Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):59-67

Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Organic Extracts from Three Species of Green Macroalgae of Ulvaceae from Persian Gulf

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Zarei Jeliani Z.[1] *MSc*,
Mashjoor S.[1] *MSc*,
Soleimani S.[1] *MSc*,
Pirian K.[2] *PhD*,
Sedaghat F.[1] *MSc*,
Yosefzadi M.* *PhD*

How to cite this article
Zarei Jeliani Z, Mashjoor S, Soleimani S, Pirian K, Sedaghat F, Yosefzadi M. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Organic Extracts from Three Species of Green Macroalgae of Ulvaceae from Persian Gulf. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1): 59-67.

*Marine Biology Department, Marine Science and Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
[1]Marine Biology Department, Marine Science and Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
[2]Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Correspondence
Address: Hormozgan University, Kilometer 9 of Minab Road, Bandar Abbas, Iran. Postal Code: 791619345
Phone: +98 (76) 33711025
Fax: +98 (76) 33711025
morteza110110@gmail.com

Article History
Received: April 5, 2016
Accepted: June 25, 2017
ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims Marine macroalgae are diverse organisms with adaptation for live in stressful environments. The aim of this study was to investigate the biological activities of organic extract; n-Hexane (nH), ethylacetate (E) and methanol (M) of three green alga from family Ulvaceae, *Ulva clathrata, Ulva linza and Ulva intestinalis*, collected from the coast of Bandar Abbas.

Materials & Methods In this experimental study, for identification the superior species, the tested activities included antioxidant assay at gradient concentrations by ferric reducing power assay, total antioxidant capacity, total phenolic content, and brine shrimp cytotoxicity activity of these extracts on model organism, *Artemia salina*. Data analysis was performed by one-way analysis of variance and Duncan's multiple tests at 5% probability level using SPSS 21 software and drawing charts using Excel 2013 software.

Findings The more effective algal extracts by maximum antioxidant capacity, were recorded for M extracts of U.intestinalis, E and M extracts of U.linza and U.clathrata. The algal extract exhibited a higher antioxidant activity in comparing to ascorbic acid (as a standard) with significant differences between the extract in different concentrations ($p \leq 0.05$). The result showed the highest content of total phenol were recorded for the M extracts of U.linza and U.clathrata which confirmed the findings of other researchers that the increase in free radical scavenging activity of natural extracts is associated with the content of phenolic compounds. The highest brine shrimp cytotoxicity activity was recorded for the nH extracts of U. linza (LC50= 300.78 mg/ml). According to the results, in general, U.linza can be introduced as a priority species for biological properties and in further studies.

Conclusion Three green alga from family Ulvaceae, *Ulva clathrata, Ulva linza and Ulva intestinalis*, have antioxidant and cytotoxic activity. U.linza due to the high amount of phenol and high antioxidant power can be introduced as a priority species for biological properties.

Keywords Antioxidants; Phenol; Artemia; Ulva

CITATION LINKS

[1] In vitro antioxidant properties and FTIR analysis ... [2] Chemical characterization and antioxidant ... [3] Biological activities of selected marine ... [4] Dietary fibre and physicochemical properties ... [5] Seaweeds: A sustainable functional food for ... [6] Antioxidant properties of ... [7] Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human ... [8] Revaccination with Fendrix® or HBVaxPro® results in better response ... [9] Bioprotective properties of seaweeds: In vitro ... [10] Phlorotannins, brown algal ... [11] An assessment of the ... [12] Toxicity of sewage sludge to Crangon ... [13] Cyanobacterial cytotoxicity versus ... [14] Marine algae of the Arabian gulf coast of ... [15] Diversity of the seaweed flora of the ... [16] Checklist of the marine macroalgae ... [17] The marine algae of the southern coast of ... [18] The checklist of green algae of the Iranian coastal ... [19] Cytotoxic terpenoids from Satureja ... [20] Naphthaquinone pigments in psammechinus ... [21] Antioxidation action of indole ... [22] Extraction of bioactive ... [23] Colorimetry of total phenolics with ... [24] The use of Artemia nauplii for ... [25] Natural products: The secondary ... [26] Natural products from marine ... [27] Bioactive compounds in seaweed: Functional food ... [28] Anticancer compounds from marine macroalgae and their application ... [29] Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine ... [30] Antioxidant activities in vitro of ethanol extract ... [31] Total antioxidant capacity ... [32] Phenolic antioxidants of some ... [33] Antioxidant activity of extracts of the ... [34] Antioxidant activity, total ... [35] In vitro antioxidant properties and ... [36] Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine ... [37] Seasonal variation in bromophenol ... [38] Antioxidant properties of some ... [39] Phenolic antioxidants of some ... [40] Evaluation of marine ... [41] Potential anti-cancer and ... [42] Cytotoxic activity of marine ... [43] Biopotentials of Ulva fasciata ... [44] Evaluation of macroalgae ... [45] Larvicidal activity against ... [46] In vitro cytotoxicicity ...

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی عصاره‌های آلی حاصل از سه گونه ماکروجلبک سبز از خانواده Ulvaceae از خلیج فارس

زهرا زارعی‌جلیانی MSc
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
سکینه مشجور MSc
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
سولماز سلیمانی MSc
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
کیانا پیریان PhD
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
فاطمه صداقت MSc
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
مرتضی یوسف‌زادی* PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده
اهداف: ماکروجلبک‌های دریایی، ارگانیزم‌های متنوع با سازگاری زیست در محیط‌های پراسترس هستند. هدف مطالعه حاضر ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی عصاره‌های حاصل از سه گونه ماکروجلبك سبز اولواسه شامل *اولوا اینتستینالیس*، *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* از سواحل بندرعباس بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، به‌منظور ارزیابی خواص زیستی، از یک گرادیان غلظتی با روش‌های سنجش قدرت احیاکنندگی آهن، ظرفیت ضداکسیدانی کل، تعیین ترکیبات فنلی و نیز سنجش سمیت سلولی این عصاره‌ها بر مدل ارگانیزمی، میگوی آب شور *آرتمیا سالینا* استفاده شد، تحلیل داده‌ها به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵% توسط نرم‌افزار آماری SPSS 21 و رسم نمودار با نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد.
یافته‌ها: افزایش قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها از روندی وابسته به افزایش غلظت عصاره ماکروجلبکی تبعیت کرد. عصاره متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* و اتیل‌استاتی و متانولی گونه *اولوا لینزا* و گونه *اولوا کلاتراتا* دارای بیشترین فعالیت احیاکنندگی آهن و ظرفیت ضداکسیدانی کل، که در مقایسه با آسکوربیک‌اسید (استاندارد)، فعالیت بالاتری داشتند، بین غلظت‌های مختلف عصاره‌ها نیز اختلاف معنی‌دار بود ($p\leq۰/۰۵$). بیشترین محتوای ترکیبات فنلی در عصاره‌های متانولی ماکروجلبک‌های گونه *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* مشاهده شد. عصاره اِن‌هگزانی گونه *اولوا لینزا* بیشترین تاثیر را بر ناپلیوس میگوی آب شور نشان داد.
نتیجه‌گیری: سه گونه ماکروجلبك سبز شامل *اولوا اینتستینالیس*، *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* خواص ضداکسیدانی و سمیت سلولی دارند، ماکروجلبک گونه *اولوا لینزا* به‌دلیل دارابودن مقادیر زیادی فنل و قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا، می‌تواند به‌عنوان گونه‌ای با ارجحیت خواص زیستی معرفی شود.
کلیدواژه‌ها: ضداکسیدان‌ها، فنل، آرتمیا، اولوا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۵
*نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه
قرن‌هاست به‌طور سنتی ماکروجلبک‌ها به‌صورت تازه و خشک، به‌عنوان مکمل‌های غذایی و نیز برای مقاصد مختلف دارویی استفاده می‌شوند[1]. در ارتباط با علوم دارویی از دیرباز ماکروجلبک‌ها به‌عنوان عوامل چسباننده و ژله‌ایی‌کننده در صنایع غذایی- دارویی به کار می‌روند، اما امروزه حصول دانش و آگاهی در مورد ترکیبات زیست‌فعال گوناگون آنها، فرصت‌های تازه‌ای برای بهره‌برداری‌های بیشتر گشوده است[2]، زیرا این ماکروجلبک‌های دریایی، ترکیبات بسیار متنوعی تولید می‌کنند که فعالیت زیستی و پتانسیل ارزشمند دارویی دارند[3].

ماکروجلبک‌های خوراکی از نظر دارابودن ترکیبات فعال زیستی، ضداکسیدانی، فیبرهای محلول، پروتئین‌ها، عناصر معدنی، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب غیراشباع غنی هستند[4]. ماکروجلبک‌های قرمز، قهوه‌ای و سبز، دارای خواص درمانی بسیاری مانند خواص ضدسرطانی، ضددیابتی، ضدفشار خون، ضداکسیدانی، ضدانعقاد، ضدفساد، ضدقارچی و ضدباکتری هستند و همچنین توانایی معالجه بافت آسیب‌دیده موجود زنده را دارند. در این میان ترکیبات فعالی مانند پلی‌ساکاریدهای سولفاته، فلوروتانین‌ها، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی مانند فوکوزانتین و آستازانتین، استرول‌ها، پپتیدها و فسفولیپیدها، در مقابله با بیماری‌های متابولیک مخرب، اثرات درمانی سودمندی را نشان داده‌اند[5]. با توجه به فعالیت‌های زیستی ارزشمند و پتانسیل‌های دارویی و عصاره‌های ماکروجلبک‌ها، تمایل به انجام تحقیقات در رابطه با تولید عوامل ضداکسیدانت ایمن و طبیعی از ماکروجلبک‌های دریایی رو به توسعه است.

در بسیاری از ارگانیزم‌ها اکسیداسیون به‌منظور تولید انرژی برای فرآیندهای زیستی ضروری است، اما به‌واسطه این عمل رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز تولید می‌شوند که خود در وهله اول عامل بروز بسیاری از بیماری‌ها محسوب می‌شوند[6]. شواهد نشان می‌دهد که تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن با توان واکنشی بالا (گونه‌های فعال اکسیژن)، در سیستم‌های زیستی عامل بروز آسیب‌های استرس اکسیداتیو، از جمله پیری، ورم مفاصل، سرطان، التهاب و بیماری‌های مزمن انسانی مانند بیماری‌های قلبی- عروقی و تخریب یاخته‌های عصبی است[7]. از این رو ایجاد تعادل بین اکسیدان‌ها و ضداکسیدان‌ها در سلول تضمین‌کننده سلامتی است[8]. در حال حاضر استفاده از انواع داروهای شیمیایی، به‌علت عوارض جانبی آنها تا حدودی محدود شده و با توجه به ضرورت ایمنی و جایگزینی ضداکسیدانت‌های مصنوعی با نمونه‌های استحصال‌شده از طبیعت و نیز پیشرفت‌های شایان توجه در بهره‌گیری از ترکیبات جلبکی در درمان سلول‌های سرطانی موش، علاقه‌مندی محققان به‌منظور تولید ضداکسیدانت از خاستگاه طبیعی افزایش یافته است[9].

در راس بسیاری از ضداکسیدانت‌های طبیعی دریایی، انواع بسیار زیادی از نمونه‌های مشتق‌شده از ماکروجلبک‌های دریایی قرار دارد که شامل طیف وسیعی از ترکیبات زیست‌فعال با پتانسیل فعالیت ضداکسیدانی از جمله ترکیبات پلی‌فنلیک است[10]. مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌فنل‌های مشتق‌شده از ماکروجلبک‌ها، قوی‌تر از پلی‌فنل‌های مشابه به‌دست‌آمده از دیگر منابع گیاهی خشکی است که این امر، احتمالاً به‌علت حضور بیش از ۸ حلقه فنلی به‌هم‌متصل در آنها است[11]. در هر صورت در تقابل با مطالعاتی که در مورد گیاهان خشکی انجام شده، تحقیقات اندکی به‌منظور دستیابی به پتانسیل‌های ضداکسیدانی ماکروجلبک‌های دریایی صورت گرفته است که در این میان ارگانیزم‌های مدلی مانند میگوی آب شور (*Artemia salina*) و انواع دافنی (*Daphnia* sp) برای ارزیابی اولیه فعالیت سمیت سلولی عصاره‌های گیاهی، پایلوت مناسبی محسوب می‌شوند، زیرا برخی از این مطالعات بین اثرات سمیت بر میگوی آب شور و سمیت سلولی در مقابل رده‌های

سلولی سرطانی، همبستگی و ارتباط مثبتی را نشان داده‌اند[12]. بر این اساس آزمون میگوی آب شور، عموماً به‌عنوان یک شاخص تعیین سمیت سلولی کم‌هزینه و در دسترس، جایگزین آزمون رده‌های سلولی سرطانی شده و به ابزاری برای جداسازی ترکیبات زیست‌فعال از عصاره‌های گیاهی مختلف تبدیل شده است[13].

خطوط ساحلی بندرعباس، منابع عظیمی از ماکروجلبک‌های دریایی با گستره وسیع و متنوع دارد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی عصاره‌های حاصل از سه گونه ماکروجلبک سبز اولواسه شامل *اولوا اینتستینالیس* (*Ulva intestinalis*)، *اولوا کلاتراتا* (*Ulva clathrata*) و *اولوا لینزا* (*Ulva linza*) از سواحل بندرعباس انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر عملیات نمونه‌برداری ماکروجلبک‌های سبز از ساحل سور و بندرعباس (با مختصات جغرافیایی ۲۷درجه و ۹۸دقیقه عرض شمالی و ۵۶درجه ۱۳دقیقه طول جنوبی (برگرفته از www.mobilegeographics.com) در اواخر پاییز ۱۳۹۴، هنگام بیشینه جزر صورت گرفت. ماکروجلبک‌های جمع‌آوری‌شده از آب دریا، در خود محیط ابتدا برای زدودن شن، ماسه و جانداران اپی‌فیت شسته و سپس درون کیسه‌های پلاستیکی برچسب‌دار، درون جعبه یونولیتی حاوی یخ، سریعاً به آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه هرمزگان منتقل شدند. در آزمایشگاه ماکروجلبک‌ها دوباره با آب معمولی و نهایتاً با آب‌مقطر شسته و سپس به‌منظور خشک‌شدن روی پارچه تمیزی در سایه قرار داده شدند.

شناسایی نمونه: هر یک از نمونه‌ها با کلیدهای شناسایی معتبر[14-16]، اطلس و چک‌لیست‌های موجود از ماکروجلبک‌های منطقه خلیج فارس[17, 18]، جست‌وجو در پایگاه علمی بانک جلبک (AlgaeBase) و نیز براساس خصوصیات مورفولوژیک تا سطح گونه شناسایی شدند. برای بررسی خصوصیات مورفولوژیک نمونه‌ها از فتومیکروسکوپ المپیوس مدل CX 21 (المپیوس؛ ژاپن) و فتواستریومیکروسکوپ مدل SQF 301 (Axiom؛ ایالات متحده) استفاده شد.

عصاره‌گیری: نمونه‌های ماکروجلبکی پس از خشک‌شدن، به‌وسیله دستگاه آسیاب برقی کاملاً به‌صورت پودر درآمدند، سپس با استفاده از سه حلال ان‌هگزان، اتیل‌استات و متانول (۶۰۰میلی‌لیتر حلال و ۱۰۰گرم ماکروجلبک پودرشده) و به‌ترتیب افزایش قطبیت هر کدام به‌مدت ۴۸ساعت عصاره‌گیری شدند. عصاره‌ها در دستگاه روتاری (Strike102؛ ایتالیا) در دمای ۳۷ تا ۴۰°C و در شرایط خلا تغلیظ شدند. عصاره‌های غلیظ‌شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند و به‌منظور غلظت‌سازی از حلال دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) استفاده شد. لازم به ذکر است که تمام مراحل عصاره‌گیری در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) انجام پذیرفت تا طیفی از ترکیبات با درجه قطبیت متفاوت حاصل شود[19].

بررسی خواص ضداکسیدانی با ارزیابی قدرت احیاکنندگی آهن (FRP): این آزمایش بر مبنای توان احیایی کلریدآهن III (سه‌ظرفیتی) به کلریدآهن II (دوظرفیتی) به‌وسیله عصاره‌ها، طبق روش *یوشیدا* انجام شد. در این روش گرایش رنگ زرد به سبز یا آبی تیره مبنای سنجش است. برای این منظور، ۰/۵میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۶، ۳، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۳۶، ۰/۱۸ و ۰/۰۹میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱/ ۰مولار، pH=۶/۶) و ۱/۲۵ میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم (۱%) مخلوط شد، سپس به‌مدت ۲۰دقیقه در حمام آب (WiseBath؛ کره جنوبی) با دمای ۵۰°C قرار گرفت. پس از آن ۲/۵میلی‌لیتر از محلول برداشته و به آن ۱/۲۵میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (۱۰%) و ۱/۲۵میلی‌لیتر آب‌مقطر و در نهایت ۰/۲۵میلی‌لیتر کلرورفریک (۰/۱%) اضافه شد. بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Alpha؛ کره جنوبی) خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به‌معنی افزایش قدرت احیاکنندگی است. آب‌مقطر به‌عنوان بلانک و آسکوربیک‌اسید نیز به‌عنوان استاندارد استفاده شد[20].

ارزیابی ظرفیت ضداکسیدانی کل (TAC): ظرفیت ضداکسیدانی کل عصاره‌ها طبق روش *میتسودا* و همکاران تعیین شد. در این روش برای تهیه محلول ظرفیت ضداکسیدانی کل (TAC) به‌عنوان معرف، ۷/۴۵میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید ۰/۶مولار، ۰/۹۹گرم سولفات‌سدیم و ۱/۲۳گرم آمونیوم‌مولیبدات را مخلوط و با آب‌مقطر به حجم ۲۵۰میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۱میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۶، ۳، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۳۶، ۰/۱۸، ۰/۰۹میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱میلی‌لیتر از معرف مخلوط و پس از ورتکس، ۱۵دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) قرار گرفت و در ادامه جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵نانومتر خوانده شد. افزایش جذب نمونه‌ها به‌معنی افزایش ظرفیت ضداکسیدانی است. آب‌مقطر به عنوان بلانک و آسکوربیک‌اسید نیز به‌عنوان استاندارد استفاده شد[21].

اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی عصاره‌ها: از آنجایی که ترکیبات فنلی، ترکیباتی قطبی هستند و حلالیت این ترکیبات در حلال‌های قطبی نیز بیشتر است[22]، میزان کل ترکیبات فنلی، در عصاره‌های متانولی ماکروجلبک‌ها محاسبه می‌شود. برای این منظور، کل ترکیبات فنلی عصاره‌ها با روش فولین‌سیوکالتو و طبق متد *سینگلتون* و *جوزف* با اندکی تغییر، اندازه‌گیری شد. روش فولین‌سیوکالتو از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی است. اساس کار در این روش، احیای معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی‌رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۵نانومتر نشان می‌دهد.

در این آزمایش، ابتدا غلظت‌های مختلفی از اسیدگالیک (۰/۹، ۰/۰۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان استاندارد تهیه و سپس به‌طور خلاصه، ۰/۱۵میلی‌لیتر از غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها را با ۰/۷۵میلی‌لیتر فولین‌سیوکالتو (۱ به ۱۰ رقیق‌شده با آب‌مقطر) مخلوط شد. بعد از گذشت ۳دقیقه، ۰/۶میلی‌لیتر محلول سدیم‌کربنات (۷/۵%) به آنها اضافه و نمونه‌ها ورتکس شدند سپس به‌مدت ۶۰دقیقه (۳۰دقیقه برای استاندارد به‌دلیل قوی‌بودن) در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) و در تاریکی قرار گرفتند. در ادامه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵نانومتر خوانده شد[23].

میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره طبق فرمول $C = \frac{c.v}{m'}$ محاسبه و به‌صورت میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک عنوان شد، مطابق این فرمول C میزان کل ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم بر گرم موجود در عصاره را نشان می‌دهد، c غلظت معادل اسیدگالیک (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که از منحنی استاندارد به‌دست می‌آید، v حجمی از عصاره بر حسب میلی‌لیتر که با آن آزمایش صورت گرفته و m′- میزان عصاره به‌دست آمده از یک گرم بافت است[23].

ارزیابی فعالیت سمیت سلولی با استفاده از آزمون کشندگی لارو میگوی آب شور (BSA): در این روش از سیست میگوی آب شور گونه‌ای از سخت‌پوستان آبزی از شاخه بندپایان، استفاده می شود. در ابتدا به منظور آماده‌سازی میگوی آب شور ابتدا یک گرم از سیست خشک آرتمیا به‌مدت یک ساعت در ۳۰سی‌سی آب لوله‌کشی هیدراته شد. سپس سیست‌های هیدراته با کاغذ صافی از آب جدا و به ظرف استوانه‌ای شکل حاوی ۵۰۰سی‌سی آب دریای مصنوعی با شوری ۳۵ppm و دمای$30\pm1^{\circ}C$ منتقل شدند. ظرف حاوی آب دریا و سیست به‌مدت ۲۸ساعت هوادهی و نوردهی (نورفلورسنت با شدت $100 mE/m^2/s$) شده و پس از ۲۸ساعت سیست‌ها هچ شدند. در این مرحله هوادهی و نوردهی قطع و با استفاده از نورگرایی نقطه‌ایی، لاروهای تازه تفریخ‌شده در مرحله ناپلیوس (نخستین مرحله لاروی) از سیست‌ها جدا و به ظرف جداگانه‌ای منتقل شدند[24].

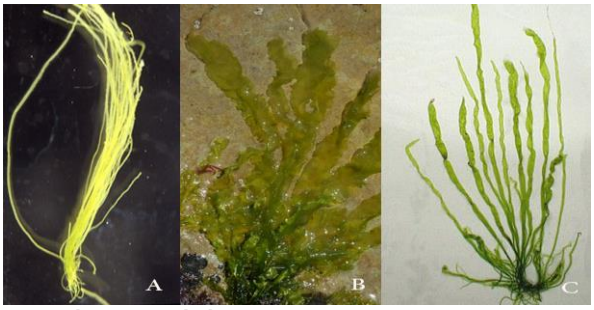
سپس آزمون سمیت روی لارو میگوی آب شور انجام شد، ارزیابی سمیت عصاره‌ها روی *آرتمیا سالینا* طبق روش *سورگلوس* و همکاران، با اندکی تغییر انجام شد. در این روش ابتدا محلول‌های استوک عصاره‌های ماکروجلبکی در دی‌متیل‌سولفوکساید آماده و سپس غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شدند. این آزمون درون میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ایی صورت گرفت، به این ترتیب که در هر چاهک، از هر غلظت ۱۰۰میکرولیتر ریخته شد و در نهایت حجم هر چاهک به کمک آب دریای محتوی لارو تازه هچ‌شده آرتمیا به یک میلی‌لیتر افزایش یافت. به‌دلیل سمی‌بودن دی‌متیل سولفوکساید، ۱۰۰میکرولیتر از آن نیز در چاهک تعبیه‌شده به‌منظور کنترل ریخته شد. در آخر، میکروپلیت‌ها به‌مدت ۲۴ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند و پس از آن تعداد آرتمیای زنده و تعداد کل آنها در هر چاهک شمارش شد[24]. محاسبه درصد سمیت با کمک فرمول زیر صورت گرفت:

$$\text{درصد سمیت} = \left[\frac{\text{تعداد لارو در زنده در آرتمیا} - \text{تعداد لارو زنده در کنترل}}{\text{تعداد لارو زنده در کنترل}}\right] * 100$$

آنالیز آماری: چگونگی همسان‌بودن پراش و پیروی داده‌ها از توزیع طبیعی توسط آزمون شاپیرویلک بررسی شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و همچنین مقایسه میانگین به‌روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵% توسط نرم‌افزار آماری SPSS 21 انجام شد. همچنین رسم نمودار با نرم‌افزار Excel 2013 صورت گرفت.

یافته‌ها

سه ماکروجلبک مورد مطالعه *اولوا اینتستینالیس*، *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* تشخیص داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱) ماکروجلبک‌های مورد مطالعه، A) *U.clathrata*، B) *U.linza*، C) *U.intestinalis*

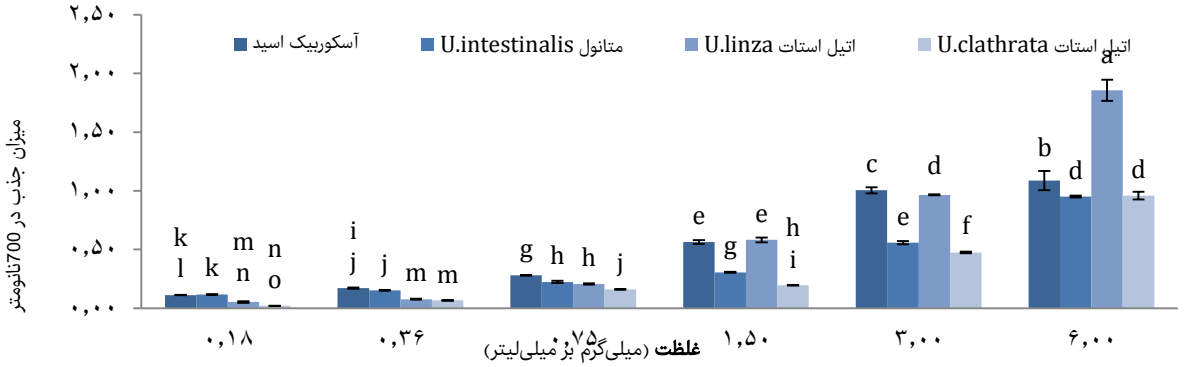
افزایش قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها از روندی وابسته به افزایش غلظت عصاره ماکروجلبکی تبعیت کرد (جدول ۱)، به‌نحوی که عصاره متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* و عصاره اتیل‌استاتی و متانولی *اولوا لینزا* و نیز عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا کلاتراتا* دارای قوی‌ترین قدرت احیاکنندگی بودند (نمودار ۱).

عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا*، از عصاره متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* و عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا کلاتراتا*، همچنین آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد (البته با غلظت‌سازی نهایی معادل یک‌سوم غلظت عصاره‌ها)، فعالیت احیاکنندگی بیشتری داشت. در حالی که، کمترین میزان قدرت احیاکنندگی در عصاره ان‌هگزانی گونه *اولوا اینتستینالیس* مشاهده شد، عصاره متانولی گونه *اولوا لینزا* (۱/۶۶۹±۰/۰۲۶)، از دیگر عصاره‌های ماکروجلبک‌های تحت مطالعه و همچنین آسکوربیک‌اسید (۱/۰۸۷±۰/۰۸۲) به‌عنوان استاندارد (البته رقیق‌شده در غلظت نهایی یک‌سوم غلظت عصاره‌ها) فعالیت احیاکنندگی بیشتری داشت (نمودار ۱).

جدول ۱) میانگین آماری توانایی احیای یون کلرید آهن در غلظت‌های مختلف عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز دریایی مورد مطالعه

گونه جلبک/عصاره	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)					
	۰/۱۸	۰/۳۶	۰/۷۵	۱/۵	۳	۶
اینتستینالیس						
آسکوربیک‌اسید	۰/۰۱۱±۰/۰۰۱^{kl}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۵^{i}	۰/۲۷۹±۰/۰۰۲^{g}	۰/۵۶۳±۰/۰۱۵^{e}	۱/۰۰۴±۰/۰۲۵^{b}	۱/۰۸۷±۰/۰۸۲^{a}
متانول+ماکروجلبک	۰/۱۱۷±۰/۰۰۲^{k}	۰/۱۵۱±۰/۰۰۳^{ij}	۰/۲۲۳±۰/۰۰۹^{h}	۰/۳۰۵±۰/۰۰۴^{fg}	۰/۵۵۷±۰/۰۱۳^{e}	۰/۹۵۰±۰/۰۰۹^{c}
اتیل‌استات+ماکروجلبک	۰^{o}	۰/۰۰۹±۰/۰۰۶^{no}	۰/۰۲۴±۰/۰۰۱^{no}	۰/۱۳۵±۰/۰۰۵^{jk}	۰/۳۱۲±۰/۰۰۹^{f}	۰/۹۹۳±۰/۰۱۳^{b}
ان‌هگزان+ماکروجلبک	۰/۰۲۹±۰/۰۰۳^{no}	۰/۰۳۹±۰/۰۰۴^{n}	۰/۰۷۶±۰/۰۰۳^{m}	۰/۱۱۷±۰/۰۰۲^{k}	۰/۳۱۵±۰/۰۰۵^{f}	۰/۶۳۷±۰/۰۲۵^{d}
لینزا						
آسکوربیک‌اسید	۰/۰۱۱±۰/۰۰۱^{ij}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۵^{gh}	۰/۲۷۹±۰/۰۰۲^{f}	۰/۵۶۳±۰/۰۱۵^{e}	۱/۰۰۴±۰/۰۲۵^{d}	۱/۰۸۷±۰/۰۸۲^{c}
متانول+ماکروجلبک	۰/۰۵۱±۰/۰۰۱^{klm}	۰/۰۷۴±۰/۰۰۱^{jkl}	۰/۱۳۳±۰/۰۰۷^{hi}	۰/۲۱۱±۰/۰۰۳^{g}	۰/۵۷۰±۰/۰۱۷^{e}	۱/۶۶۹±۰/۰۲۶^{b}
اتیل‌استات+ماکروجلبک	۰/۰۵۲±۰/۰۰۷^{klm}	۰/۰۷۶±۰/۰۰۴^{jkl}	۰/۲۰۷±۰/۰۰۵^{g}	۰/۵۸۱±۰/۰۲۰^{e}	۰/۹۶۵±۰/۰۰۵^{d}	۰/۸۵۶±۰/۰۲۵^{a}
ان‌هگزان+ماکروجلبک	۰/۰۲۵±۰/۰۰۱^{lm}	۰/۰۴۸±۰/۰۰۱^{klm}	۰/۱۰۵±۰/۰۰۱^{ij}	۰/۲۸۱±۰/۰۱۲^{f}	۰/۵۶۳±۰/۰۱۵^{e}	۱/۰۷۷±۰/۰۷۱^{c}
کلاتراتا						
آسکوربیک‌اسید	۰/۰۱۱±۰/۰۰۱^{l}	۰/۰۱۷±۰/۰۰۵^{ijk}	۰/۲۷۹±۰/۰۰۲^{h}	۰/۵۶۳±۰/۰۱۵^{e}	۱/۰۰۴±۰/۰۲۵^{b}	۱/۰۸۷±۰/۰۸۲^{a}
متانول+ماکروجلبک	۰/۰۸۷±۰/۰۰۲^{lm}	۰/۱۱۴±۰/۰۰۶^{l}	۰/۱۵۲±۰/۰۰۳^{k}	۰/۲۰۲±۰/۰۰۷^{i}	۰/۳۴۵±۰/۰۰۴^{g}	۰/۷۸۵±۰/۰۰۹^{d}
اتیل‌استات+ماکروجلبک	۰/۰۱۹±۰/۰۰۱^{op}	۰/۰۶۵۰±۰/۰۰۰۵^{mn}	۰/۱۶۰±۰/۰۰۲^{jk}	۰/۱۹۴±۰/۰۰۲^{i}	۰/۴۷۴±۰/۰۰۶^{f}	۰/۹۵۹±۰/۰۳۱^{c}
ان‌هگزان+ماکروجلبک	۰/۰۱۷±۰/۰۰۲^{op}	۰/۰۳۶±۰/۰۰۲^{no}	۰/۰۸۶±۰/۰۰۲^{lm}	۰/۱۸۹±۰/۰۰۸^{ij}	۰/۴۵۲±۰/۰۰۷^{f}	۰/۸۰۸±۰/۰۰۴^{d}

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.



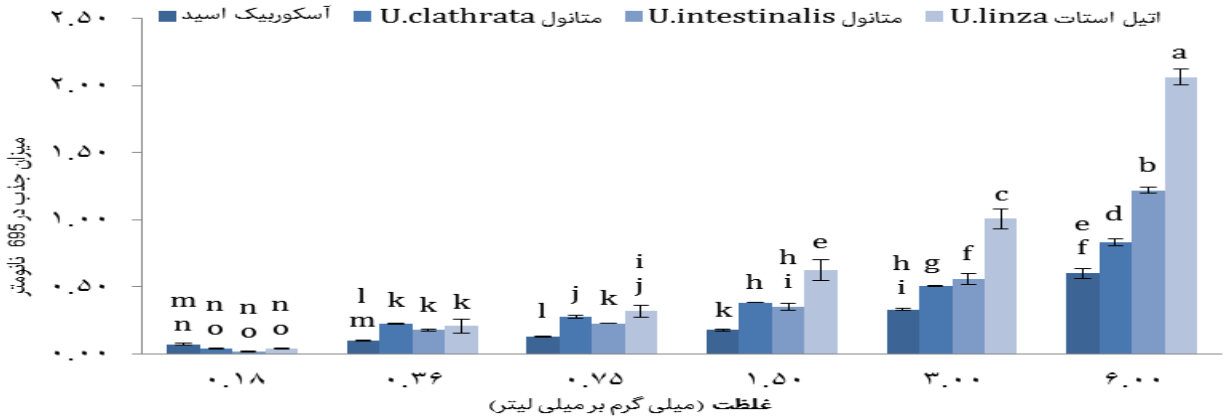
نمودار ۱) قدرت احیایی قوی‌ترین عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز دریایی مورد مطالعه، در مقایسه با آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).
در غلظت‌های بالا، عصاره اتیل‌استاتی *U.linza* دارای بیشترین قدرت احیاکنندگی بود.
حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

در غلظت ۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین قدرت احیاکنندگی مربوط به عصاره اتیل‌استاتی *اولوا لینزا* و پس از آن آسکوربیک‌اسید بوده و عصاره‌های اتیل‌استاتی گونه *اولوا کلاترانا*، متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* در غلظت ۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نیز عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا* در غلظت ۳میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان یکسانی از قدرت احیاکنندگی را داشتند (نمودار ۱).
اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های ماکروجلبک‌ها در غلظت‌های مختلف مورد آزمایش مشاهده شد ($p \leq ۰/۰۵$؛ نمودار ۱).

جدول ۲) میزان ظرفیت ضداکسیدانی کل عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز دریایی مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

گونه/ عصاره	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)					
	۰/۱۸	۰/۳۶	۰/۷۵	۱/۵	۳	۶
اینتستینالیس						
آسکوربیک‌اسید	۰/۰۷۰±۰/۰۰۷^{j}	۰/۱۰۱±۰/۰۰۳^{i}	۰/۱۲۸±۰/۰۰۲^{h}	۰/۱۷۸±۰/۰۰۷^{g}	۰/۳۳۲±۰/۰۰۹^{e}	۰/۶۰۰±۰/۰۳۶^{b}
متانول+ماکروجلبک	۰/۰۱۹±۰/۰۰۳^{k}	۰/۰۱۹±۰/۰۰۶^{k}	۰/۲۲۸±۰/۰۰۲^{f}	۰/۳۵۱±۰/۰۲۷^{e}	۰/۵۵۷±۰/۰۰۴^{c}	۱/۲۲۰±۰/۰۲۰^{a}
اتیل‌استات+ماکروجلبک	۰/۰۱۰±۰/۰۰۱^{k}	۰/۰۵۹±۰/۰۰۱^{j}	۰/۰۷۵±۰/۰۰۷^{j}	۰/۱۰۲±۰/۰۰۷^{i}	۰/۱۵۷±۰/۰۰۶^{g}	۰/۳۴۲±۰/۰۰۶^{e}
ان‌هگزان+ماکروجلبک	۰/۰۱۶±۰/۰۰۲^{k}	۰/۰۱۸±	۰/۰۳۳±۰/۰۰۱^{k}	۰/۰۶۸±۰/۰۰۷^{j}	۰/۱۶۸±۰/۰۰۲^{g}	۰/۴۳۳±۰/۰۳۲^{d}
لینزا						
آسکوربیک‌اسید	۰/۰۷۰±۰/۰۰۷^{gh}	۰/۱۰۱±۰/۰۰۳^{fg}	۰/۱۲۸±۰/۰۰۲^{f}	۰/۱۷۸±۰/۰۰۷^{e}	۰/۳۳۲±۰/۰۰۹^{d}	۰/۶۰۰±۰/۰۳۶^{c}
متانول+ماکروجلبک	۰^{i}	۰^{i}	۰^{i}	۰/۰۰۳±۰/۰۰۱^{i}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱^{i}	۰/۰۵۰±۰/۰۱۵^{hi}
اتیل‌استات+ماکروجلبک	۰/۰۴۰±۰/۰۰۴^{hi}	۰/۲۰۷±۰/۰۵۰^{e}	۰/۳۱۷±۰/۰۴۵^{e}	۰/۶۲۷±۰/۰۷۷^{c}	۱/۰۰۷±۰/۰۷۰^{b}	۲/۰۶۵±۰/۰۵۸^{a}
ان‌هگزان+ماکروجلبک	۰^{i}	۰^{i}	۰^{i}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱^{i}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱^{i}	۰/۰۲۹±۰/۰۰۴^{hi}
کلاترانا						
آسکوربیک‌اسید	۰/۰۷۰±۰/۰۰۷^{kl}	۰/۱۰۱±۰/۰۰۳^{jk}	۰/۱۲۸±۰/۰۰۲^{j}	۰/۱۷۸±۰/۰۰۷^{i}	۰/۳۳۲±۰/۰۰۹^{e}	۰/۶۰۰±۰/۰۳۶^{b}
متانول+ماکروجلبک	۰/۰۴۰±۰/۰۰۵^{lm}	۰/۲۲۶±۰/۰۰۴^{h}	۰/۲۷۸±۰/۰۰۹^{fg}	۰/۳۸۳±۰/۰۰۲^{d}	۰/۵۰۸±۰/۰۰۲^{c}	۰/۸۳۰±۰/۰۲۶^{a}
اتیل‌استات+ماکروجلبک	۰/۰۱۲±۰/۰۰۲^{m}	۰/۱۲۶±۰/۰۱۳^{j}	۰/۱۷۱±۰/۰۰۴^{i}	۰/۳۷۹±۰/۰۲۰^{d}	۰/۴۷۵±۰/۰۱۵^{c}	۰/۸۴۸±۰/۰۷۷^{a}
ان‌هگزان+ماکروجلبک	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱^{m}	۰/۱۲۲±۰/۰۱۶^{j}	۰/۱۳۷±۰/۰۰۵^{ij}	۰/۲۵۰±۰/۰۰۹^{gh}	۰/۲۹۹±۰/۰۴۳^{ef}	۰/۶۰۸±۰/۰۷۰^{b}

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.



نمودار ۲) میزان ظرفیت ضداکسیدانی کل، قوی‌ترین عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز دریایی در مقایسه با آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
تقریباً در تمامی غلظت‌ها عصاره اتیل‌استاتی *U.linza* بیشترین و قابل توجه‌ترین ظرفیت ضداکسیدانی کل را داشت.
حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

افزایش ظرفیت ضداکسیدانی کل، در عصاره‌ها از روندی وابسته به افزایش غلظت عصاره ماکروجلبکی تبعیت کرد (جدول ۲؛ نمودار ۲)، به‌نحوی که عصاره‌های متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* و گونه *اولوا کلاتراتا* و عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا* دارای بیشترین میزان ظرفیت ضداکسیدانی کل بودند که در هر سه مورد این میزان در مقایسه با آسکوربیک‌اسید به‌عنوان استاندارد، بالاتر بود. بیشترین ظرفیت ضداکسیدانی در همه غلظت‌های موجود متعلق به عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا* بود (جدول ۲)، اما در بالاترین غلظت از عصاره ماکروجلبکی (۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا* (۲/۰۶۵±۰/۰۵۸) و پس از آن عصاره متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* (۱/۲۲۰±۰/۰۲۰)، از دیگر عصاره‌های ماکروجلبک‌های تحت مطالعه و همچنین از استاندارد آسکوربیک‌اسید (۰/۶۰۰±۰/۰۳۶)، ظرفیت ضداکسیدانی بیشتری داشته‌اند و کمترین میزان آن نیز به عصاره‌های متانولی و ان‌هگزانی گونه *اولوا لینزا* متعلق بود (نمودار ۲)، اما تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. هر چند میزان ظرفیت ضداکسیدانی کل عصاره‌های آلی در غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت ($p\leq۰/۰۵$).

بیشترین میزان ترکیبات فنلی متعلق به ماکروجلبک‌های گونه *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* بود و کمترین میزان آن در گونه *اولوا اینتستینالیس* مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳) میزان کل ترکیبات فنلی عصاره‌های متانولی ماکروجلبک‌های سبز دریایی

گونه	فنل کل (میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره)
کلاتراتا	۰/۷۰۰±۰/۰۰۶[a]
لینزا	۰/۷۰۰±۰/۰۰۶[a]
اینتستینالیس	۰/۴۰۰±۰/۰۲۴[b]

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

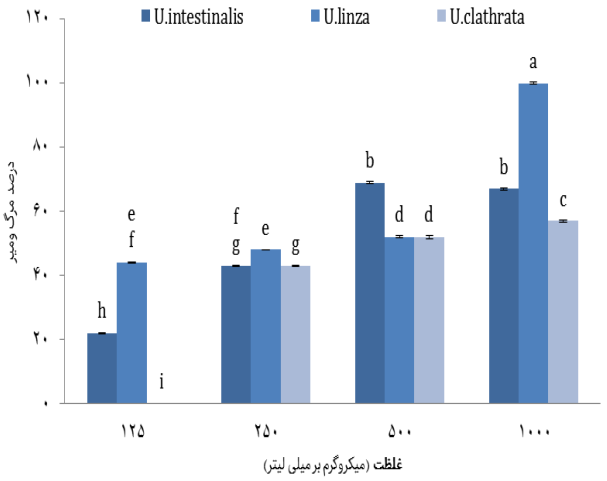
از بین عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز مورد مطالعه، عصاره‌های ان‌هگزانی گونه لینزا، اتیل‌استاتی گونه *اولوا اینتستینالیس* و *اولوا کلاتراتا* بیشترین اثرات سمیت بر لارو *آرتمیا سالینا* داشتند (جدول ۴؛ نمودار ۳).

جدول ۴) درصد کشندگی لارو آرتمیا توسط عصاره‌های مختلف ماکروجلبک‌های سبز مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

گونه/ عصاره	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)				
	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	LC_{50}
اینتستینالیس					
متانول	۳۴/۰۰±۰/۰۱[f]	۲۷/۰۰±۰/۰۱[g]	۶۰/۰۰±۰/۰۲[b]	۶۰/۰۰±۰/۰۱[b]	۶۰۰/۲۵
اتیل‌استات	۴۲/۰۰±۰/۰۲[e]	۲۴/۰۰±۰/۰۱[g]	۶۸/۰۰±۰/۰۲[a]	۶۷/۰۰±۰/۰۶[a]	۴۶۲/۱۵
ان‌هگزان	۱۳/۰۰±۰/۰۲[h]	۴۹/۰۰±۰/۰۱[d]	۳۲/۰۰±۰/۰۱[f]	۵۴/۰۰±۰/۰۱[c]	۸۷۰/۸۹
لینزا					
متانول	۸/۰۰±۰/۰۵[h]	۲۱/۰۰±۰/۰۶[g]	۵۸/۰۰±۰/۰۵[b]	۴۶/۰۰±۰/۰۸[de]	۸۶۶/۴۶
اتیل‌استات	۰/۰۳±۰/۰۱[i]	۰/۰۲±۰/۰۱[i]	۴/۰۰±۰/۰۵[i]	۲۸/۰۰±۰/۰۲[f]	>۱۰۰۰
ان‌هگزان	۵۱/۰۰±۰/۰۳[c]	۴۴/۰۰±۰/۰۳[e]	۴۶/۰۰±۰/۰۸[d]	۱۰۰/۰۰±۰/۰۲[a]	۳۰۰/۷۸
کلاتراتا					
متانول	۰/۰۴±۰/۰۱[g]	۰/۰۴±۰/۰۱[g]	۳/۰۰±۰/۰۱[f]	۲۵/۰۰±۰/۰۱[e]	>۱۰۰۰
اتیل‌استات	۲/۰۰±۰/۰۶[f]	۴/۰۰±۰/۰۵[f]	۴۱/۰۰±۰/۰۵[d]	۶۲/۰۰±۰/۰۶[a]	۷۸۱/۶۵
ان‌هگزان	۰/۰۱±۰/۰۰۱[g]	۵۴/۰۰±۰/۰۱[b]	۴۲/۰۰±۰/۰۲[d]	۵۰/۰۰±۰/۰۱[c]	۸۴۵/۲۷

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

عصاره ان‌هگزانی گونه *اولوا لینزا* بیشترین سمیت را در غلظت ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر داشت، حال آنکه کمترین اثرات سمیت در عصاره‌های متانولی گونه *اولوا کلاتراتا* و اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا* مشاهده شد (نمودار ۳).



نمودار ۳) مقایسه درصد مرگ‌ومیر قوی‌ترین عصاره‌های ماکروجلبک‌های سبز دریایی در برابر آرتمیا سالینا در غلظت‌های مختلف (میکروگرم بر میلی‌لیتر). در این میان عصاره ان‌هگزانی *U.liza* اثر مرگ‌ومیر بیشتری داشت.
حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

تمام عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز مورد مطالعه و غلظت‌های مورد آزمایش آنها، تاثیر معنی‌داری روی درصد مرگ‌ومیر لارو *آرتمیا سالینا* داشتند ($p\leq۰/۰۵$).

بحث

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات فعالیت ضداکسیدانی و سمیت سلولی بر سه گونه ماکروجلبک سبز اولواسه شامل *اولوا اینتستینالیس*، *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* در سواحل خلیج فارس و نیز سنجش میزان سمیت عصاره‌های ماکروجلبکی استحصال‌شده بر گونه میگوی آب شور انجام شد.

تولیدات طبیعی دریا، ترکیباتی آلی هستند که توسط ارگانیزم‌های زنده دریایی نظیر میکروب‌ها، اسفنج‌ها، علف‌های دریایی، جلبک‌ها و دیگر ارگانیزم‌ها تولید و به سه دسته شامل متابولیت‌های اولیه، ثانویه و نیز مواد پلیمری با وزن مولکولی بالا تقسیم می‌شوند[25]. در این میان علف‌های دریایی یا ماکروجلبک‌ها یکی از گروه‌های متنوع ارگانیزمی با سازگاری‌های بسیار برای زیست در محیط‌های پراسترس دریایی از حیث شوری، دما و نور هستند و از منابع طبیعی واجد پتانسیل اقتصادی (به‌عنوان منابعی از آگار، کاراژینان، آلژینات، پروتئین، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین و مواد معدنی) شناخته شده‌اند که از اهمیت ویژه‌ایی در توسعه صنعت دارویی برخوردارند[26, 27]. این ارگانیزم‌ها برای حفاظت از خود و سازش در چنین محیط‌هایی انواع بسیار زیادی از ترکیبات زیست‌فعال و متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند[27]. تاکنون گزارشات متعددی از استخراج ترکیبات زیست‌فعال از ماکروجلبک‌ها با طیف وسیع فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های ضداکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدسرطانی منتشر شده است[28, 29].

نتایج مطالعه حاضر گویای این بود که در ارتباط با فعالیت ضداکسیدانی طی یک روند وابسته به غلظت، عصاره متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس*، اتیل‌استاتی و متانولی گونه *اولوا لینزا* و *اولوا*

کلاتراتا دارای بیشترین فعالیت احیاکنندگی آهن و ظرفیت ضداکسیدانی کل بوده که در قیاس با آسکوربیک‌اسید (استاندارد)، فعالیت بالاتری داشتند. *یه* و همکاران در سال ۲۰۰۹ چنین پیشنهاد می‌کنند که نوع حلال و مکانیزم استخراج در تغییر ترکیبات شیمیایی با خواص ضداکسیدانی و توان مهار رادیکال‌های آزاد، اثرات شایان توجهی دارد[30]. توان احیایی آهن در عصاره‌ها نشان‌دهنده وجود ترکیبات ضداکسیدانی است که قادرند نقش الکترون‌دهنده را ایفا نموده و فرآیند اکسیداسیون لیپیدی را به‌واسطه تولیدات فرعی با توان اکسایشی بالا تقلیل بخشند. بنابراین چنین ترکیباتی نقش مهارکنندگان اکسیداسیون اولیه و ثانویه را ایفا می‌کنند[31].

از نظر محتوای ترکیبات فنلی نیز، ارزیابی به روش فولین‌سیوکالتو نشان داد که بیشترین میزان این ترکیبات متعلق به عصاره‌های متانولی ماکروجلبک‌های گونه *اولوا کلاتراتا* و گونه *اولوا لینزا* (mg ۰/۷ GAE g^{-1}) بود که در تایید یافته‌های دیگر محققین بیانگر فعالیت مهاری رادیکال‌های آزاد عصاره‌های طبیعی با محتوای ترکیبات فنلی آنها مرتبط است. *لادا* و *دنیل* بیان کردند که ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که نقش مهمی را در محافظت از بدن ایفا می‌کنند[32]. متابولیت‌های گیاهی مانند فنل‌ها، فلاونوئیدها و تانن‌ها در ماکروجلبک‌های دریایی نیز واجد فعالیت ضداکسیدانی بوده‌اند و به‌واسطه مهار رادیکال‌های آزاد امکان پیشگیری شماری از بیماری‌ها را فراهم ساخته‌اند[33]. *فراست* و همکاران در سال ۲۰۱۴ فعالیت ضداکسیدانی عصاره‌های متانولی ۴ گونه از ماکروجلبک‌های سبز خوراکی *اولوا اینتستینالیس* و *اولوا فلکسوسا* (*Ulva flexuosa*) *اولوا لینزا* و *اولوا کلاتراتا* جمع‌آوری‌شده از سواحل دیر، طاهری و نواحی شمالی اولی خلیج فارس به روش توان مهار رادیکال‌های دی‌پی‌پی‌اچ (DPPH) و تعیین محتوای فنلی و فلاونوئیدی ارزیابی کردند، نتایج ایشان نشان داد که ماکروجلبک گونه کلاتراتا بالاترین توان مهاری رادیکالی DPPH و محتوای فنلی (۵/۰۸mg GAE g^{-1}) و فلاونوئیدی (۳۳/۰۹mg RE g^{-1}) را دارد[34]. در حالی که در مطالعه حاضر میزان ترکیبات فنلی متعلق به این ماکروجلبک در سواحل بندرعباس ۰/۷mg GA/g به‌دست آمد.

سلوراجو و همکاران در سال ۲۰۱۲، طی تحقیقی مشابه، فعالیت ضداکسیدانی و محتوای فنلی عصاره آبی- متانولی ماکروجلبک سبز گونه *اولوا کلاتراتا* را ارزیابی کردند و محتوای ترکیبات فنلی آن را ۰/۲میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم ماده خشک، گزارش کردند[35] که در مقایسه با گونه‌های مطالعه حاضر، این میزان کمتر بود. *متانجوم* و همکاران در سال ۲۰۰۸ نتیجه گرفتند که محتوای فنلیک ماکروجلبک‌های قهوه‌ای بسیار بیشتر از ماکروجلبک‌های سبز و قرمز است[36]. دیگر مطالعات در این زمینه عنوان می‌کنند که محتوای فنلی ماکروجلبک‌های دریایی، مستقیماً متاثر از نور خورشید و شرایط آب‌وهوایی بوده، از این رو ترکیبات فنل ماکروجلبک‌های دریایی از گونه‌های مشابه در کشورهای مختلف می‌تواند متفاوت باشند[37]. بنابر آنچه که عنوان شد ماکروجلبک‌های واقع در مناطق پایین جزر و مدی که مدت طولانی‌تری در آب غوطه‌ور هستند و سطح پایین‌تری از استرس را متحمل می‌شوند، غلظت‌های پایین‌تری از ترکیبات فنل نیاز دارند. نظر به اینکه ماکروجلبک‌های مطالعه حاضر در فصول سرد سال، از مناطق پایین جزر و مدی و در هنگامه بیشینه جزر جمع‌آوری شدند، گمان می‌رود که این شرایط احتمالاً بر میزان کم محتوای فنلی آنها اثرگذار بوده باشد. نتایج به‌دست آمده از مقایسه فعالیت ضداکسیدانی عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های دریایی سواحل بندرعباس، عصاره متانولی گونه *اولوا اینتستینالیس* و اتیل‌استاتی و متانولی *اولوا لینزا* و *اولوا اکلاتراتا* را به‌عنوان دارنده بیش‌ترین فعالیت احیاکنندگی آهن و ظرفیت ضداکسیدانی کل معرفی کرد، در حالی که یافته‌های محققین دیگر تا حدودی متنوع و متفاوت بوده است، به‌طور مثال *فراست* و همکاران توانستند خواص ضداکسیدانی عصاره‌های متانولی ۴ گونه از ماکروجلبک‌های سبز خلیج فارس از جنس چیتومورفا (Chaetomorpha) شامل *چیتومورفا برانچیوگونا* (*Chaetomorpha brachygona*)، *چیتومورفا لاینوم* (*Chaetomorpha linum*)، *چیتومورفا کراسا* (*Chaetomorpha crassa*) و *چیتومورفا آئرا* (*Chaetomorpha aerea*) را به روش توان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و تعیین محتوای فنلی و فلاونوئیدی ارزیابی کنند، در این بین گونه لاینوم ماکزیمم فعالیت ضداکسیدانی و محتوای فنلی (۲/۸۹mg GAE g^{-1}) و فلاونوئیدی (۱۸/۱۷mg RE g^{-1}) را نشان داد[38]. از طرفی *طارق* و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ فعالیت ضداکسیدانی کل عصاره‌های آبی و اتانولی ۱۵ گونه از ماکروجلبک‌های سواحل کراچی پاکستان را ارزیابی کردند و توانستند ترکیبات پلی‌ساکاریدی را در آنها شناسایی و مسئول خواص ضداکسیدانی معرفی کنند که بالاترین میزان آن در ماکروجلبک *کالرپا تاکسی‌فولیا* (*Caulerpa taxifolia*) مشاهده شد[39]. *هانا* در سال ۲۰۰۸ نشان داد که عصاره آلی خام *اولوا لاتوتوس* (*Ulva latutus*) خواص ضداکسیدانی دارد و آنالیز ترکیبات شیمیایی آن به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) نشان داد که فعالیت ضداکسیدانی با محتوای فنلی، کاروتنوئیدی (بتاکاروتن) و کلروفیلی مرتبط است[40] که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

آزمون کشندگی لارو میگوی آب شور یک روش کاربردی در ارزیابی، غربال و جداسازی ترکیبات فعال زیستی است و در حدود ۳۰ سال از میگوی آب شور برای بررسی و سم‌شناسی محیطی استفاده می‌شود[12]. این گونه خاص از میگوی آب شور، گونه استاندارد به‌منظور بررسی اثرات سمیت سلولی است و این آزمایش یک آزمون غربالگری اولیه در شرایط آزمایشگاهی با هزینه کم و حساسیت بالا است که در زمان کوتاهی قابل اجرا است و نیز مقدار نمونه مورد نیاز برای هر آزمایش کم است. بنابر جوابیه این آزمون و مطابق بر استانداردهای موسسه بین‌المللی سرطان ایالات متحده (NCI) زمانی یک ترکیب زیست‌فعال واجد خواص ضدتوموری و ضدسرطانی موثر محسوب می‌شود که دوز موثره سمیت آن برابر یا کمتر از ۳۰ppm باشد[41].

بررسی اثرات سمیت بر لارو میگوی آب شور (*آرتمیا سالینا*) در عصاره‌های آلی ماکروجلبک‌های سبز دریایی در تحقیق حاضر نشان داد که عصاره ان‌هگزانی گونه *اولوا لینزا* (LC_{50}=۳۰۰/۷۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بیشترین تاثیرات کشندگی را داشت حال آنکه کمترین اثرات سمیت در عصاره‌های متانولی گونه *اولوا کلاتراتا* و اتیل‌استاتی گونه *اولوا لینزا* مشاهده شد. *آرا* و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹عصاره اتانولی ۲۲ گونه از ماکروجلبک‌های دریایی (مشتمل بر ۶ گونه ماکروجلبک سبز) سواحل کراچی پاکستان را مورد ارزیابی توسط آزمون سمیت سلولی آرتمیا قرار دادند که از میان ماکروجلبک‌های سبز، تنها بخش ان‌هگزانی محلول در اتانول *کالرپا ریسموسا* (*Caulerpa racemosa*) واجد فعالیت کشندگی بالا (LC_{50}=۹۲۹میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود[42]. *سلوین* و *لیپتن* در سال ۲۰۰۴ چنین گزارش کردند که عصاره متانول- دی‌کلرومتان

ماکروجلبک سبز *اولوا فاسیاتا* (*Ulva fasciata*) از سواحل هند، واجد فعالیت زیستی سمیت سلولی قوی بر لارو میگوی آب شور و خواص لارو کشی در برابر پشه جنس کولکس (Culex sp) است. منتهی با کاهش دما اثرات سمیتی آن کاهش یافته، به‌نحوی که این اثرات سمیت در عصاره با غلظت ۶میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۹۷٪ کشندگی در دمای ۳۰°C بوده در حالی که این درصد کشندگی در این گونه تا ۶۰% در دمای ۲۰±۲°C کاهش یافته است. اما خواص لاروکشی آن نسبت به پشه کولکس در غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۰۰% بود[43]. در مطالعه‌ای سمیت عصاره ۲۶ گونه از ماکروجلبک‌های بنتیک دریایی (مشتمل بر گونه ماکروجلبک سبز) ایالت سانتا کاترینا را بر گونه *آرتمیا سالینا* بررسی شد که اکثریت آنها در غلظت ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات قوی داشتند[44]. در مطالعه مشابه دیگری فعالیت لاروکشی عصاره‌های آبی، دی‌کلرومتان، متانول و اتانول ماکروجلبک‌های سواحل برزیل مشتمل بر ماکروجلبک سبز *اولوا لاکتوکا* (*Ulva lactuca*) بررسی شد و نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی فاقد اثرات سمیت بوده اما عصاره‌های غیرقطبی (کلروفروم و هگزان) در *پادینا جیمنوسپورا* (*Padina gymnospora*) تاثیرات کشندگی متوسطی دارند[45]. آیشا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ فعالیت سمیت سلولی عصاره‌های اتانولی ۹ گونه از علف‌های دریایی سواحل کراچی پاکستان مشتمل‌بر گونه‌های *اولوا فاسیاتا* را به روش BSA ارزیابی کردند که نتایج ایشان نشان داد که علی‌رغم اینکه تمامی گونه‌ها اثرات سمیت قابل توجهی داشتند، اما در *دیکتیوتا ایندیکا* (*Dictyota indica*) بالاترین میزان فعالیت (LC_{50}=۱۴۳µg) مشاهده شد و این میزان برای *اولوا فاسیاتا* نیز برابر با LC_{50}=۷۲۴میکروگرم بود[46].

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که علی‌رغم اینکه هر سه گونه واجد خواص ضداکسیدنی و سمیت سلولی بودند، در یک قیاس کلی می‌توان ماکروجلبک گونه *اولوا لینزا* را به‌دلیل دارابودن مقادیر زیادی فنل و به طبع قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا، به‌عنوان گونه‌ایی با ارجحیت خواص زیستی معرفی نمود. به‌علت اثرات مفید آنتی‌اکسیدان‌ها بر سلامت انسان و نیاز به محصولات طبیعی و ایمن در این زمینه، انتظار می‌رود مطالعات آتی بر خالص‌سازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی احتمالی این گونه‌ها متمرکز شود و از آنجایی که ماکروجلبک‌های سبز خانواده اولواسه، در بیشتر فصول سال به وفور یافت می‌شوند، امید است طی تحقیقات بعدی، این منابع عظیم دریایی مورد مطالعه و بهره‌برداری در سطح وسیع‌تری قرار گیرند.

از جمله محدودیت‌های این پژوهش، دردست‌نبودن همیشگی ماکروجلبک‌ها در فصول خاص، به‌علت شرایط جوی حاکم در جنوب کشور بود. بررسی بیشتر ترکیبات اولیه و ثانویه متنوع در انواع ماکروجلبک‌های دریایی، به‌علت ایمن، بی‌خطر و نیز ارزان‌بودن دستیابی به این گونه ترکیبات نسبت به نوع شیمیایی آن از جمله پیشنهادات این پژوهش است.

نتیجه‌گیری

سه گونه ماکروجلبک سبز شامل *اولوا اینتستینالیس*، *اولوا کلاتراتا* و *اولوا لینزا* خواص ضداکسیدانی و سمیت سلولی دارند. ماکروجلبک گونه *اولوا لینزا* به‌دلیل دارابودن مقادیر زیادی فنل و به‌طبع قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا، می‌تواند به‌عنوان گونه‌ای با ارجحیت خواص زیستی معرفی شود.

تشکر و قدردانی: از مسئولان محترم دانشگاه هرمزگان که ضمن حمایت مالی، محیط و امکانات پژوهشی مناسب را برای تحقیق حاضر فراهم کردند و نیز از تمامی همکارانی که در انجام عملیات میدانی و آزمایشگاهی با ما مشارکت داشته‌اند، سپاسگزاری و تقدیر می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: موردی گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا زارعی‌جلیانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۵%)؛ سکینه مشجور (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۵%)؛ سولماز سلیمانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ کیانا پیریان (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۵%)؛ فاطمه صداقت (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۵%)؛ مرتضی یوسف‌زادی (نویسنده ششم)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۱۵%).

منابع مالی: این پژوهش تحت حمایت مالی سازمان یا نهادی نبوده است.

منابع

1- Meenakshi S, Umayaparvathi Sh, Arumugam M, Balasubramanian Th. In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. Asian Pac J Trop Biomed. 2011;1(1):S66-70.

2- Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Teixeira JA, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed Gracilaria birdiae. Food Hydrocoll. 2012;27(2):287-92.

3- Konig GM, Wright AD, Sticher O, Anghofer CK, Pezutto JM. Biological activities of selected marine natural products. Planta Med. 1994;60(6):532-7.

4- Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. Food Res Int. 2010;43(9):2289-94.

5- Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. Trends Food Sci Technol. 2012;23(2):83-96.

6- Mau JL, Lin HC, Song SF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. Food Res Int. 2002;35(6):519-26.

7- Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem Soc. 1998;75(2):199-212.

8- Dutot M, Fagon R, Hemon M, Rat P. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-senescence activities of a Phlorotannin-Rich natural extract from Brown Seaweed Ascophyllum nodosum. Appl Biochem Biotechnol. 2012;167(8): 2234-40.

9- Devi KP, Suganthy N, Kesika P, Pandian SK. Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. BMC Complement Altern Med. 2008;8:38.

10- Ragan MA, Glombitza KW. Phlorotannins, brown algal polyphenols. Prog Phycol Res. 1986;4:129-241.

11- Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta Sh. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. Int Food Res J. 2010;17:205-20.

12- Costello MJ, Fretwell K, Read P. Toxicity of sewage sludge to Crangon crangon and Artemia salina, with reference to other marine Crustacea. Aquat Living Resour. 1993;6(4):351-6.
13- Hisem d, Hrouzek P, Tomek P, Tomsickova J, Zapomelova E, Skacelova K, et al. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicityto brine shrimp Artemia salina. Toxicon. 2010;57(1):76-83.
14- Basson PW. Marine algae of the Arabian gulf coast of Saudi Arabia (first half). Bot Mar. 1979;22(1):47-64.
15- Trono GC. Diversity of the seaweed flora of the Philippines and its utilization. Hydrobiologia. 1999;398(0):1-6.
16- Kokabi M, Yousefzadi M. Checklist of the marine macroalgae of Iran. Botanica Marina. 2015;58(4):307-20.
17- Sohrabipour J, Nejadsatari T, Assadi M, Rabiei R. The marine algae of the southern coast of Iran, Persian Gulf, Lengeh area. Iran J Bot. 2004;10(2):83-93.
18- Sohrabipour J, Rabiei R. The checklist of green algae of the Iranian coastal lines of the Persian Gulf and Gulf of Oman. Iran J Bot. 2007;13(2):146-9.
19- Gouhari AR, Hadji Akhoundi A, Saeidnia S, Shafiei A, Ebrahimi ES. Cytotoxic terpenoids from Satureja macrantha C.A. mey. Daru J Pharm Sci. 2005;13(4):177-81.
20- Yoshida M. Naphthaquinone pigments in psammechinus miliaris (Gmelin). J Mar Biol Assoc UK. 2009;38(3):455-60.
21- Mitsuda H, Yuasumoto K, Iwami I. Antioxidation action of indole compounds during the autooxidation of linoleic acid. Eiyo Shokuryo. 1996;19(3):210-4.
22- Salmanian Sh, Sadeghi Mahoonak AR, Maghsoudlou Y, Rabiee H, Tabatabaei Amid B. Extraction of bioactive compounds and determination of antioxidant activity of ethanolic and acetonic extracts of Mentha aquatique leaves. Elect J Food Process Preserv. 2010;2(3):85-100. [Persian]
23- Singleton VL, Joseph AR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16:144-58.
24- Sorgeloos P, Van Der Wielen CR, Persoone G. The use of Artemia nauplii for toxicity tests a critical analysis. Ecotoxicol Environ Safe. 1978;2(3-4):249-55.
25- Hanson JR. Natural products: The secondary metabolites. Royal Society of Chemistry (Great Britain), editor. London: Royal Society of Chemistry, 2003.
26- Stengel DB, Connan S, editors. Natural products from marine algae: Methods and protocols. New York: Springer New York, 2016.
27- Løvstad Holdt S, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. J Appl Phycol. 2011;32(3):543-97.
28- Kim SK, Thomas NV, Li X. Anticancer compounds from marine macroalgae and their application as medicinal foods. Adv Food Nutr Res. 2011;64:213-24.
29- Mashjoor S, Yousefzadi M, Esmaeili MA, Rafiee R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. Cytotechnology. 2016;68(5):1717-26.
30- Ye H, Zhou Ch, Sun Y, Zhang X, Liu J, Hu Q, et al. Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed Sargassum pallidum. Eur Food Res Technol. 2009;230:101-9.
31- Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. J Agric Food Chem. 1999;47(2):633-6.
32- Latha S, Daniel M. Phenolic antioxidants of some common pulses. J Food Sci Technol. 2001;38(3):272-3.
33- Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus Cystoseira in a micellar model system. J Appl Phycol. 2001;13(5):403-7.
34- Farasat M, Khavari-Nejad RA, Nabavi SMB, Namjooyan F. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from Northern coasts of the Persian Gulf. Iran J Pharm Res. 2014;13(1):163-70.
35- Meenakshi S, Umayaparvathi Sh, Arumugam M, Balasubramanian T. In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. Asian Pac J Trop Biomed. 2011;1(1):S66-70.
36- Matanjum P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhamad K, Ming CH. Antioxidant activites and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. J Appl Phycol. 2008;20:367-73.
37- Flodin C, Helidoniotis F, Whitfield FB. Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity in Ulva lactuca. Phytochemistry. 1999;51(1):135-8.
38- Farasat M, Khavari-Nejad RA, Nabavi SMB, Namjoyan F. Antioxidant properties of some filamentous green algae (Chaetomorpha genus). Braz Arch Biol Technol. 2013;56(6):921-7.
39- Tariq A, Athar M, Ara J, Sultana V, Ehteshamul-Haque S, Ahmad M. Biochemical evaluation of antioxidant activity in extracts and polysaccharide fractions of seaweeds. Glib J Environ Sci Manag. 2015;1(1):47-62.
40- Abd El-Baky HH, El-Baz F, El-Baroty GSE. Evaluation of marine alga Ulva lactuca L. as a source of natural preservative ingredient. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2008;3(3):434-44.
41- Layson RJ, Rodil MCA, Mojica ERE, Deocaris CC. Potential anti-cancer and anti-bacterial activities of Philippine Echinoderm extracts. J Trop Life Sci. 2014;4(3):175-81.
42- Ara J, Sultana V, Ehteshamul-Haque S, Qasim R, Ahmad UV. Cytotoxic activity of marine macro-algae on Artemia salina (Brine Shrimp). Phytother Res. 1999;13(4):304-7.
43- Selvin J, Lipton AP. Biopotentials of Ulva fasciata and Hypnea musciformis collected from the peninsular coast of India. J Mar Sci Technol. 2004;12(1):1-6.
44- Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M. Evaluation of macroalgae from Santa Catarina's coast with the brine shrimp assay. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2006;16(2):158-63. [Portuguese]
45- Guedes EAC, de Carvalho CM, Riberio Junior KAL, Lisboa Ribeiro TF, de Barros LD, de Lima MRF, et al. Larvicidal activity against Eedes Eegypti and molluscicidal activity against Biomphalaria glabrata of Brazilian marine algae. J Parasitol Res. 2014;2014:501328.
46- Ayesha Hira, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. In vitro cytotoxicicity of seaweeds from Karachi coast on brine shrimp. Pak J Bot. 2010;42(5):3555-60.