (O/W) emulsion with freshwater *C. glomerata* extract made *via* supercritical fluid extraction (SFE) as a novel cosmetic active ingredient. First of all, the stability study was carried out to find out if the addition of the SFE extract from the freshwater *C. glomerata* affected the stability of the emulsion. The main aim of this study was to investigate *in vivo* effects of the extract in cosmetic emulsion formulations on hydration and elasticity of the skin.

## EXPERIMENTAL

### Algae material and preparation of SFE extract

Freshwater *C. glomerata* was collected in the first week of July 2013 from Oporzyn Lake (N52°55', E17°9') located in the north part of the Greater Poland Voivodeship, (Wielkopolska region, Poland). Algae were collected manually from the middle of their mats, from the surface of the lake water. The biomass was harvested using boats applying strip, a cable or a special rake. After the

collection, fresh algal biomass was immediately weighed, washed and purified. Afterwards, the material was dried in a drying chamber with forced air circulation (FD by Binder) at 35°C until a water content in dry matter reached level of less than 15%, and then, the dry biomass was powdered using a laboratory mill with grinding tank.

The extractions of powdered algal material was processed in the Fertilizer Research Institute in Puławy (Poland), as already described by Messyasz et al. (6). SFE was carried out using pure CO<sub>2</sub> as a solvent and the multi-purpose pilot unit was used at three different pressures: 300, 500 and 700 bar, at the temperature of 45°C. The second extraction was performed at 700 bar and 45°C. The samples were taken every 30 min. The obtained extract was used for emulsion preparation and the application test for the skin hydration and elasticity.

### Preparation of emulsion formulations

Oil-in-water (O/W) type emulsions: placebo (Emulsion 1) without the extract and emulsion containing 0.5% of *Cladophora* SFE extract (Emulsion 2) were prepared. The composition of the formulations is given in Table 1. The O/W emulsions were prepared by separately heating and stirring the water and oily phases to the same temperature of 60°C, followed by homogenization for 4 min at 1500 rpm (IKA Ultra-Turrax T 18 digital). After achieving temperature of 30°C the preservative (benzyl alcohol), lemongrass oil and the extract were added to the emulsions and mixed.

### Stability study

The stability of prepared cosmetic emulsions (Emulsion 1 and Emulsion 2) was investigated using Turbiscan Lab Expert (FORMULACTION). This device can operate in either scanning or single position mode. In scanning mode, the optical head cam-

Table 1. Composition of emulsion formulations (% w/w).

Ingredient (INCI name)	Emulsion 1	Emulsion 2
Aqua (Water)	59.4	58.9
<i>Helianthus annuus</i> (sunflower) seed oil	23	23
Glycerine	10	10
Methyl glucose sesquistearate	4	4
Cetyl alcohol	3	3
<i>Cladophora glomerata</i> extract	-	0.5
Benzyl alcohol	0.2	0.2
<i>Cymbopogon schoenanthus</i> (lemongrass) oil	0.2	0.2
Xanthan gum	0.2	0.2

era scans the entire height of the sample (55 mm), collecting the transmitted and backscattered light every 40  $\mu\text{m}$ . This is the most universal measurement that enables the detection of the particle migration of tested emulsions. The light source in this device is a light emitting diode that emits near infrared light with a wavelength of 880 nm. Curves obtained from the measurement represent the intensity of the transmission or backscattering reference standard in percent of the amount of measuring cell function (in millimeters). To analyze the stability of a transparent cosmetic formulations, transmittance phenomenon (T) is used, whereas for opaque samples - backscattering phenomenon (BS). The sample was analyzed after placing emulsions in a cylindrical measurement cell. Studies were carried out for a period of 70 days from the date of the formulations preparation. After the analysis, graph presenting the dependence of sample backscattering intensity (BS) from the sample on the height of cell was obtained (no-reference mode). In order to trace the changes occurring in the sample, results are analyzed in reference mode, where the results are compared to the first measurement. The second parameter, that was used to monitor the coalescence kinetics in the samples *versus* aging time, is the Turbiscan Stability Index (TSI). TSI sums all the variations detected in the sample (size and / or concentration).

#### Application test

As many as 20 persons belonging to different age profiles took part in the application tests as volunteers. They were randomized into two groups with 10 persons each. The first group consisted of volunteers at the age of 20-30 (20+), whereas the second group – at the age range of 40-50 (40+). Tests were carried out on the inner side of the left arm. Emulsion 1 and Emulsion 2 were applied in designated areas of the arm next to each other once daily (evenings) for a period of 4 weeks. Measurements were conducted at reference point (week 0, before the application of emulsions) and after 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> week of application. Also the negative control was done, where skin not treated with any emulsion was examined week by week. All measurements were performed in controlled conditions at a temperature of 21–23°C and with an average relative humidity of 35.8%. The application test included corneometer and cutometer analysis, which are described in details below. Measurements were replicated 10 times for corneometer analysis and 4 times for cutometer. The percent of changes in skin hydration and elasticity was calculated for each volunteer individually after every week of the experi-

ment towards the reference point (week 0) as in the equation below. Then, the average value of % change for every group of volunteers was calculated for each parameter weekly.

$$\% \text{ Change} = [(A - B) / B] \times 100$$

where A – individual value of any parameter after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> week of the experiment, B – the value of the parameter at the week 0

#### Corneometer analysis

The level of the hydration of skin SC (*stratum corneum*) can be examined by corneometer, which is a diagnostic device used in laboratory tests prior and in the production of cosmetics. It allows to determine the water content of the SC and the moisturizing cosmetic action. With a help of corneometer the capacitive resistance of the SC is determined, which is a derivative of the degree of hydration. During the test, the skin moisture measurement is performed using the Corneometer CM 825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) connected to the central unit MPA5, coupled with the computer. The capacitive method is used, because depending on the level of hydration of the epidermis, capacitance changes are indicated by a measuring unit. On the surface of the probe head metal tracks are placed. They are separated from the skin by a glass plate in order to prevent from current conduction. Scattered electric field, penetrating the skin during the measurement, determines its insulation. The depth of penetration of the scattered electric field is small enough to measure only moisture of the outer layers of skin. The measurement is made by placing a vertical probe head in the measured area of skin. The probe device starts the measurement when pressed against the head gentle to the skin surface. Several measurements must be performed, each time selecting a slightly different portion of the surface in a certain area of skin. Values obtained by corneometer are presented in conventional units [CU]. If the obtained results are < 30 this means that skin is very dry, if they are between 30-45 units then skin is dry/normal, and if the values are > 45 then skin is well hydrated.

#### Cutometer analysis

Skin elasticity is defined as the biomechanical property involving the inability to reversible deformation, which is significantly associated with the flexibility of suitable skin fibers. For the measurement of skin firmness and elasticity, Cutometer MPA 580 (Courage + Khazaka Electronic GmbH) connected to the central unit MPA5, coupled with the computer, that allows to obtain reproducible meas-

urement results, is used. The measuring principle is to make a small negative pressure and suck a small area of the skin to the interior of the probe, where the measurement of skin elasticity takes place. The measurement is done using an optical system consisting of a transmitter and a light receptor, as well as the two prisms, which by appropriate alignment with each other, send the light beam from the source to the receptor. The intensity of the light beam depends on the depth to which the skin can be sucked into the interior of the probe. To interpret results obtained with cutometer the parameter  $R_2$  have to be taken into account. This parameter defines the deformability of the skin. The more the value is close to 1 (100%) the more flexible the skin is.

## RESULTS

### Stability study

The Turbiscan Lab Expert apparatus can detect different types of emulsion instability, including the phenomenon of flocculation, coalescence, sedimentation and creaming of the emulsion and the observation of their progress in time. In our study, backscattering phenomenon (opaque samples) was used. Results are presented as a graph (Fig. 1) showing the variations of the delta backscattering intensity as a function of time ( $\Delta BS(t)$ ). In order to follow the particle size increase, the variation of the delta backscattering in the middle of the sample is plotted.

Figure 1 shows that the addition of an algae extract (Emulsion no. 2) leads to a decrease of the particle size (increase of the backscattering level). The results suggest that the formulations undergo flocculation which is reversible instability involving the formation of agglomerates in the internal phase droplets without confluence and growth of their surface. The obtained delta BS value ranges from  $\sim 1$  to  $\sim 2$  and it is the highest for Emulsion 2 containing *Cladophora* extract (2.04). This value indicates a lower stability of Emulsion 2 in comparison to Emulsion 1, but it falls within the normal range (up to 10).  $\Delta BS$  parameter for the cosmetic base (Emulsion 1) is 0.92, which proves that it is more stable than Emulsion 2.

Another parameter, that allows to monitor the coalescence kinetics in the samples *versus* ageing time, is the Turbiscan Stability Index (TSI). TSI sums all variations detected in the sample (size and / or concentration). At a given ageing time, the higher is the TSI, the worse is stability of the sample. This parameter for both cosmetic formulations was examined and the results are shown in Figure 2. The value of the TSI for cosmetic base (Emulsion 1) was 0.9, what proves its highest stability. However, the examined parameter values for Emulsion 2 containing *Cladophora* extract are twice higher than the cosmetic base, what corresponds to its slight instability over time and the effect of the addition of algae extract on destabilization of the emulsion.

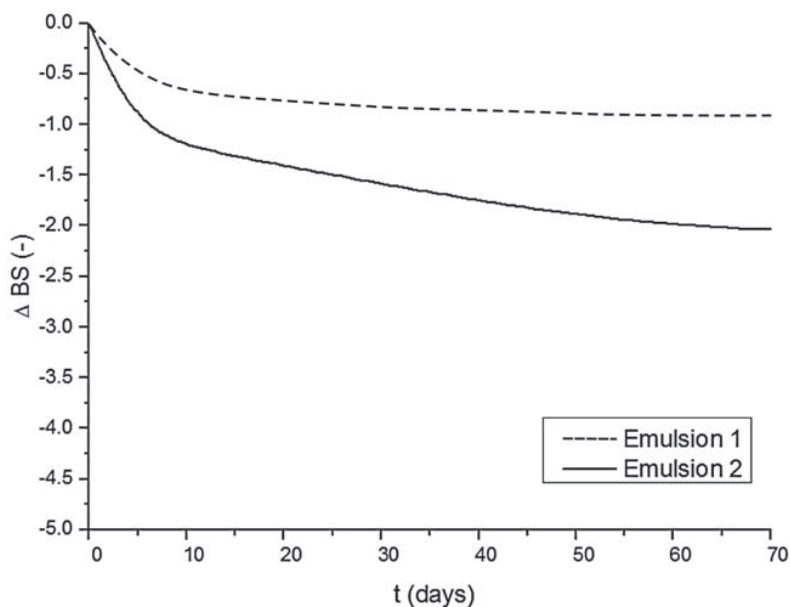


Figure 1. Variation of  $\Delta BS$  parameter as a function of time for Emulsions 1 and 2

Table 2. Results of skin hydration measurements with corneometer CM 825. Values presented are the mean of CU ± SD.

Group	Emulsion	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
20+	Negative control (untreated skin)	33.55 ± 6.31	33.45 ± 4.89	33.42 ± 5.52	33.32 ± 6.70	33.25 ± 5.15
	Emulsion 1	-	39.06 ± 1.91	40.70 ± 2.25	40.30 ± 2.88	40.88 ± 2.11
	Emulsion 2	-	40.61 ± 2.68	43.02 ± 1.48	43.31 ± 1.15	48.66 ± 2.58
40+	Negative control (untreated skin)	28.97 ± 6.57	28.82 ± 5.05	28.68 ± 5.59	28.68 ± 5.70	28.62 ± 6.24
	Emulsion 1	-	35.10 ± 2.13	35.50 ± 2.84	36.66 ± 3.37	36.82 ± 4.69
	Emulsion 2	-	37.51 ± 5.53	38.40 ± 3.66	39.58 ± 4.29	41.22 ± 4.46

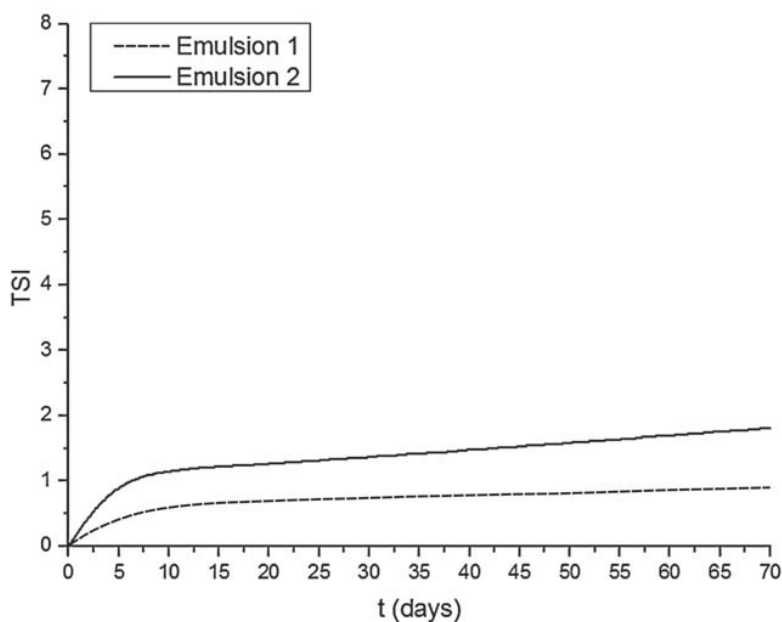


Figure 2. Dependence of TSI parameter on time for Emulsion 1 and 2

**Corneometer analysis**

The results for corneometer analysis are shown in Table 2 as well as in Figures 3 and 4 as a percentage change in the skin hydration after every week of the application of tested emulsions. First of all, it was observed that the addition of *Cladophora* extract to the emulsion affected the increase of skin hydration. In the case of the group of 20+ the increase in skin hydration after the application of Emulsion 2 containing the extract was not significant compared to Emulsion 1 (placebo) after the first three weeks (Table 2, Fig. 3). However, after each next week the difference in the increase between tested creams was much higher, up to the last (the 4<sup>th</sup>) week of the application, where 45% increase in skin hydration for Emulsion 2 and 22%

for Emulsion 1 was noted. The highest value of skin hydration was obtained after the last week after the application of the cream containing the tested extract, which was 48.66 for the group of 20+. Thus, the result indicated that the average skin hydration was improved to the level of well moisturized skin for the emulsion with *Cladophora glomerata* extract.

In the group of 40+ the trend in the percentage increase in skin hydration was similar (Fig. 4) as in the previous group. After the each week of the application test we noticed approximately 10% better increase in skin hydration for the Emulsion 2 than for Emulsion 1 within this group. Similarly to the group 20+ the highest increase for the cream with the extract compared to the placebo was

observed after the 4<sup>th</sup> week – 42% for the Emulsion 2 and 27% for Emulsion 1. The highest skin hydration value observed for this group was 41.22 after 4 weeks of Emulsion 2 application, which refers to dry/normal skin. However, the result is very satisfactory in comparison to the reference point (28.97),

where the average skin condition was weak (dry skin).

#### Cutometer analysis

The second part of the application test was cutometer analysis. The results of  $R_2$  parameter are

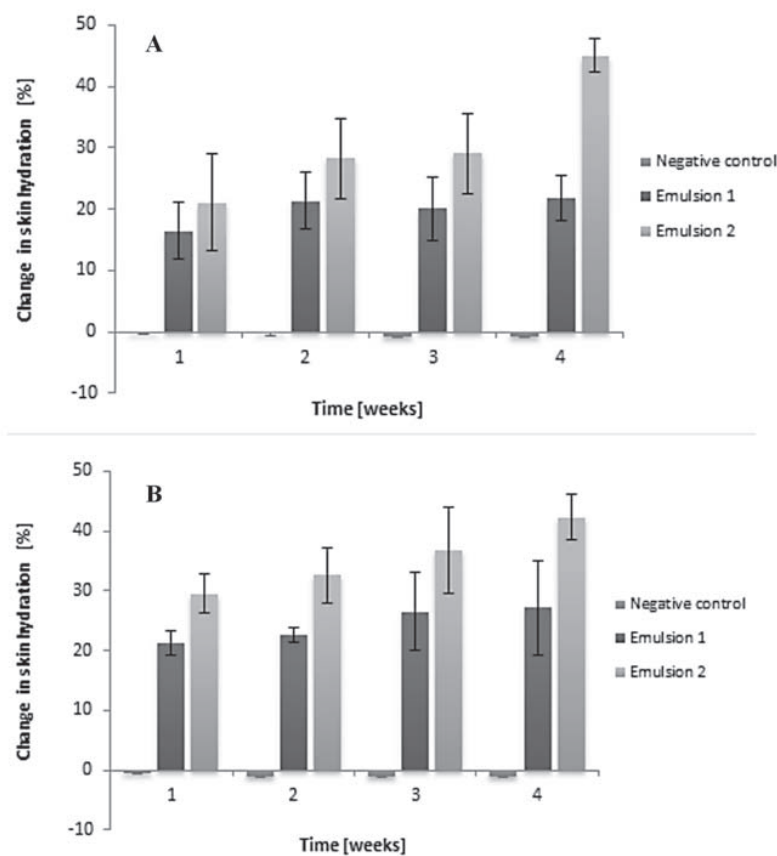


Figure 3. Percentage of changes in skin hydration after the application of Emulsion 1 and Emulsion 2. A - in the group of age of 20+. B - in the group of age of 40+. Percentage is calculated relative to the initial values as in Table 2

Table 3. Results of skin elasticity measurements with cutometer MPA 580. Values presented are the mean of  $R_2$  parameter  $\pm$  SD.

Group	Emulsion	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
20+	Negative control (untreated skin)	0.8552 $\pm$ 0.0622	0.8522 $\pm$ 0.0367	0.8555 $\pm$ 0.0276	0.8542 $\pm$ 0.0329	0.8565 $\pm$ 0.0456
	Emulsion 1	-	0.8760 $\pm$ 0.0240	0.8830 $\pm$ 0.0226	0.8784 $\pm$ 0.0229	0.8973 $\pm$ 0.0336
	Emulsion 2	-	0.9154 $\pm$ 0.0433	0.9412 $\pm$ 0.0198	0.9433 $\pm$ 0.0191	0.9602 $\pm$ 0.0114
40+	Negative control (untreated skin)	0.7576 $\pm$ 0.0573	0.7574 $\pm$ 0.0423	0.7568 $\pm$ 0.0498	0.7569 $\pm$ 0.0507	0.7561 $\pm$ 0.0586
	Emulsion 1	-	0.7698 $\pm$ 0.0414	0.7686 $\pm$ 0.0764	0.7814 $\pm$ 0.0656	0.7870 $\pm$ 0.0524
	Emulsion 2	-	0.7895 $\pm$ 0.0589	0.8032 $\pm$ 0.0693	0.8212 $\pm$ 0.0486	0.8378 $\pm$ 0.0312

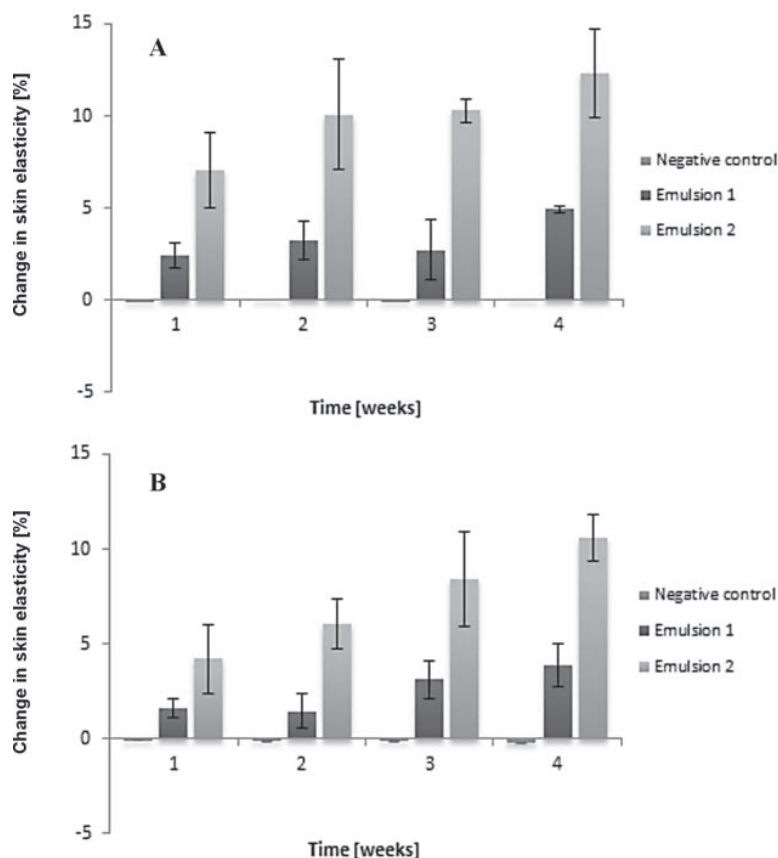


Figure 4. Percentage of changes in skin elasticity after the application of Emulsion 1 and Emulsion 2. **A** - in the group of age of 20+. **B** - in the group of age of 40+. Percentage is calculated relative to the initial values as in Table 3

presented in Table 3. Percentage changes in skin elasticity after the application of tested emulsions are shown in Figures 5 and 6. In both groups of volunteers, an increase in skin elasticity in the case of cosmetic base (Emulsion 1) and cream with *Cladophora* extract (Emulsion 2) was observed. In each case the increase was higher after the application of Emulsion 2 when compared with a base cream. Within the group of 20+ there were obtained better results in the increase of skin elasticity using Emulsion 2 (up to 12.28% after the 4<sup>th</sup> week) (Figure 5) than in the group of 40+ (up to 10.59% after the same week). Also the values of  $R_2$  parameter were higher for this group starting from 0.8556 at the reference point up to 0.9602 after 4 weeks of Emulsion 2 application. The value 0.9602 is very high (close to the highest possible value – 1), which means a considerable improvement of skin elasticity for the group 20+ after a regular application of the cream with *Cladophora* extract.

As far as the group of 40+ is concerned, a much smaller increase in skin elasticity was noticed both after the application of Emulsion 1 and Emulsion 2 compared to the group of 20+. After the 4<sup>th</sup> week of Emulsion 2 application there was observed an increase in skin elasticity up to 0.8378, which refers to 10.59% increase in the parameter, while in the case of Emulsion 1 – up to 0.7870 (3.88%). Obtained values of  $R_2$  were lower for the group 40+ than for the group 20+. The average value at the week 0 for the negative control was 0.7575, whereas for Emulsion 2 after the week 4 – 0.8378. Lower efficiency of applied creams to skin elasticity improvement in the group of 40+ might be due to a weaker abilities of older skin to regeneration.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Freshwater algae are not popular research objects as a cosmetics ingredients. Products contain-

ing marine algae dominate on the cosmetic market (11). On the other hand, freshwater *C. glomerata* emerge as a rich source of such bioactive agents as: fatty acids (6, 7), carotenoids, phenolic compounds (9), sulfated polysaccharides (8), sterols, terpenes, carbohydrates, glycosides (7), resulting in its antioxidant (9), antibacterial and antifungal properties (7). Using CO<sub>2</sub> as a solvent in SFE method it is possible to obtain extract from *Cladophora* with high amounts of non-polar bioactive agents, such as fatty acids (6) and carotenoids (9), which may affect as moisturizing, firming and antioxidant ingredients.

The emulsion containing algal extract was slightly less stable than the base emulsion. In order to increase the stability of Emulsion no. 2, a higher amount of thickening agent, i.e. xanthan gum or emollient (methyl glucose sesquistearate) should be added to this formulation. To sum up, results of stability study show that the addition of *Cladophora* extract to the cosmetic emulsion did not affect significantly the emulsion destabilization.

Results obtained for corneometer analysis show that the addition of SFE extract from *C. glomerata* to the emulsion influenced the improvement of skin hydration. Better results were observed for the group of 20+ where the increase in skin hydration was more significant after use of Emulsion 2 than Emulsion 1 after the last week of the experiment (45% improvement in skin hydration). The differences between skin hydration parameters in the group 20+ and 40+ may result from better ability of young skin to regeneration, keeping the adequate level of skin hydration and its superior absorption of the active ingredients from cosmetics. In comparison to the placebo, the application of the cream with *Cladophora* extract resulted in higher moisturizing effect after each week in both groups of volunteers. On the other hand, high increase in skin hydration was also observed after the use of the placebo. It may result from others moisturizing components of the cream base, such as sunflower seed oil and glycerine.

However, in every case the improvement in skin hydration was higher after the use of the emulsion containing the extract. The SC water retention is a crucial factor in keeping the skin supple and flexible and influences skin permeability to molecules. So far, no original research concerning moisturizing properties of the freshwater *C. glomerata* has been published. However, the presence of carbohydrates, specifically sulfated polysaccharides (8), which are humectants (hygroscopic substances able to bind water), may affect moisturizing properties of the alga. On the other hand, the freshwater *C.*

*glomerata* was found as a good source of both saturated and unsaturated fatty acids (FAs) (6), what indicated its antioxidant, antibacterial and antifungal activities (7). In our studies in the case of SFE of *C. glomerata* supercritical CO<sub>2</sub> as a solvent was used which is non-polar. Due to the usage of this solvent it was possible to obtain the extract from *Cladophora* rich in non-polar substances, such as fatty acids. Because of the hydrophobicity of fatty acids and their important role in creating of hydro lipid layer of the skin they act in cosmetics as emollients. Thus, FAs are able to protect skin against the loss of water and in this way they provide the adequate level of skin hydration and prevent its drying (15, 17). This effect was observed in our results of corneometer analysis – the presence of the SFE extract from *Cladophora* in cosmetic emulsion resulted in an increase in skin hydration. In fact, FAs smooth the skin by filling spaces between skin flakes and adding a complementary occlusive activity, which contributes to SC hydration (18).

In contrast to skin hydration, resulted up to 45% increase in the parameter after using Emulsion 2 in the group of 20+, the improvement of skin elasticity was significantly lower (up to 12.28% increase in the same emulsion and group). However, even the little increase in skin elasticity may improve its appearance and condition. It was also observed that the differences in the increase of skin elasticity were greater than for the skin hydration. Hence, these results clearly indicate the firming properties of *C. glomerata* extract. Skin elasticity decreases with age because of harmful external factors, such as free radicals and UV radiation, which cause skin damage resulting in wrinkles. Carotenoids and phenolic compounds contained in extract from *C. glomerata* might affect as anti-aging compounds due to their antioxidant properties (9). Moreover, the observed improvement in skin elasticity could be the effect of fatty acids action as emollients. If the skin is protected from excessive water loss then it is better moisturized, and consequently – soft and flexible (15, 17).

In freshwater macroalga, which comes from the natural habitat, the issues of purity and safety must be addressed. In our previous work, we proved that the alga did not contain harmful quantities of toxic metals (6). Furthermore, it was demonstrated in toxicological studies that freshwater *C. glomerata* is safe for humans (19).

In summary, the stability study proved that the addition of the extract did not affect significantly the destabilization of the emulsion. Moreover, *in vivo* studies using corneometer and cutometer demon-

strated the influence of freshwater *C. glomerata* extract on skin hydration and elasticity improvement in two age groups of 20+ and 40+. Emulsion 2 containing *Cladophora* extract exhibited higher moisturizing than firming properties. However, skin elasticity improvement was more evident for Emulsion 2 than emulsion without algae addition. Thus, the freshwater alga *C. glomerata* can be an effective cosmetic raw material used in a novel moisturizing and firming formulations.

## REFERENCES

1. Heiba H.I., Al-Easa H.S., Rizk A.F.M.: *Plant. Food Hum. Nutr.* 51, 27 (1997).
2. Horincar V.B., Parfene G., Tyagi A.K., Gottardi D., Dinică R. et al.: *J. Appl. Phycol.* 26, 551 (2014).
3. Elenkov I., Georgieva T., Hadjieva P., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S.: *Phytochemistry* 38, 457 (1995).
4. Rani G.: *J. Appl. Phycol.* 19, 803 (2007).
5. Soltani S., Saadatmand S., Khavarinejad R., Nejadstattari T.: *Afr. J. Biotechnol.* 10, 7684 (2011).
6. Messyasz B., Łęska B., Fabrowska J., Pikoż M., Róǳ E. et al.: *Open Chem.* 13, 1108 (2015).
7. Khalid M.N., Shameel M., Ahmad V.U.: *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* 49, 113 (2012).
8. Pankiewicz R., Łęska B., Messyasz B., Fabrowska J., Sołoducho M., Pikoż M.: *Algal Res.* 19, 348 (2016).
9. Fabrowska J., Ibañez E., Łęska B., Herrero M.: *Algal Res.* 19, 237 (2016).
10. Orhan I., Sener B., Atici T., Brunc R., Perozzod R., Tasdemir D.: *Phytomedicine* 13, 388 (2006).
11. Fabrowska J., Łęska B., Schroeder G., Messyasz B., Pikoż M.: in *Marine Algae Extracts: Processes, Products and Applications*, Kim S.-K., Chojnacka K. Eds., Vol. 2, pp. 681-706, Wiley, Weinheim 2015.
12. El Hattab M., Culioli G., Piovetti L., Chitour S.E., Valls R.: *J. Chromatogr. A* 1143, 1 (2007).
13. Guedes A.C., Giao M.S., Matias A.A., Nunes A.V.M., Pintado M.E. et al.: *J. Food Eng.* 116, 478 (2013).
14. Kadam S.U., Tiwari B.K., O'Donnell C.P.: *J. Agric. Food Chem.* 61, 4667 (2013).
15. Molski M.: *Chemistry of Beauty* (in Polish), pp. 107-110; 121-124; 157-159, PWN, Warszawa 2010.
16. Samarakoon K., Jeon Y.J.: *Food Res. Int.* 48, 948 (2012).
17. Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A.: *Plants in Antiaging Cosmetics and Cosmetology* (in Polish), pp. 107-110; 141-143, PZWL, Warszawa 2012.
18. Kraft N., Lynde C.: *Skin Therapy Lett.* 10(5), 1 (2005).
19. Fahprathanchai P., Saenphet K., Peerapornpisal Y., Aritajat S.: *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 37(3), 206 (2006).

## **Załącznik V**

Słodkowodna *Cladophora glomerata* jako nowy potencjalny  
surowiec kosmetyczny

# Słodkowodna *Cladophora glomerata* jako nowy potencjalny surowiec kosmetyczny

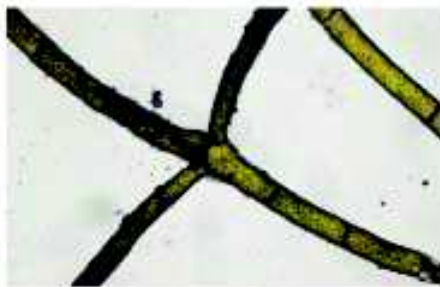
Joanna FABROWSKA\*, Bogusława ŁĘSKA, Grzegorz SCHROEDER – Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2015, 69, 8.

## Wstęp

Głony (algi) i ich ekstrakty stanowią obecnie jeden z najczęściej wykorzystywanych naturalnych surowców kosmetycznych [1]. Jest to spowodowane obecnością związków biologicznie czynnych w ich plechach, takich jak: węglowodany, kwasy tłuszczowe, czy polifenole, co warunkuje wielokierunkowe działanie kosmetyków z algami na skórę. Preparaty kosmetyczne obecne na rynku zawierają głównie algi morskie, takie jak *Laminaria ochroleuca*, *Fucus vesiculosus*, *Ulva lactuca*, *Chondrus crispus*, *Corallina officinalis*. Głony te aplikowane są do prawie wszystkich typów specyfików kosmetycznych: kremów, maseczek, balsamów, szamponów, żeli pod prysznic a także kosmetyków do makijażu i demakijażu [2].

*Cladophora glomerata* (gałęzka kłębiasta) jest makroglonem należącym do gromady zielenic nitkowatych o charakterystycznie rozgałęzionych plechach (Fot. 1) [3]. Głony z rodzaju *Cladophora* występują zarówno w środowiskach morskich, jak i słodkowodnych. *Cladophora glomerata* jest gatunkiem kosmopolitycznym występującym masowo w wodach śródlądowych Polski w postaci mat unoszących się na wodzie [4]. Dotychczas naukowcy koncentrowali się głównie na badaniach nad morskimi gatunkami z rodzaju *Cladophora* w celu oznaczenia w nich substancji biologicznie czynnych [5–7]. Okazało się, że glony te zawierają takie bioaktywne grupy związków, jak: nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe [5], sterole, terpenoidy [6], a także związki fenolowe [7]. Jednak przeprowadzono niewiele badań na temat słodkowodnych glonów *Cladophora* i ich wykorzystania jako naturalnego źródła substancji biologicznie czynnych [8–10]. Dlatego warto kontynuować prace nad nowym kierunkiem badań – słodkowodnymi algami jako potencjalnymi surowcami kosmetycznymi.



Fot. 1. Rozgałęzione plechy *Cladophora glomerata* (zdjęcie z mikroskopu świetlnego Zeiss Axioskop 2 MOT; autor: Marta Pikosz)

## Związki biologicznie czynne w słodkowodnych glonach *Cladophora glomerata*

Okazuje się, że również słodkowodne glony mogą być źródłem związków bioaktywnych, obok powszechnie wykorzystywanych w kosmetyce alg morskich. Słodkowodne glony z rodzaju *Cladophora* cechują się wysoką zawartością makroelementów, takich jak: wapń, potas i fosfor, jak również mikroelementów, jak: magnez, żelazo

i cynk [8]. Każdy z tych pierwiastków pełni w kosmetyce osobne funkcje i odpowiada za prawidłowy przebieg procesów metabolicznych w skórze. Wapń jest pierwiastkiem o działaniu antyalergicznym i przeciwzapalnym. Potas uczestniczy w gospodarce wodnej organizmu, w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia osmotycznego i równowagi kwasowo-zasadowej. Z kolei fosfor jest składnikiem koenzymów, fosfolipidów i kwasów nukleinowych. Spośród wymienionych mikroelementów, w słodkowodnych glonach *Cladophora* dominuje magnez, który wzmacnia ścianki naczyń krwionośnych, aktywuje liczne enzymy i uczestniczy w biosyntezie mocznika. Niedobór magnezu przyspiesza procesy starzenia się skóry. Żelazo stosowane w kosmetykach regeneruje skórę, odtruwa komórki naskórka, wzmacnia włosy i paznokcie. Obecność cynku w algach warunkuje właściwości przeciwzapalne, przeciwłojotokowe i antywirusowe. Cynk znajduje zastosowanie w leczeniu skóry trądzikowej, opryszczki i różnego typu podrażnień skóry [11, 12].

Ważną grupą związków biologicznie czynnych, obecnych w słodkowodnych algach *Cladophora glomerata*, są nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe zaliczane do grupy lipidów, czyli substancji lipofilowych. Są to alifatyczne lipofilowe kwasy monokarboksylowe zawierające odpowiednio wiązania nasycone (kwasy tłuszczowe nasycone), bądź przynajmniej jedno wiązanie podwójne w łańcuchu węglowym (kwasy tłuszczowe nienasycone) [13]. Dominującym kwasem nasyconym w słodkowodnym glonie *Cladophora glomerata* jest kwas palmitynowy (C16:0), a spośród innych kwasów nasyconych wykryto takie kwasy, jak: mirystynowy (C14:0), pentadekanowy (C15:0), stearynowy (C18:0) i arachidowy (C20:0). Okazało się, że *Cladophora glomerata* jest także źródłem wielu kwasów nienasyconych, takich jak: tetradekatrienowy (C14:3), tetradekatetraenowy (C14:4), 9-heksadekaenowy (C16:1), heksadekadienowy (C16:2), 6,10,14-heksadekatrienowy (C16:3), heptadekatrienowy (C17:3), linolowy (C18:2) i eikozahexaenowy (C20:6) [14]. Kwasy tłuszczowe pełnią wiele ważnych funkcji w kosmetyce. W szczególności kwasy nienasycone, a wśród nich niezbędnie nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), cechują się dobrym oddziaływaniem na skórę. Pełnią funkcję emolientów, czyli substancji pokrywających skórę cienką hydrofobową warstwą (tworzą tzw. płaszcz hydrolipidowy naskórka) chroniącą przed nadmierną utratą wody, a więc przed wysuszeniem i złuszczeniem się skóry, utratą elastyczności i nawilżenia. Ponadto kwasy tłuszczowe mają właściwości przeciwalergiczne, przeciwzapalne, regulują metabolizm skóry, uczestniczą w produkcji sebum i eikozanoidów. Związki te pełnią również funkcje budulcowe, gdyż wchodzi w skład błon komórkowych, cementu międzykomórkowego i ceramidów. Różne właściwości nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych powodują, że znalazły się one jako składniki zarówno kosmetyków do cery suchej i wrażliwej, gdyż chronią skórę przed infekcjami i utratą nawilżenia, jak i w preparatach do cery tłustej i mieszanej, ponieważ normalizują metabolizm skóry poprzez poprawę bariery lipidowej naskórka oraz regulację procesów keratynizacji. Dodatkowo, nienasycone kwasy tłuszczowe, chroniąc naskórek przed wysychaniem i działaniem niekorzystnych czynników zewnętrznych, zapewniają odpo-

Autor do korespondencji:

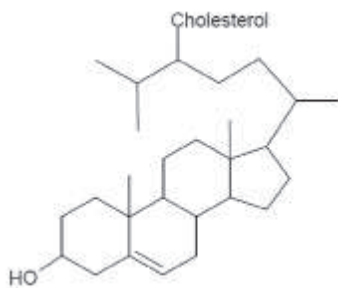
Mgr Joanna FABROWSKA, e-mail: joanna.fabrowska@amu.edu.pl

wiedni poziom nawilżenia i elastyczności, a zatem działają przeciwstarzeniowo i przeciwzmarszczkowo. Kwas palmitynowy obecny w dużych ilościach w *Cladophora glomerata* jest wykorzystywany w kosmetyce jako emulgator, a jego pochodna – palmitynian askorbylu jest popularnym przeciwutleniaczem. Bardzo cennym kwasem obecnym w tych glonach jest należący do grupy NNKT kwas linolowy (Rys. 1). Pełni on ważną funkcję w blokowaniu hormonów (eikozanoidów) odpowiedzialnych za stany zapalne skóry, a także w syntezie ceramidów. Ponadto kwas linolowy, jako naturalny składnik serum, reguluje pracę gruczołów łojowych i odblokowuje pory skóry [11, 15]. Wg niektórych badań, kwasy tłuszczowe mogą wykazywać również działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, co wskazuje na nowe zastosowanie słodkowodnych alg *Cladophora glomerata* jako źródła naturalnych konserwantów [14].



Rys. 1. Kwas linolowy

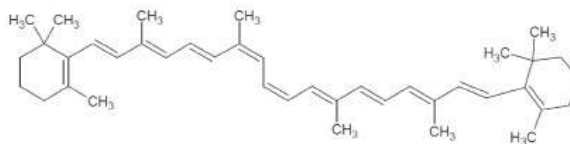
Pośród innych związków o charakterze lipidów występujących w słodkowodnych algach *Cladophora glomerata*, na uwagę zasługują steroidy. Substancje te zawierają w swej budowie czteropierścieniowy szkielet węglowy pochodzący od 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu [13]. W słodkowodnym gatunku *Cladophora glomerata* wykryto obecność takich steroidów, jak: ergosterol,  $\beta$ -sitosterol, dekortinol, a także pochodną cholesterolu – 22-dehydro-24-izopropylcholesterol [9]. Ergosterol należy do mikosteroli, tj. steroli izolowanych głównie z grzybów. Związek ten otrzymuje się na skalę przemysłową z drożdży, a następnie wykorzystywany jest do produkcji witaminy D<sub>2</sub> [13]. Z kolei  $\beta$ -sitosterol (Rys. 2) jest typowym fitosterolem, czyli roślinnym alkoholem steroidowym wykazującym aktywność przeciwzapalną, antybakteryjną, antywirusową i wzmacniającą odporność skóry [11]. Ponadto fitosterole mają zdolność do uzupełniania niedoborów w obrębie cementu międzykomórkowego, przez co wzmacniają barierę lipidową naskórka i chronią skórę przed nadmierną utratą wody [12]. Cholesterol i jego pochodne działają na skórę zmiękczająco i uelastyczniająco, ponadto są dobrymi emulgatorami typu W/O oraz regulatorami konsystencji kremów [11]. Steroidy pozyskiwane z glonu *Cladophora glomerata* mogą więc znaleźć zastosowanie w różnego typu produktach kosmetycznych: żelach i kremach oczyszczających i przeciwtrądzikowych, emulsjach typu *anti-aging*, czy też kremach ochronnych do cery suchej, wrażliwej i alergicznej.



Rys. 2.  $\beta$ -sitosterol

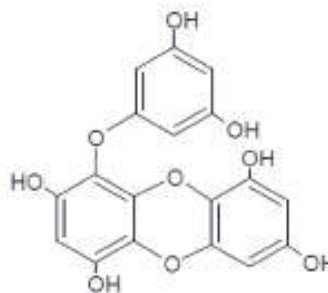
Bardzo ważną grupą substancji bioaktywnych we współczesnym przemyśle kosmetycznym są antyoksydanty. Związki te chronią skórę przed destrukcyjnym działaniem wolnych rodników na komórki skóry, a w efekcie – przeciwdziałają procesom starzenia się skóry. Do antyoksydantów zalicza się wiele substancji o zróżnicowanej budowie chemicznej, np. karotenoidy i związki polifenolowe. Okazuje

się, że słodkowodna *Cladophora glomerata* jest bogatym źródłem antyoksydantów, takich jak karotenoidy:  $\beta$ -karoten (Rys. 3), luteina i zeaksantyna [8]. Związki te są tetraterpenami, a konkretnie pochodnymi jononów, które zawierają sprzężony łańcuch polienowy [13]. Karotenoidy są prekursorami witaminy A i są dobrze rozpuszczalne w tłuszczach.  $\beta$ -karoten i inne karotenoidy przede wszystkim pełnią funkcję antyoksydantów w kosmetyce, przez co są popularnymi składnikami preparatów typu *anti-aging* i przeciwzmarszczkowych. Ponadto biorą udział w procesach keratynizacji naskórka regulując jego złuszczenie. Niedobór karotenoidów może skutkować suchością i nadmiernym złuszczeniem się skóry. Są również wykorzystywane jako naturalne filtry UV oraz pigmenty do produkcji szminek, pudrów, lakierów do paznokci i innych kosmetyków kolorowych. Karotenoidy pochodzące ze słodkowodnej algi *Cladophora glomerata* mogą więc znaleźć zastosowanie w produktach do skóry suchej, dojrzałej i starzejącej się, a także w produkcji kosmetyków kolorowych [15].



Rys. 3.  $\beta$ -karoten

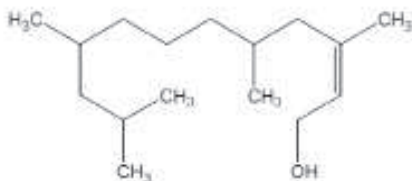
Kolejnymi ważnymi substancjami o działaniu antyoksydacyjnym są polifenole – związki zawierające co najmniej dwie grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia aromatycznego (przykład: ekol (Rys. 4)). Obecność sprzężonego układu wiązań podwójnych w pierścieniu aromatycznym warunkuje właściwości przeciwutleniające polifenoli. Do tej grupy zaliczane są: flawonoidy (m.in. izoflawony, katechiny, antocyjaniny), polifenolokwasy, kumaryny i inne [11]. Szczególną grupą polifenoli są flawonoidy. Są to barwniki roślinne, najczęściej barwy żółtej, będące pochodnymi 1,4-benzopironu. Wykazują wielokierunkowe działanie na skórę: antyoksydacyjne, przeciwwolnorodnikowe, przeciwzapalne, uszczelniające naczynia krwionośne i ochronne przed promieniowaniem UV. Ponadto, flawonoidy hamują działanie hialuronidazy – enzymu rozkładającego kwas hialuronowy oraz elastazy – enzymu hydrolizującego elastynę [12, 15]. W efekcie flawonoidy chronią skórę przed efektami starzenia, wzmacniają tkankę łączną oraz działają przeciwzmarszczkowo w preparatach *anti-aging*. Są również pożądanymi składnikami kosmetyków przeznaczonych do cery naczynkowej, alergicznej i wrażliwej. W badaniach nad słodkowodną makroalgą *Cladophora glomerata* okazało się, że jest ona surowcem bogatym w związki polifenolowe (np. flawonoidy) [16]. W tych samych badaniach potwierdzono wysoką aktywność antyoksydacyjną i przeciwnowotworową tego gatunku [17].



Rys. 4. Ekol

Terpenoidy, to kolejna grupa związków biologicznie czynnych wyizolowanych ze słodkowodnej makroalgi *Cladophora glomerata*.

Są to pochodne terpenów, tj. węglowodorów będących oligomerami izoprenu. Terpenoidy są związkami głównie pochodzenia roślinnego, najczęściej występujące jako lotne składniki olejków eterycznych, charakteryzujące się określonym zapachem i aktywnością biologiczną [13]. Przykładowo, *trans-fitol* (Rys. 5) obecny w *Cladophora glomerata* [9] jest alkoholem diterpenowym i składnikiem chlorofilu, o działaniu regenerującym i odmładzającym skórę [11].



Rys. 5. *Trans-fitol*

Tablica I

Związki biologicznie czynne zawarte w słodkowodnym glonie *Cladophora glomerata*

Grupa związków	Przykład	Właściwości	Zastosowanie
Kwasy tłuszczowe	Kwas linolowy	Emoliencyjne Przeciwalergiczne Przeciwzapalne Przeciwzmarszczkowe	Kremy do skóry suchej, wrażliwej Kosmetyki przeciwtrądzikowe Preparaty antyalergiczne
Steroidy	$\beta$ -sitosterol	Przeciwzapalne Antybakteryjne Uelastyczniające Emoliencyjne	Kosmetyki <i>anti-aging</i> Żele oczyszczające Kremy do cery suchej, wrażliwej
Karotenoidy	$\beta$ -karoten	Antyoksydacyjne Regulujące procesy keratynizacji Fotoprotekcyjne	Kosmetyki <i>anti-aging</i> Kremy przeciwzmarszczkowe Kremy nawilżające Kosmetyki kolorowe
Polifenole	Ekol	Antyoksydacyjne Przeciwzapalne Fotoprotekcyjne Uszczelniające naczynia krwionośne	Kremy do cery naczynkowej Kosmetyki <i>anti-aging</i> Kremy do cery wrażliwej i alergicznej
Terpenoidy	<i>Trans-fitol</i>	Regenerujące Odmładzające	Kosmetyki <i>anti-aging</i>
Węglowodany	Kwas alginowy	Nawilżające Przeciwzmarszczkowe	Kremy nawilżające Kosmetyki <i>anti-aging</i>
Garbniki	Kwas galusowy	Ściągające Ujędrniające Przeciwzapalne	Żele oczyszczające Kosmetyki przeciwtrądzikowe Balsamy ujędrniające Szampony przeciwłupieżowe
Witaminy	Kwas askorbinowy	Antyoksydacyjne Regenerujące	Kosmetyki <i>anti-aging</i>

Oprócz opisanych związków chemicznych, słodkowodne makrozielenice *Cladophora glomerata* są źródłem wielu innych substancji bioaktywnych. Warto wymienić tu węglowodany, które pełnią ważne funkcje w kosmologii jako substancje nawilżające, przeciwzmarszczkowe i chroniące skórę przed fotostarzeniem [9, 15]. W słodkowodnym gatunku *Cladophora glomerata* wykryto również obecność garbników [16], które działają na skórę ściągająco, przeciwzapalnie, antybakteryjnie, deodorująco i ujędrniająco [11]. Garbniki znalazły zastosowanie w produkcji kremów i maszek do cery tłustej i trądzikowej, balsamów

ujędrniających oraz szamponów przeciwłupieżowych [12]. *Cladophora glomerata* zawiera także witaminy: A (retinol), C (kwas askorbinowy), E (tokoferol), B<sub>1</sub> (tiamina) i B<sub>2</sub> (ryboflawina) [8]. Każda z tych witamin pełni osobne funkcje w kosmetyce: witamina A jest antyoksydantem, regeneruje skórę i reguluje procesy rogowacenia naskórka; witamina C również jest silnym przeciwutleniaczem i uczestniczy w biosyntezie kolagenu; witamina E chroni lipidy skóry przed utlenianiem i leczy łojotokowe zapalenie skóry; witamina B<sub>1</sub> reguluje gospodarkę wodną skóry, a witamina B<sub>2</sub> uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu skóry i nabłonka naczyń krwionośnych [11].

Słodkowodna makrozielenica, *Cladophora glomerata* jest naturalnym surowcem bogatym w różnorodne związki biologicznie czynne. Przykłady tych substancji, ich właściwości i potencjalne zastosowanie w kosmetyce zostały zestawione w Tablicy I.

## Podsumowanie

Słodkowodne makroglony nie są jeszcze obecnie popularnym surowcem kosmetycznym, w przeciwieństwie do alg morskich, które stały się w ostatnich latach jednymi z najczęściej stosowanych składników kosmetyków naturalnych [1, 2]. Okazuje się jednak, że również słodkowodne glony mogą być źródłem wielu substancji bioaktywnych o znaczeniu kosmetycznym. Wyniki badań wstępnych są obiecujące, wykazały, że słodkowodny gatunek *Cladophora glomerata* zawiera różnorodne związki biologicznie czynne, przede wszystkim dużą ilość kwasów tłuszczowych, polifenoli, a także makro- i mikroelementy. Warunkuje to szeroki zakres aktywności biologicznej oraz potencjalne wykorzystanie tego glonu jako jednego ze składników w preparatach kosmetycznych [8, 9, 14, 16, 17].

## Podziękowania

Praca sfinansowana ze środków grantu PBS I/A1/2/2012: „*Innowacyjna technologia ekstraktów glonowych – komponentów, pasz i kosmetyków*” przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

## Literatura

- Malinowska P.: *Algae extracts as active cosmetic ingredients*. Zeszyty Naukowe, Poznań University of Economics 2011, **212**, 123-129.
- Fabrowska J., Łęska B., Schroeder G., Messyasz B., Pikosz M.: *Biomass and extracts of algae as material for cosmetic*, w: Kim S.-K., Chojnacka K. (Ed.): *Marine algae extracts: processes, products, applications*. Wiley 2015, 681-706.
- Bellis V.J., McLarty D.A.: *Ecology of Cladophora glomerata (L.) Kütz. in southern Ontario*. Journal of Phycology 1967, **3**, 57-63.
- Schroeder G., Messyasz B., Łęska B., Fabrowska J., Pikosz M., Rybak A.: *Biomasa alg słodkowodnych surowcem dla przemysłu i rolnictwa*. Przemysł Chemiczny 2013, **92**, 7, 1380-1384.
- Heiba H.I., Al-Easa H.S., Rizk A.F.M.: *Fatty acid composition of twelve algae from the coastal zones of Qatar*. Plant Foods for Human Nutrition 1997, **51**, 27-34.
- Elenkov I., Georgieva T., Hadjieva P., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S.: *Terpenoids and sterols in Cladophora vagabunda*. Phytochemistry 1995, **38**, 457-459.
- Soltani S., Saadatmand S., Khavarinejad R., Nejadstatti T.: *Antioxidant and antibacterial activities of Cladophora glomerata (L.) Kütz in Caspian Sea Coast, Iran*. African Journal of Biotechnology 2011, **10**, 7684-7689.
- Khuantrairong T., Traichaiyaporn S.: *The nutritional value of edible freshwater alga Cladophora sp. (Chlorophyta) grown under different phosphorus concentrations*. International Journal of Agriculture and Biology 2011, **13**, 297-300.
- Khalid M.N., Shameel M., Ahmad V.U.: *The bioactivity and phytochemistry of two species of Cladophora (Siphonocladophyceae) from Sindh*. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences 2012, **49**, 113-121.
- Orhan I., Sener B., Atici T., Brunc R., Perozzod R., Tasdemir D.: *Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of Plasmodium falciparum fatty acid biosynthesis*. Phytomedicine 2006, **13**, 388-393.
- Molski M.: *Chemia piękna*. PWN 2010, 40-54; 99; 100; 105-110; 119-124; 160-161; 165-167; 250-263; 296-297.
- Marzec A.: *Chemia kosmetyków*. Dom Organizatora 2009, 85-87; 92, 283.

13. Kołodziejczyk A.: *Naturalne związki organiczne*. PWN 2006, 296-313, 427-437; 490-492; 525-527.
14. Khalid M.N., Shameel M., Ahmad V.U.: *The bioactivity and phytochemistry of two species of Cladophora (Siphonocladophyceae) from Sindh*. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences 2012, **49**, 113-121.
15. Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A.: *Rośliny w kosmetyce i kosmologii przeciwstarzeniowej*. PZWL 2012, 102-103; 140-143; 145-147; 224-225; 284-285.
16. Mohamed D.Y., Dwaish A.S., Abd-Ali G., Mohamed Jawad A.L.: *Use of Cladophora glomerata extract against multidrug resistant bacterial pathogens*. Journal of Environmental Science and Engineering B 2013, **2**, 495-500.
17. Laungsuwon R., Chulalaksananukul W.: *Antioxidant and anticancer activities of freshwater green algae, Cladophora glomerata and Microspora floccosa, from Nan River in northern Thailand*. Maejo International Journal of Science and Technology 2013, **7**, 181-188.

Mgr Joanna FABROWSKA\*, doktorantka Wydziału Chemii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W 2011 r. ukończyła studia licencjackie na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie na specjalności: Chemia Środków Bioaktywnych i Kosmetyków. Tytuł magistra uzyskała w 2013 r., specjalność: Chemia Kosmetyczna. Zainteresowania naukowe: analiza produktów naturalnych, chemia kosmetyczna, fitochemia i botanika farmakologiczna.

e-mail: joanna.fabrowska@amu.edu.pl

Dr hab. Bogusława ŁĘSKA, prof. UAM w 1991 r. ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Od 2011 r. pracuje w Zakładzie Chemii Supramolekularnej na Wydziale Chemii UAM na stanowisku profesora nadzwyczajnego. Jest autorką ponad 100 prac naukowych, z zakresu chemii związków poddawanych, chemii supramolekularnej, chemii kosmetycznej oraz ochrony środowiska.

e-mail: bogunia@amu.edu.pl

Prof. zw. dr hab. Grzegorz SCHROEDER jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii, kierunku chemia, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Kieruje Zakładem Chemii Supramolekularnej na Wydziale Chemii UAM. Jest autorem ponad 370 prac naukowych, w tym 12 monografii z zakresu: syntezy związków biologicznie aktywnych, chemii supramolekularnej, receptorów molekularnych, chemii i ochrony środowiska, spektroskopii NMR, FTIR, spektrometrii mas (ESI, MALDI), kinetyki w roztworach oraz procesów przemysłowych.

e-mail: schroeder@amu.edu.pl



## **Załącznik VI**

Ulvany – biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy  
izolowane z zielenic

## **Ulvany – biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy izolowane z zielenic**

### **1. Wstęp**

Związki biologicznie czynne pochodzenia naturalnego są obecnie bardzo cenionym surowcem w przemyśle medycznym, farmaceutycznym, kosmetycznym, jak również spożywczym. W dobie szybkiego życia, stresu i niebezpiecznych chorób cywilizacyjnych jest to związane ze wzrastającą świadomością społeczeństwa w zakresie dbania o swoje zdrowie, a także o wygląd zewnętrzny. Ponadto, surowce naturalne przeżywają aktualnie swój renesans, gdyż są powszechnie uważane za bardziej bezpieczne i skuteczne. Z tego względu stale poszukiwane są nowe substancje bioaktywne o wielokierunkowym, coraz efektywniejszym działaniu.

Jednymi z powszechnie wykorzystywanych związków biologicznie czynnych we współczesnej medycynie, czy też kosmetologii, są siarczanowe polisacharydy występujące w glonach. Do tej grupy związków należą również ulvany – polisacharydy siarczanowe, charakterystyczne dla zielenic, wykazujące szeroki wachlarz aktywności biologicznej. Ich działanie obejmuje m.in. właściwości antyoksydacyjne, immunostymulujące, antykoagulacyjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe i wiele innych. Ulvany są w najmniejszym stopniu przebadane i wykorzystywane spośród innych siarczanowych polisacharydów glonowych, takich jak fukoidany i karageniany. Praca ta ma na celu scharakteryzowanie ulvanów, począwszy od ich budowy, poprzez metody ekstrakcji i analizy, aż do aktywności biologicznej i potencjalnego zastosowania. Przybliżenie informacji na temat tej grupy polisacharydów siarczanowych, które są jeszcze mało poznanymi substancjami, pozwoli na wskazanie ich potencjału jako nowych, skutecznych surowców biologicznie czynnych, o szerokich możliwościach wykorzystania.

---

<sup>1</sup>joanna.fabrowska@amu.edu.pl, Zakład Chemii Supramolekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

## 2. Siarczanowe polisacharydy

Polisacharydy (poliwęglowodany, wielocukry) są bardzo obszerną grupą związków organicznych powstających w procesach metabolicznych organizmów żywych. Jako metabolity pierwotne pełnią wiele istotnych funkcji w organizmach, przede wszystkim stanowią główne substancje budulcowe i zapasowe komórek roślinnych i zwierzęcych.

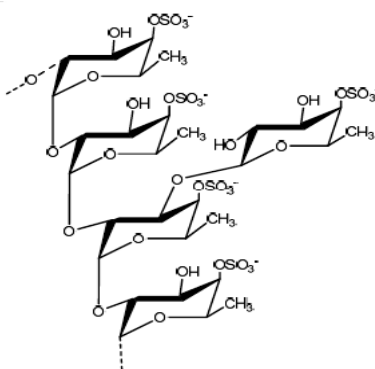
Zbudowane są z wielu (od 10 do 30000) jednostek cukrów prostych, tworzą rozbudowane struktury o wysokiej masie cząsteczkowej zwane biopolimerami [1]. Poszczególne jednostki cukrowe w obrębie polisacharydów są połączone wiązaniami glikozydowymi. Łańcuchy poliwęglowodanów mogą być proste lub rozgałęzione [2]. Wyróżnia się polisacharydy obojętne oraz kwaśne gdy w ich skład wchodzi reszty kwasowe, takie jak grupy siarczanowe i kwasy uronowe [1].

Właściwości fizykochemiczne polisacharydów są znacząco odmienne od właściwości cukrów prostych i oligosacharydów (cukrów złożonych z 2 do 10 cząsteczek cukrów prostych). Wielocukry wykazują znacznie mniejszą rozpuszczalność w wodzie w stosunku do cukrów prostych, ponieważ wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej maleje ich rozpuszczalność. Związki te nie wykazują również tak słodkiego smaku, jak ma to miejsce w przypadku węglowodanów prostych [1]. Ponadto polisacharydy są higroskopijne i tworzą z wodą koloidy (hydrozole) [2]. Za właściwości higroskopijne tych substancji odpowiedzialne są międzycząsteczkowe i wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Im więcej wiązań wodorowych w cząsteczkach policukrów, tym słabsza jest ich higroskopijność, a także rozpuszczalność w wodzie [3].

Siarczanowe polisacharydy (*ang. sulfated polysaccharides* – SPs) należą do wspomnianej grupy polisacharydów kwaśnych, zawierających grupy siarczanowe w swoich cząsteczkach. Substancje te występują w dużych ilościach w ścianach komórkowych glonów, przez co często są także nazywane kwaśnymi polisacharydami glonowymi [1]. Jest to bardzo złożona grupa związków o skomplikowanej budowie, wykazująca różnorodną aktywność biologiczną. Biorąc pod uwagę trzy grupy glonów, tj. brunatnice (*Phaeophyceae*), krasnorosty (*Rhodophyta*) i zielenice (*Chlorophyta*), wyróżnia się siarczanowe polisacharydy specyficzne dla każdej z tych grup.

Brunatnice charakteryzują się wysoką zawartością fukoidanów, należących do grupy SPs. Fukoidany zbudowane są najczęściej z merów fukozy, jak również ramnozy, galaktozy, ksylozy, glukozy i kwasów uronowych [4]. Związki te zbudowane są przede wszystkim z reszt 4-O-siarczanu fukopiranozy połączonych wiązaniami (1→2) [5]. Do fukoidanów zaliczane są fukany występujące w gatunku *Fucus vesiculosus*, galaktofukany obecne w *Sargassum sp.*, czy też laminarany izolowane z *Laminaria sp.* Fukany są zbudowane m.in. z cząsteczek fukozy, ksylozy i galaktozy w połączeniach

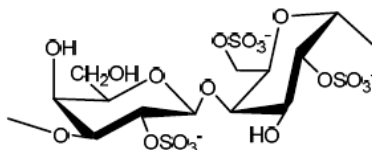
(1,3)- lub (1,4)- $\alpha$ -L-fukozy. Galaktofukany najczęściej zawierają cząsteczki galaktozy, ramnozy i fukozy oraz wiązania (1,6)- $\beta$ -D-galaktozy. Natomiast laminarany są polimerami zbudowanymi zwykle z glukozy i fukozy z charakterystycznym wiązaniem (1,3)- i (1,6)- $\beta$ -glukozy. Budowa przykładowego fukoidanu jest przedstawiona na Rysunku 1. Fukoidany są związkami biologicznie czynnymi o szerokim spektrum działania. Działają m.in. przeciwzapalnie, antyoksydacyjnie, przeciwzakrzepowo, antyproliferycyjnie, immunostymulująco i przeciwnowotworowo [4]. W kosmetyce wykorzystywane jest działanie antycellulitowe tych substancji, z uwagi na stymulację komórkowej przemiany materii i ukrwienia skóry, a także właściwości lipolityczne [2]. Fukoidany poprawiają również wchłanianie makro- i mikroelementów, witamin i peptydów przez naskórek [1]. W porównaniu z innymi siarczanowymi polisacharydami fukoidany są najbardziej rozpowszechnione na rynku jako surowce wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, jak również w medycynie [6].



Rysunek 1. Budowa fukoidanu wyizolowanego z *Fucusvesiculosus* [5]

Galaktany, a wśród nich karageniany i agarany, są z kolei siarczanowymi polisacharydami charakterystycznymi dla alg czerwonych (krasnorostów). Związki te są zbudowane z galaktopiranoz, tj. cyklicznych form D- i L-galaktozy. Karageniany występują w postaci  $\alpha$ -glikozydowych połączeń 4-siarczanu-D-galaktozy (jako  $\lambda$ -karagenina) oraz  $\beta$ -glikozydowych połączeń 4-siarczanu-D-galaktozy i  $\alpha$ -glikozydowych 3,6-anhydro-D-galaktozy ( $\chi$ -karagenina) [2]. Istnieje jeszcze wiele innych rodzajów karagenianów, jak np.:  $\lambda$  (Rysunek 2),  $\mu$ ,  $\theta$  i  $\kappa$  [5]. Polisacharydy z grupy karagenianów charakteryzują się specyficznymi właściwościami reologicznymi. Jako naturalne hydrokoloidy ulegają w wodzie hydratacji i pęcznieniu, tworząc roztwory koloidalne i żele [1]. Źródłem karagenianów są m.in. krasnorosty *Chondrus crispus* [4]. Natomiast charakterystycznym

cukrem budującym agarany jest galaktoza, częściowo zestyfikowana kwasem siarkowym. Do tej grupy zaliczany jest agar izolowany z glonów *Eucheuma sp.*, *Gracilaria sp.* i *Gelidium sp.* [2], a także porfyran występujący m.in. w gatunku *Porphyra capensis* [5]. Typowy porfyran jest zbudowany z połączeń 3- $\beta$ -D-galaktozy oraz 6-siarczanu- $\alpha$ -L-galaktozy lub 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galaktozy występujących naprzemiennie [5]. Agarany podobnie jak karageniany wykazują zdolność do tworzenia żeli. Galaktany cechują się różnorodną aktywnością biologiczną, np. przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, immunostymulującą, przeciwzakrzepową i przeciwnowotworową [4]. Związki z tej grupy są cenionymi surowcami kosmetycznymi przede wszystkim z uwagi na ich właściwości żelotwórcze. Karageniany i agarany są powszechnie wykorzystywane jako środki emulgujące, zagęszczające i stabilizatory, zarówno w przemyśle kosmetycznym jak i spożywczym [6]. Dodatkowo karageniany są stosowane w kosmetyce jako substancje nawilżające, ochronne i łagodzące podrażnienia [1].



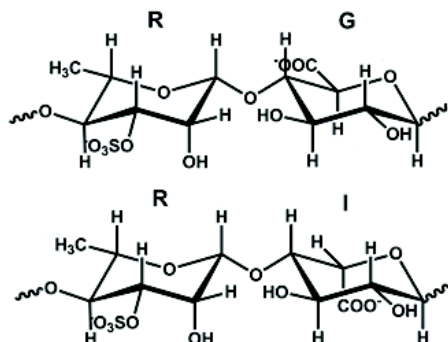
Rysunek 2. Budowa  $\lambda$ -karagenianu [5]

Ulvany są natomiast siarczanowymi polisacharydami izolowanymi z zielenic. W porównaniu do innych SPs, ulvany są najslabiej poznana tego typu grupą związków. Według bazy Web of Science<sup>TM</sup> w ostatnim dziesięcioleciu (dane z dnia 11.03.2016 r.) ukazały się 122 artykuły na temat ulvanów, podczas gdy odnośnie fukoidanów jest dostępnych 1576 publikacji, natomiast o karagenianach – aż 20144 [7]. Brakuje także handlowo dostępnych surowców na bazie ulvanów, a jeśli już takowe występują, to jest ich bardzo mało w stosunku do fukoidanów i galaktanów. Okazuje się jednak, że ulvany stanowią równie interesującą grupę związków bioaktywnych. Głównymi składnikami ulvanów są glukoza, ramnoza, ksyloza, jak również kwas glukuronowy i iduronowy. W swoich cząsteczkach ulvany zawierają w mniejszych ilościach mannozę, arabinozę, czy też galaktozę [8]. Jak dotąd ulvany były izolowane wyłącznie z morskich gatunków *Ulva sp.* [9, 10]. Przeprowadzone w ostatnim czasie badania wskazują także na obecność ulvanów w słodkowodnych zielenicach *Ulva flexuosa*, a także *Cladophora glomerata* [11]. Podobnie jak inne związki z grupy SPs ulvany charakteryzują się różnorodnymi właściwościami jako substancje bioaktywne. Wykazano m.in. aktywność

antyoksydacyjną, antyadhezyjną, antyproliferacyjną i przeciwnowotworową ulwanów [4÷6]. Ulwany stanowią obiecującą grupę substancji bioaktywnych, nad którą warto prowadzić badania.

### 3. Budowa i właściwości ulwanów

Nazwa „ulwany” została po raz pierwszy zaproponowana przez Lahaye i Axelos w 1993 roku [12]. Związki te były jak dotąd izolowane z różnych morskich gatunków *Ulva*, takich jak: *U. lactuca* [13], *U. rigida* [14], *U. armoricana*, *U. rotundata*, *U. scandinavica*, *U. olivascens*, *U. gigantea* [15], *U. clathrata* [9], *U. conglobata* [10], *U. fasciata* [16], *U. pertusa* [13], czy też *U. flexuosa* [17]. Budowa ulwanów jest niezwykle złożona i jak dotąd nie określono jej jeszcze w sposób jednoznaczny. Jedne z pierwszych badań nad strukturą ulwanów wyizolowanych z *Ulva lactuca* przeprowadzono w 1954 roku, stwierdzono wówczas, że ulwany są siarczanowymi polisacharydami zbudowanymi z cząsteczek glukozy i ramnozy [13]. Kolejne prace kontynuowane nad ulwanami wykazały, że także kwasy uronowe, arabinoza, ksyloza i kwasy glukuronowe mogą być składnikami tych polisacharydów [14]. Dziś wiadomo, że ulwany są głównie zbudowane z powtarzających się merów 3-siarczanu ramnozy połączonych wiązaniem (1,4)- $\alpha$ -glikozydowym z kwasem glukuronowym, bądź też iduronowym [12] (Rysunek 3). Skład monosacharydów i sposób ich połączenia w ulvanach jest bardzo różnorodny i zmienny w zależności od wielu czynników: gatunku glonów [15, 18], środowiska występowania [15], warunków środowiskowych i pory roku [18], a także od zastosowanej metody ekstrakcji [19]. Fakt ten znacząco utrudnia analizę ulwanów i wymaga ciągłej kontroli jakości tych związków.



Rysunek 3. Budowa ulwanów (R-ramnoza, G-kwas glukuronowy, I-kwas iduronowy)  
[opracowanie własne]

Właściwości fizykochemiczne ulwanów są podobne jak większości polisacharydów. Są to substancje półkrystaliczne barwy białej, o właściwościach higroskopijnych [20], rozpuszczalne w gorącej wodzie i w roztworach alkaliów [21]. Po ostudzeniu w wodzie pęcznieją tworząc żele. Mechanizm tworzenia żelu przez ulwany jest bardzo złożony i nie do końca poznany. Niemniej jednak określono pewne warunki, w których powstaje żel: obecność kwasu borowego i dwuwartościowego kationu, np.  $\text{Ca}^{2+}$ , oraz pH o wartości od 7,5 do 8 [22]. W normalnych warunkach ulwany posiadają strukturę liniową. Natomiast w obecności kwasu borowego i dwuwartościowego kationu tworzą struktury sferyczne o średnicy ok. 10 nm. Poszczególne struktury sferyczne mogą ze sobą asocjować tworząc agregaty przypominające wyglądem owoc maliny o średnicy od 500 do 1200 nm. Następnie zgrupowania agregatów łączą się poprzez liniowe włókna, którymi mogą być łańcuchy białek, glukuronian lub ulwany, które nie utworzyły form sferycznych. W ten sposób powstaje trójwymiarowa struktura, w obrębie której możliwe jest osadzenie kationu metalu i jego skompleksowanie pomiędzy poszczególnymi strukturami sferycznymi ulwanów [23]. Za chelatowanie jonów metali są odpowiedzialne oddziaływania pochodzące od grup siarczanowych i karboksylowych obecnych w tego rodzaju polisacharydach siarczanowych [8].

#### **4. Metody ekstrakcji ulwanów**

Niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika wybranego do ekstrakcji ulwanów, wstępnym etapem procesu izolacji jest wyodrębnienie substancji lipidowych oraz barwników asymilacyjnych (chlorofile, karotenoidy) z biomasy glonów. Do tego celu wykorzystywane są różne rozpuszczalniki organiczne, takie jak: aceton, dichlorometan, etanol, metanol, czy chloroform [20, 21, 24, 25]. Etap ten pozwala na wstępne oczyszczenie biomasy z substancji hydrofobowych oraz pigmentów, aby następnie przejść do ekstrakcji substancji hydrofilowych, jakimi są polisacharydy.

Wykorzystując fakt, że ulwany są związkami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie, najczęściej stosowaną metodą izolacji tych związków jest ekstrakcja gorącą wodą [20, 24]. Proces ten jest przeprowadzany w wodzie o temperaturze 75-85 °C przez kilka godzin [20, 25]. Ulwany mogą być również ekstrahowane roztworami alkaliów, jak np. węglanem sodu [21], a także kwasów [24]. Inną metodą izolacji ulwanów jest ekstrakcja z dodatkiem substancji chelatujących jony wapnia, takich jak EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) i szczawian amonu [9, 24]. Zastosowanie środków chelatujących jony wapnia ułatwia ekstrakcję ulwanów poprzez niszczenie wiązań chemicznych utworzonych przez ulwany w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrz ściany komórkowej glonów [24].

Kolejnym etapem po ekstrakcji ulvanów jest ich oczyszczanie z innych substancji rozpuszczalnych w wodzie, które mogły zostać wyekstrahowane razem z ulwanami. Do tych związków należą m.in. aminokwasy, proteiny i peptydy. Ekstrakt po izolacji ulvanów może zawierać również inne polisacharydy, takie jak skrobia, ponieważ zarówno ulwany, jak i substancje skrobiowe są składnikiem ścian komórkowych glonów [21]. W celu usunięcia substancji zanieczyszczających ulwany stosuje się hydrolizę enzymatyczną z wykorzystaniem  $\alpha$ -amylazy, która hydrolizuje skrobię oraz proteinazy K, która z kolei hydrolizuje proteiny [20, 25, 26]. Inne kontaminanty, jak np. barwniki asymilacyjne, czy związki lotne odpowiadające za specyficzny zapach glonów, mogą być efektywnie usuwane z użyciem węgla aktywnego [21].

W celu wytrącenia ulvanów z roztworu wodnego stosowane są rozpuszczalniki organiczne, najczęściej jest to etanol lub aceton [21, 25]. Jednocześnie czynność ta pozwala na oddzielenie ulvanów od niskocząsteczkowych związków rozpuszczalnych w etanolu, jak również pozostałości pigmentów [21]. Ostatnim etapem jest suszenie wytrąconych ulvanów. Efektywną metodą w tym przypadku jest liofilizacja, a także suszenie w niskiej temperaturze lub w próżni [27]. Niska temperatura stosowana w tych metodach zapewnia zachowanie stabilności ulvanów, a co za tym idzie – pozwala na utrzymanie cennych właściwości tych substancji.

## 5. Metody analizy ulvanów

Analiza ulvanów stanowi bardzo ważny aspekt w ich badaniach. Jako, że budowa tych związków nie została jeszcze dokładnie sprecyzowana ze względu na jej zmienność w zależności od wielu czynników [15, 18, 19], analiza ulvanów jest bardzo trudnym zagadnieniem i wymaga wiele pracy. Jednak jest to niezbędny etap w toku procesu analitycznego pozyskiwania ulvanów z zielenic.

W analizie ulvanów wykorzystywane są różne techniki instrumentalne. Jedną z najbardziej użytecznych i najczęściej wykorzystywanych metod jest technika NMR, czyli spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. W badaniach polisacharydów wykorzystywana jest zarówno analiza  $^1\text{H}$  NMR, jak i  $^{13}\text{C}$  NMR. Metoda ta jest stosowana zarówno do identyfikacji ulvanów, jak i do badania ich struktury poprzez określenie sposobu rozmieszczenia atomów w cząsteczce. Dlatego też analiza NMR jest jedną z najczęściej wymienianych metod w literaturze w zakresie badania ulvanów [11, 14, 15, 20, 23, 24].

Inną ważną techniką służącą do analizy ulvanów jest spektroskopia w podczerwieni FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), która pozwala na identyfikację grup funkcyjnych charakterystycznych dla tych

substancji. Za pomocą FT-IR można określić obecność grup funkcyjnych obecnych w ulvanach, takich jak: grupa hydroksylowa, karboksylowa, siarczanowa, ketonowa, czy też mostek glikozydowy. Z uwagi na prostotę wykonania tej analizy, a także łatwość interpretacji wyników jest ona bardzo często stosowana w badaniach ulwanów [11, 20, 28].

Również metody chromatograficzne są szeroko wykorzystywane w przypadku analizy siarczanowych polisacharydów. Największe zastosowanie w przypadku ulwanów znajduje chromatografia wykluczania molekularnego [18, 25, 29], nazywana także chromatografią żelową, sitową lub sączeniem molekularnym. Konkretny przykład stanowi wysokosprawna chromatografia wykluczania molekularnego (ang. *high pressure size exclusion chromatography* HPSEC). Technika ta pozwala na określenie rozkładu masy cząsteczkowej ulwanów, a dzięki uprzednio przeprowadzonej hydrolizie kwasowej – na identyfikację monosacharydów budujących ulwany, również na podstawie ich masy cząsteczkowej. Rozdzielanie substancji w tym rodzaju chromatografii zachodzi bowiem na skutek różnicy mas cząsteczkowych badanych związków. Także inne metody chromatograficzne, jak np.: HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa) [30], GC (chromatografia gazowa) [14, 25], czy też połączenie HPLC z chromatografią jonowymienną [31] znajdują zastosowanie w analizie ulwanów. Wymienione metody analityczne służą do jakościowego i ilościowego oznaczania cukrów obojętnych i kwaśnych budujących ulwany.

Istnieje jeszcze wiele technik analitycznych, które z powodzeniem można stosować do badań ulwanów. Spośród tych najczęściej używanych należy wymienić analizę elementarną [11, 20], analizę termogravimetryczną (TGA) [20], fluorescencję rentgenowską (XRF) [11], czy też badania dichroizmu kołowego (CD) [26].

## **6. Aktywność biologiczna ulwanów**

Ulvany wykazują szereg różnorodnych właściwości jako substancje biologicznie czynne, jednakże ich właściwości na tle innych siarczanowych polisacharydów izolowanych z glonów są słabo poznane. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na wiele unikalnych właściwości ulwanów, a zatem na szerokie możliwości wykorzystania tych związków w różnych gałęziach przemysłu. Poniżej opisane rodzaje aktywności biologicznej ulwanów pokazują jak bardzo złożone i wielokierunkowe działanie wykazują te związki. Warto więc kontynuować badania nad ulwanami jako substancjami bioaktywnymi, dzięki czemu mogą one zostać w przyszłości wykorzystane w medycynie, farmacji, kosmetyce i branży spożywczej.

### **6.1. Aktywność antyoksydacyjna**

Jedną z właściwości, jaką wykazują ulwany jest aktywność antyoksydacyjna, która została potwierdzona wynikami wielu badań [32÷38]. Oznacza to, że ulwany są zdolne do inaktywacji wolnych rodników, które przyczyniają się do starzenia się organizmu, a także są powodem wielu chorób. Działanie przeciwutleniające ulwanów opiera się na różnych mechanizmach. W badaniach *in vitro* wykazano zdolność ulwanów do inaktywacji rodników nadtlennokowych i hydroksyloowych, jak również do chelatowania metali ciężkich odpowiedzialnych za katalizowanie reakcji rodnikowych [32, 35, 36, 38]. Nie jest do końca znana zależność między budową ulwanów, a ich aktywnością antyoksydacyjną. Niektóre prace dowodzą, że im więcej grup siarczanowych zawierają ulwany, tym silniejsze są ich właściwości przeciwutleniające [37]. Natomiast w badaniach prowadzonych przez Shao i in. wykazano zupełnie odwrotną tendencję – frakcje ulwanów o mniejszej zawartości grup siarczanowych wykazywały silniejszą aktywność antyoksydacyjną [36].

Mimo, iż mechanizm działania ulwanów jako antyoksydantów nie został jeszcze jednoznacznie określony, niewątpliwy jest fakt, że zdolność ulwanów do zmiatania wolnych rodników czyni je atrakcyjnym surowcem bioaktywnym. Działanie antyoksydacyjne sprawia, że ulwany można wykorzystać zarówno w przemyśle kosmetycznym, spożywczym, jak i farmaceutycznym. Dodane do kosmetyków ulwany chroniłyby przed wolnymi rodnikami zarówno skórę, jak i sam kosmetyk. Ulwany mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w preparatach typu anti-aging i chronić skórę przed starzeniem się, jak również w innych typach kosmetyków, aby wykazywać działanie ochronne i zapobiegać utlenianiu innych składników masy kosmetycznej. W podobny sposób ulwany można wykorzystać jako dodatek do produktów spożywczych i suplementów diety. Stosowane doustnie zapewniałyby dodatkową porcję antyoksydantów w diecie, jednocześnie chroniąc substancje spożywcze przed zepsuciem spowodowanym działaniem wolnych rodników.

### **6.2. Aktywność przeciwnowotworowa**

Aktywność przeciwnowotworowa to inny przykład właściwości biologicznej ulawnów, która była szeroko badana w ciągu ostatnich kilku lat [6, 39, 40]. Substancje aktywne przeciwnowotworowo mogą działać zasadzie różnych mechanizmów, np. wykazywać aktywność antyoksydacyjną (wolne rodniki niszczą DNA, białka i inne struktury w organizmie powodując jego starzenie się, a więc pośrednio mogą być przyczyną chorób nowotworowych), antyproliferacyjną (tj. zapobiegającą namnażaniu się komórek nowotworowych), jak również apoptotyczną (niszczącą komórki

nowotworowe). Ulvany działają zarówno jako antyoksydanty [32-38], jak i substancje antyproliferacyjne oraz apoptotyczne [39]. Badania wykazały działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne ulwanów wobec komórek raka wątroby (HepG2), raka okrężnicy (HCT116) [39], a także raka piersi [40]. W czasach, gdy rak stał się jedną z najbardziej niebezpiecznych chorób cywilizacyjnych stale poszukiwane są nowe, skuteczne źródła leków przeciwnowotworowych. Ulvany mogą stać się alternatywą lub też uzupełnieniem aktualnie stosowanych leków w terapii raka. Na korzyść ulwanów jako potencjalnych substancji przeciwnowotworowych dodatkowo wpływa ich naturalne pochodzenie.

### **6.3. Aktywność immunostymulująca**

Ulvany charakteryzują się także właściwościami immunostymulującymi [41, 42], co oznacza, że aktywują one działanie układu odpornościowego. Aktywność immunostymulująca ulwanów opiera się na ich oddziaływaniu na makrofagi, czyli komórki układu odpornościowego uczestniczące w mechanizmach obronnych organizmu w przypadku infekcji drobnoustrojami. Wykazano, że ulvany mogą stymulować wydzielanie prostaglandyny E2 (PGE2) makrofagów i wywołać wzrost ekspresji cyklooksygenazy-2 (COX-2) oraz syntazy-2 tlenku azotu (2-NOS) [42], co warunkuje zdolność ulwanów do regulacji aktywności makrofagów. Substancje te mogą znaleźć zastosowanie w terapii chorób, w których system immunologiczny działa nieprawidłowo i jest osłabiony, jak np. AIDS i choroby nowotworowe.

### **6.4. Aktywność antykoagulacyjna**

Działanie antykoagulacyjne (przeciwzkrzepowe) ulwanów jest przykładem innej ważnej z punktu widzenia medycznego aktywności tych związków [10, 40]. Aktywność antykoagulacyjna polega na spowalnianiu, utrudnianiu lub uniemożliwianiu krzepnięcia krwi. Ulvany działają jako substancje heparynopodobne poprzez hamowanie fazy przejścia protrombiny w trombinę, jak również zapobieganie agregacji trombocytów oraz ich adhezji do ścian naczyń krwionośnych [6]. To wskazuje na możliwość zastosowania ulwanów jako leków przeciwzkrzepowych w leczeniu zakrzepic różnego pochodzenia, takich jak choroby sercowo-naczyniowe i mózgowo-naczyniowe.

### **6.5. Aktywność antyhiperlipidemiczna**

Zdolność do obniżania poziomu cholesterolu we krwi, czyli aktywność antyhiperlipidemiczna kolejna cenna właściwość ulwanów. Stwierdzono, że te polisacharydy siarczanowe są zdolne do regulowania metabolizmu

lipidów przez obniżanie zawartości lipoprotein o małej gęstości (ang. *low density lipoprotein* LDL) w osoczu [43, 44]. Ulvany można poddawać różnego typu modyfikacjom w celu polepszenia ich właściwości. Qi i in. dowiedli, że acetylowane pochodne ulwanów posiadają silniejsze zdolności w zakresie obniżania poziomu LDL, niż ich niemodyfikowane, naturalne odpowiedniki [45]. Ulvany mogą być zatem w przyszłości wykorzystane w leczeniu hipercholesterolemii, która z kolei stanowi jeden z podstawowych czynników ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego.

### 6.6. Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwwirusowa

Inną właściwością ulwanów jest aktywność przeciwbakteryjna i przeciwwirusowa. Działanie przeciwbakteryjne tych związków polega na ich aktywności antyadhezyjnej, czyli zapobiegającej przyleganiu bakterii do komórek zakażonego organizmu. W badaniach wykazano działanie antyadhezyjne ulwanów wobec szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis* [46]. Działanie przeciwbakteryjne ulwanów wykazano także w przypadku *Staphylococcus aureus* [47]. Natomiast aktywność przeciwwirusowa ulwanów obejmuje działanie wobec wirusa opryszczki *Herpes simplex* typu 1 (HSV-1) [48], a także paramyksowirusów (*Paramyxo viridae*), takich jak: *Human parainfluenza virus* (HPIV) wirus paragrypy, *Mumps virus* (MuV) wirus świnki i *Measles virus* (MEV) wirus odry [49]. Jak widać aktywność przeciwdrobnoustrojowa ulwanów stwarza możliwość ich wykorzystania w leczeniu chorób spowodowanych zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi, a także jako dodatków do kosmetyków, czy też produktów spożywczych o działaniu konserwującym.

### 6.7. Inne właściwości i perspektywy zastosowań

Opisane powyżej przykłady pokazują jak bardzo różnorodne właściwości wykazują ulvany w zakresie aktywności biologicznej. Fakt ten wskazuje na szerokie perspektywy zastosowań ulwanów w medycynie i innych dziedzinach. Ważnym aspektem jest stwierdzenie, że ulvany są związkami cytokompatybilnymi i nietoksycznymi [50], czyli są one bezpieczne dla naszego zdrowia i mogą być w przyszłości z powodzeniem wykorzystywane, np. jako dodatki do leków.

Ulvany charakteryzują się jeszcze wieloma innymi unikalnymi właściwościami. Zdolność tych związków do tworzenia żelu oraz do pochłaniania wody [8, 22, 23] czyni ulvany potencjalnym surowcem do zastosowań biomedycznych, takich jak opatrunki i systemy kontrolowanego uwalniania leków [51, 52]. Istnieje również wiele obszarów zastosowań ulwanów w kosmetyce. Ze względu na zdolność tych substancji do regeneracji tkanek skóry [52] mogą być one wykorzystywane jako składniki aktywne

kosmetyków typu anti-aging oraz preparatów regenerujących skórę, np. po oparzeniach i peelingach chemicznych. Natomiast właściwości higroskopijne ulwanów warunkują ich działanie nawilżające po aplikacji na skórę [53]. Wysoka zawartość cząsteczek ramnozy w ulwanach sprawia, że związki te mogą indukować syntezę kolagenu w skórze [54]. Ponieważ ulwany są naturalnymi anionowymi polimerami cukrowymi mają one szansę zostać wykorzystane jako naturalne surfaktanty [55]. Oprócz działania leczniczego i pielęgnacyjnego na skórę ulwany mogą także stabilizować sam produkt kosmetyczny. Ich działanie jako stabilizatorów opiera się na właściwościach antyoksydacyjnych [32÷38], jak również żelotwórczych [8, 22, 23], dzięki czemu ulwany dodane np. do kremu działają jak zagęstniki zapobiegając rozwarstwianiu się emulsji kosmetycznych.

## **7. Podsumowanie**

Poszukiwanie nowych substancji biologicznie czynnych, a także ich naturalnych źródeł stanowi obecnie jeden z najważniejszych kierunków badań. Jednymi z takich związków są ulwany, czyli siarczanowe polisacharydy występujące w morskich zielenicach *Ulva sp.* Te nowe bioaktywne surowce charakteryzują się zróżnicowaną budową oraz właściwościami. Przede wszystkim jednak ulwany wykazują różnorodną aktywność biologiczną, która obejmuje m.in. działanie antyoksydacyjne, immunostymulujące, przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe. To sprawia, że ulwany stanowią atrakcyjny naturalny surowiec o wielokierunkowym działaniu i szerokich perspektywach ich zastosowania w medycynie, farmacji, kosmetyce i przemyśle spożywczym. Ponieważ właściwości ulwanów nie zostały jeszcze do końca poznane warto kontynuować badania nad tymi związkami, aby w pełni móc korzystać z ich pozytywnych własności.

## **8. Podziękowania**

Projekt jest częściowo finansowany w ramach grantu 2014/13/B/NZ8/04690 pt.: „Fizykochemiczne i biologiczne przyczyny ekologicznej dominacji zielenic nitkowatych glonów w ekosystemach słodkowodnych” przyznany przez Narodowe Centrum Nauki w Polsce.

## Literatura

1. Lamer-Zarawska E., Chwała C., Gwardys A. *Rośliny w kosmetyce i kosmetologii przeciwstarzeniowej*, (2012), s. 101-110, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
2. Molski M. *Chemia piękna*, (2010), s. 153-159, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
3. Kołodziejczyk A. *Naturalne związki organiczne*, (2006), s. 236, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
4. De Jesus Raposo M. F., Bernardo de Morais A. M., Santos Costa de Morais R. M. *Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications*, *Marine Drugs*, 13 (2015), s. 2967-302
5. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H. S. *Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae*, *Marine Drugs*, 9 (2011), s. 196-223
6. Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S. K. *Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae*, *Carbohydrate Polymers*, 84 (2011), s. 14-21
7. <https://webofknowledge.com>
8. Robic A., Lahaye M. *Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds*, *Biomacromolecules*, 6 (2007), s. 1765-1774
9. Hernández-Garibay E., Zertuche-González J., Pacheco-Ruiz I. *Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides, from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh*, *Journal of Applied Phycology*, 23 (2010) s. 537-542
10. Mao W., Zang X., Li Y., Zhang H. *Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity*, *Journal of Applied Phycology*, 18 (2006), s. 9-14
11. Pankiewicz R., Łęska B., Messyasz B., Fabrowska J., Sołoducha M., Pikosz M. *First isolation of polysaccharidic ulvans from cell wall of freshwater algae*, *Algal Research*, (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.025>
12. Lahaye M., Axelos M. A. V. *Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.)*, *Carbohydrate Polymers*, 22 (1993), s. 261-265
13. Pengzhan Y., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z., Pengcheng L. *Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta)*, *Pharmacological Research*, 48 (2003), s. 543-549
14. Lahaye M., Ray B. *Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides*, *Carbohydrate Research*, 283 (1996), s. 161-173
15. Lahaye M., Alvarez-Cabal Cimadevilla E., Kuhlenskamp R., Quemener B., Lognone V., Dion P. *Chemical composition and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta)*, *Journal of Applied Phycology*, 11 (1999), s. 1-7

16. Paulert R., Talamini V., Cassolato J. E. F., Duarte M. E. R., Nosedá M. D., Smania A., Stadnik M. J. *Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)*, Journal of Plant Diseases and Protection, 116 (2009), s. 263-270
17. Castelar B., Reis R. P., Carolina dos Santos Calheiros A. **Ulva lactuca* and *U. flexuosa* (Chlorophyta, Ulvophyceae) cultivation in Brazilian tropical waters: recruitment, growth, and ulvan yield*, Journal of Applied Phycology, 26 (2014), s. 1989-1999
18. Robic A., Sassi J. F., Dion P., Lerat Y., Lahaye M. *Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany Coast*, Journal of Phycology, 45 (2009), s. 962-973
19. Siddhanta A. K., Goswami A. M., Ramavat B. K., Mody K. H., Mairh O. P. *Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters*, Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 30 (2001), s. 166-172
20. Alves A., Caridade S. G., Mano J. F., Sousa R. A., Reis R. L. *Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae*, Carbohydrate Research, 345 (2010), s. 2194-2200
21. Alves A., Sousa R. A., Reis R. L. *A practical perspective on ulvan extracted from green algae*, Journal of Applied Phycology, 25 (2013), s. 407-424
22. Haug A. *The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulphated polysaccharide from *Ulva lactuca**, Acta Chemica Scandinavica B., 30 (1979), s. 562-566
23. Robic A., Gaillard C., Sassi J. F., Lerat Y., Lahaye M., *Ultrastructure of Ulvan: a polysaccharide from green seaweeds*, Biopolymers, 8 (2009), s. 654-664
24. Robic A., Rondeau-Mouro C., Sassi J. F., Lerat Y., Lahaye M. *Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae)*, Carbohydrate Polymers, 77 (2009), s. 206-216
25. Costa C., Alves A., Pinto P., Sousa R. A., Silva E., Reis R. L., Rodrigues A., *Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure*, Carbohydrate Polymers, 88 (2012), s. 537-546
26. Paradossi G., Cavalieri F., Pizzoferrato L., Liquori A. M., *A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva**, International Journal of Biological Macromolecules, 25 (1999), s. 309-315
27. Jani G. K., Shah D. P., Prajapati V. D., Jain V. C. *Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 4 (2009), s. 309-323
28. Robic A., Bertrand D., Sassi J. F., Lerat Y., Lahaye M. *Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics*, Journal of Applied Phycology, 21 (2009), s. 451-456

29. Yaich H., Garna H., Besbes S., Barthélemy J. P., Paquot M., Blecker C., Attia H. *Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from Ulva lactuca of Tunisia coast*, Food Hydrocolloids, 40 (2014), s. 53-63
30. Robic A., Sassi J. F., Lahaye M. *Impact of stabilization treatments of the green seaweed Ulva rotundata (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan*, Carbohydrate Polymers, 74 (2008), s. 344-352
31. Quemener B., Lahaye M., Bobin-Dubigeon C. *Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography*, Journal of Applied Phycology, 9, (1997), s. 179-188
32. Qi H., Zhang Q., Zhao T., Chen R., Zhang H., Niu X., et al. *Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta) in vitro*, International Journal of Biological Macromolecules, 37 (2005), s. 195-199
33. Qi H., Zhao T., Zhang Q., Li Z., Zhao Z., Xing R. *Antioxidant activity of different molecular weight sulphated polysaccharides from Ulva pertusa Kjellm (Chlorophyta)*, Journal of Applied Phycology, 17 (2005), s. 527-534
34. Qi H., Zhang Q., Zhao T., Hu R., Zhang K., Li Z. *In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta)*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16 (2006), s. 2441-2445
35. Qi H., Liu X., Ma J., Zhang Q., Li Z. *In vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta)*, Journal of Medicinal Plants Research, 4 (2010), s. 2445-2451
36. Shao P., Chen M., Pei Y., Sun P. *In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophytan seaweeds Ulva fasciata*, International Journal of Biological Macromolecules, 59 (2013), s. 295-300
37. Qi H., Sun Y. *Antioxidant activity of high sulfate content derivative of ulvan in hyperlipidemic rats*, International Journal of Biological Macromolecules, 76 (2015), s. 326-329
38. Costa L. S., Fidelis G. P., Codeiro S. L., Oliveira R. M., Sabry D. A., Câmara R. B. G., Nobre L. T. D. B., Costa M. S. S. P., Almeida-Lima J., Farias E. H. C., Leite E. L., Rocha H. A. O. *Biological activities of sulphated polysaccharides from tropical seaweeds*, Biomedical and Pharmacology Journal, 64 (2010), s. 21-28
39. Ahmed O. M., Ahmed R. R. *Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells in vitro and in vivo*, Journal of Cancer Science & Therapy, 6 (2014), s. 2002-2008
40. El-Baky H. H. A., Baz F. K. E., Baroty G. S. E. *Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae Ulva lactuca L.*, Academic Journal of Cancer Research, 2 (2009), s. 1-11
41. Castro R., Piazzon M. C., Zarra I., Leiro J., Noya M., Lamas J. *Stimulation of turbot phagocytes by Ulva rigida C. Agardh polysaccharides*, Aquaculture, 254 (2006), s. 9-20

42. Leiro J. M., Castro R., Arranz J. A., Lamas J. *Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed Ulva rigida C. Agardh*, International Immunopharmacology, 7 (2007), s. 879-888
43. Yu P. Z., Zhang Q. B., Li N., Xu Z. H., Wang Y. M., Li Z. E. *Polysaccharides from Ulva pertusa (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity*, Journal of Applied Phycology, 15 (2003), s. 21-27
44. Qi H., Huang L., Liu X., Liu D., Zhang Q., Liu S. *Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta)*, Carbohydrate Polymers, 87 (2012), s. 1637-1640
45. Qi H., Liuc X., Zhang J., Duana Y., Wanga X., Zhang Q. *Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from Ulva pertusa*, International Journal of Biological Macromolecules, 50 (2012), s. 270-272
46. Gadenne V., Lebrun L., Jouenne T., Thebault P. *Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 112 (2013), s. 229-236
47. Gadenne V., Lebrun L., Jouenne T., Thebault T. *Role of molecular properties of ulvans on their ability to elaborate antiadhesive surfaces*, Journal of Biomedical Materials Research A, 103(2015), s. 1021-1028
48. Lee J. B., Hayashi K., Maeda M., Hayashi T. *Antiherpetic activities of sulphated polysaccharides from green algae*, Planta Medica. 70 (2004), s. 813-817
49. Aguilar-Briseño J. A., Cruz-Suarez L. E., Sassi J. F., Ricque-Marie D., Zapata-Benavides P., Mendoza-Gamboa E., Rodríguez-Padilla C., Trejo-Avila L. M. *Sulphated Polysaccharides from Ulva clathrata and Cladosiphonokamuranus Seaweeds both Inhibit Viral Attachment/Entry and Cell-Cell Fusion*, in NDV Infection, Marine Drugs, 13 (2015), s. 697-712
50. Alves A., Sousa R. A., Reis R. L. *In vitro cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharides extracted from green algae*, Phytotherapy Research, 27 (2013), s. 1143-1148
51. Alves A., Pinho E. D., Neves N. M., Sousa R. A., Reis R. L. *Processing ulvan into 2D structures: Cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications*, International Journal of Pharmaceutics, 426 (2012), s. 76-81
52. Chandika P., Ko S. C., Jung W. K. *Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration*, International Journal of Biological Macromolecules, 77 (2015), s. 24-35
53. Kim S. K., Ravichandran Y. D., Khan S. B., Kim Y. T. *Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms*, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13 (2008), s. 511-523
54. Andrès E., Molinari J., Péterszegi G., Mariko B., Ruszova E., Velebny V., Faury G., Robert L. *Pharmacological properties of rhamnose-rich polysaccharides, potential interest in agedependent alterations of connectives tissues*, Pathologie Biologie, 54 (2006), s. 420-425
55. Covis R., Vives T., Gaillard C., Benoit M., Benvegnu T. *Interactions and hybrid complex formation of anionic algal polysaccharides with a cationic glycine betaine-derived surfactant*, Carbohydrate Polymers, 121 (2015), s. 436-448

## **Ulvany – biologicznie czynne siarczanowe polisacharydy izolowane z zielenic**

### Streszczenie

Ulvany są siarczanowymi polisacharydami zbudowanymi głównie z kwasu glukuronowego, kwasu iduronowego, rhamnozy, glukozy i ksylozy. Jak dotąd związki te zostały odkryte i wyizolowane z morskich gatunków zielenic *Ulva*, takich jak: *U. lactuca*, *U. armoricana*, *U. rigida*, *U. pertusa*, *U. clathrata*, *U. flexuosa*, czy też *U. fasciata*. Skład jednostek cukrowych w ulvanach może się różnić w zależności od gatunku zielenic i warunków środowiskowych. Izolacja ulwanów polega na ekstrakcji gorącą wodą, roztworami alkalicznymi lub z dodatkiem środków chelatujących. Są to substancje higroskopijne, półkrystaliczne, posiadające zdolność do tworzenia trwałych żeli o zwartej, sztywnej strukturze. Ulvany posiadają wiele interesujących właściwości w zakresie aktywności biologicznej, m.in.: antyoksydacyjne, antyproliferacyjne, immunostymulujące, przeciwzakrzepowe, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. To sprawia, że ulvany mogą znaleźć wiele zastosowań w medycynie i przemyśle farmaceutycznym jako produkty lecznicze w terapii przeciwnowotworowej, leczeniu zakrzepicy, miażdżycy i innych schorzeń, a także w przemyśle kosmetycznym jako surowce nawilżające, przeciwstarzeniowe, regeneracyjne i stabilizatory emulsji.

Słowa kluczowe: ulvany, siarczanowe polisacharydy, zielenice, aktywność biologiczna

## **Ulvans – sulfated polysaccharides isolated from green algae**

### Abstract

Ulvans are sulfated polysaccharides mainly composed of glucuronic acid, iduronic acid, rhamnose, glucose and xylose. So far, these compounds have been discovered and isolated from marine green algae *Ulva* species, such as *U. lactuca*, *U. armorica*, *U. rigida*, *U. pertusa*, *U. clathrata*, *U. flexuosa* and *U. fasciata*. Composition of the sugar units in ulvans may vary depending on the species of green algae and environmental conditions. Isolation of ulvans based on the extraction with hot water or alkaline solution with the addition of chelating agents. They are hygroscopic materials, semi-crystalline, having the ability to create stable gels about compact, rigid structure. Ulvans possess many interesting properties in terms of their biological activity, e.g.: antioxidant, antiproliferative, immuno-stimulating, anticoagulant, antibacterial and antiviral. This makes ulvans may find many applications in medicine and in the pharmaceutical industry as medicinal products for the treatment of cancer, thrombosis, atherosclerosis and other diseases, as well as in cosmetic industry as moisturizing, anti-aging and regenerating agents, and emulsion stabilizers.

Keywords: ulvans, sulfated polysaccharides, green algae, biological activity

