

Ekstrakcija kapsaicina iz različitih vrsta čili papričica

Sović, Lucia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:323657>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucia Sović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Lucia Sović

Predala je izrađen diplomski rad dana: 21. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Izv. prof. dr. sc. Davor Dolar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 26. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucia Sović

EKSTRAKCIJA KAPSAICINA IZ RAZLIČITIH VRSTA ČILI
PAPRIČICA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum
izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
izv. prof. dr. sc. Davor Dolar

Zagreb, rujan 2023.

Srdačno zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander, na izvanrednom vodstvu i strpljenju prilikom izrade ovog rada.

Također, zahvaljujem dr. sc. Ani Petračić te izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na neizostavnom doprinosu eksperimentalnom dijelu rada.

SAŽETAK

Čili papričice jedan su od glavnih sastojaka raznih kulinarskih tradicija diljem svijeta. Osim kulinarskog značaja, imaju veliku važnost zbog svog najzastupljenijeg bioaktivnog spoja, kapsaicina, koji im daje njihovu karakterističnu ljutinu. Kapsaicin od svog otkrića privlači značajan znanstveni interes zbog svoje široke primjene u raznim područjima, uključujući poljoprivredu i farmaciju. Mnoga istraživanja ukazuju na njegove potencijalne zdravstvene dobrobiti, kao što su analgetska svojstva i metabolički učinci, a također mu se pripisuju i određena antibakterijska i antifungalna svojstva.

U sklopu ovog rada provedena je ekstrakcija kapsaicina iz tri različite vrste čili papričica korištenjem četiri ekstrakcijske tehnike: ekstrakcija uz magnetsko miješanje, Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija te hidrodestilacija. Cilj rada bio je odrediti koncentraciju kapsaicina za svaku pojedinu papričicu, procijeniti njegovu stabilnost u dobivenim ekstraktima tijekom određenog vremenskog perioda te utvrditi utjecaj procesnih uvjeta na učinkovitost ekstrakcije. Provedena je i mikrobiološka analiza u svrhu utvrđivanja antimikrobnih svojstava ekstrahiranog kapsaicina.

Prema dobivenim rezultatima, najpovoljniji uvjeti za postizanje većeg prinosa kapsaicina bili su duže vrijeme trajanja ekstrakcije, više radne temperature i upotreba sušenih papričica, dok se među korištenim ekstrakcijskim tehnikama Soxhlet tehnika pokazala najučinkovitijom za ekstrakciju kapsaicina. Prilikom procjene stabilnosti kapsaicina uočene su oscilacije u njegovoj koncentraciji u ekstraktima tijekom vremena, međutim te oscilacije nisu značajne te se mogu pripisati eksperimentalnoj pogrešci. Rezultati mikrobiološke analize ukazali su na određen inhibicijski učinak kapsaicina na dvije Gram-pozitivne bakterijske kulture, *B. subtilis* i *S. aureus*.

Ključne riječi: ekstrakcija, kapsaicin, čili papričice

ABSTRACT

Chili peppers are one of the main ingredients of various culinary traditions around the world. Apart from their culinary significance, they are of great importance because of their most abundant bioactive compound, capsaicin, which gives them their characteristic spiciness. Since its discovery, capsaicin has attracted considerable scientific interest due to its wide application in various fields, including agriculture and pharmacy. Many studies point to its potential health benefits, such as analgesic properties and metabolic effects, and certain antibacterial and antifungal properties are also attributed to it.

In this thesis, the extraction of capsaicin from three different types of chili peppers was carried out using four extraction techniques: extraction with magnetic stirring, Soxhlet extraction, ultrasound assisted extraction and hydrodistillation. The aim of the thesis was to determine the concentration of capsaicin for each individual pepper, to assess its stability in the obtained extracts over a certain period of time, and to determine the influence of process conditions on the extraction efficiency. A microbiological analysis was also carried out in order to determine the antimicrobial properties of the extracted capsaicin.

According to the obtained results, the most favorable conditions for achieving a higher yield of capsaicin were longer extraction time, higher operating temperature and the use of dried peppers, while among the extraction techniques used, the Soxhlet technique proved to be the most effective for capsaicin extraction. When assessing the stability of capsaicin, oscillations in its concentration in the extracts were observed over time, however, these oscillations are not significant and can be attributed to experimental error. The results of the microbiological analysis indicated a certain inhibitory effect of capsaicin on two Gram-positive bacterial cultures, *B. subtilis* and *S. aureus*.

Key words: extraction, capsaicin, chili peppers

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Plodovi roda <i>Capsicum</i> – raznolikost i primjena.....	2
2.2. Bioaktivne komponente čili papričica	3
2.2.1. Karotenoidi	3
2.2.2. Flavonoidi	4
2.2.3. Kapsaicinoidi	4
2.3. Kapsaicin.....	5
2.4. Ekstrakcija krutina-kapljevina	7
2.5. Tehnike ekstrakcije kapsaicina	7
2.4.1. Soxhlet ekstrakcija	8
2.4.2. Hidrodestilacija	10
2.4.3. Ultrazvučna ekstrakcija.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali i kemikalije.....	13
3.2. Priprava uzoraka	14
3.3. Tehnike ekstrakcije kapsaicina	15
3.3.1. Ekstrakcija kapsaicina uz magnetsko miješanje	15
3.3.2. Soxhlet ekstrakcija kapsaicina	15
3.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija kapsaicina.....	16
3.3.4. Ekstrakcija kapsaicina hidrodestilacijom.....	17
3.4. Tehnike analize uzoraka	18
3.4.1. UV/Vis spektrofotometrija.....	18
3.4.2. Mikrobiološka analiza.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Određivanje koncentracije kapsaicina	19
4.2. Utjecaj procesnih uvjeta na učinkovitost ekstrakcije.....	22
4.3. Stabilnost kapsaicina.....	26
4.4. Antimikrobna aktivnost kapsaicina.....	33
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA.....	35

1. UVOD

Čili papričice u svijetu su odavno poznate po svojim jedinstvenim svojstvima – oštrom okusu i karakterističnoj ljutini. Ta se svojstva pripisuju prisutnosti kapsaicinoida, prvenstveno kapsaicina, kao njihove glavne bioaktivne komponente. Kapsaicin je prirodni alkaloid bez boje i mirisa koji od svog otkrića privlači značajan znanstveni interes zbog svoje široke primjene u raznim područjima, uključujući farmaciju, poljoprivredu i kulinarstvo. Važnost kapsaicina nadilazi njegove senzorne atribute, budući da istraživanja ukazuju i na njegove potencijalne zdravstvene dobrobiti, kao što su analgetska svojstva i metabolički učinci, što ga čini zanimljivim predmetom istraživanja. Također mu se pripisuju određena antibakterijska i antifungalna svojstva te čak i stanoviti antivirusni potencijal.

Ekstrakcija kapsaicina iz čili papričica temeljni je proces i za znanstvena istraživanja i za industrijsku primjenu. Razvijene su brojne konvencionalne i nekonvencionalne tehnike ekstrakcije koje nude različite mehanizme za izolaciju kapsaicina iz čili papričica, uključujući Soxhlet ekstrakciju, ultrazvučnu ekstrakciju, hidrodestilciju, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i druge.

U sklopu ovog rada provedena je ekstrakcija kapsaicina iz tri različite vrste čili papričica korištenjem četiri različite ekstrakcijske tehnike. Cilj rada bio je odrediti koncentracije kapsaicina za svaku od papričica te procijeniti njegovu stabilnost mjerenjem iste u različitim vremenskim intervalima. Pritom je bilo potrebno utvrditi i utjecaj čimbenika poput vrste papričice, ekstrakcijske tehnike i procesnih uvjeta na učinkovitost provedenih procesa, odnosno dobivenu koncentraciju kapsaicina u ekstraktu. Također, provedena je i mikrobiološka analiza u svrhu utvrđivanja antimikrobnih svojstava ekstrahiranog kapsaicina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Plodovi roda *Capsicum* – raznolikost i primjena

Rod *Capsicum* najznačajniji je član porodice Solanaceae. Obuhvaća otprilike 30 vrsta, od kojih su najčešće kultivirane *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* i *C. pubescens*. Pritom se *Capsicum annuum* ističe kao najvažnija vrsta zbog svoje kulinarske, medicinske i gospodarske važnosti. Plodovi roda *Capsicum*, odnosno čili papričice, različitih su oblika i boja, uključujući nijanse crvene, narančaste, žute i zelene [1,2].



Slika 1. Različite vrste čili papričica.

Čili papričice često se mehanički obrađuju u svrhu dobivanja suhog praha ili uljane smole (koncentriranog ekstrakta koji sadrži eterična ulja, voskove, karotenoide, flavonoide i kapsaicinoide), a svoju primjenu pronašle su u raznim industrijama. Najčešće se koriste se kao začini i prirodna bojila u prehrambenoj industriji, sredstva za ublažavanje bolova, agensi za zaštitu kardiovaskularnog zdravlja, protuupalni agensi, antioksidansi te čak imaju potencijalna antitumorska svojstva. Pritom, raspon primjene papričice kao sirovine razlikuje se od industrije do industrije jer uvelike ovisi o njenom sadržaju bioaktivnih spojeva [3].

Papričice također posjeduju i određena antimikrobna svojstva koja se pripisuju kapsaicinu, njihovom aktivnom spoju. Mnoga istraživanja ukazuju na njihove antibakterijske učinke protiv sojeva kao što su *E. coli* i *Salmonella*, gdje dolazi do remećenja stanične membrane bakterija i inhibicije rasta. Osim toga, pokazuju i antifungalna svojstva protiv vrsta poput *Candida albicans*, uobičajenog uzročnika gljivične infekcije. Neka istraživanja ukazuju na antivirusni potencijal protiv virusa kao što su HSV i HIV [4].

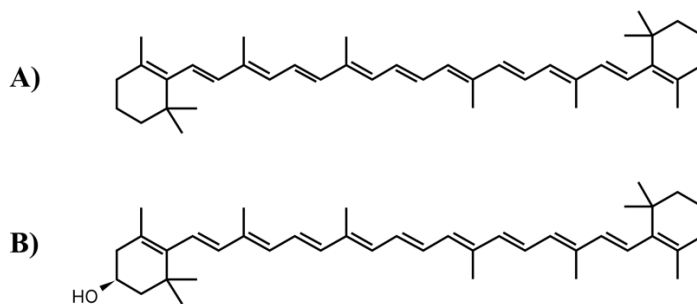
Kulinarska i medicinska primjena čili papričica potaknula je temeljita istraživanja njihovih kemijskih svojstava. Kako su istraživanja unutar roda napredovala, otkriveno je da prisutnost alkaloidnih spojeva karotenoida, flavonoida i kapsaicinoida čini temeljnu osnovu za njihove karakteristike [3].

2.2. Bioaktivne komponente čili papričica

Prirodni alkaloidi poput karotenoida, flavonoida i kapsaicinoida najvažnije su i najzastupljenije bioaktivne komponente čili papričica. Karotenoidi i flavonoidi ne samo da doprinose živopisnim bojama čili papričica, već imaju i pozitivne učinke na zdravlje, dok im kapsaicinoidi daju karakterističnu ljutinu [3].

2.2.1. Karotenoidi

Karotenoidi su uglavnom molekule od 40 ugljikovih atoma s konjugiranim dvostrukim vezama. Na temelju njihove strukture dijele se na karotene (sadrže atome ugljika i vodika) i ksantofile (sadrže ugljik, vodik i kisik), a općenito su lipofilni spojevi i obično tvore hidrofobne micelle [4].

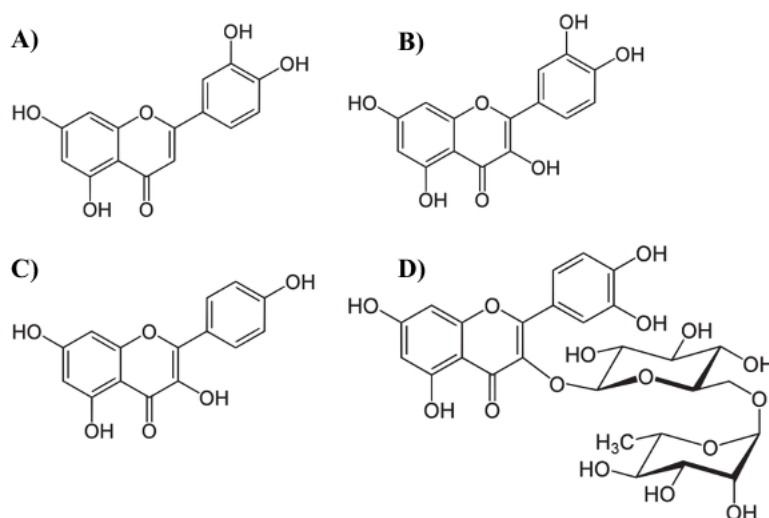


Slika 2. Kemijska struktura karotena (A) i ksantofila (B).

Sudjeluju u važnim procesima u biljkama kao što su fotosinteza, fotomorfogeneza, fotozaštita i razvoj. Oni također služe kao prekursori za biosintezu dviju vrsta biljnih hormona (apscizinske kiseline i strigolaktone) i raznolikog skupa apokarotenoida. Karotenoidi su stekli važnost zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i fotoprotektivnih svojstava, a razna su istraživanja usmjerena na njihovu sposobnost promicanja zdravlja [4].

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi sadrže fenolne hidroksilne skupine u svojoj kemijskoj strukturi i posjeduju izvrsna svojstva keliranja željeza i drugih prijelaznih metala. Ovi spojevi čili papričicama daju visok antioksidativni kapacitet, odnosno pružaju zaštitu od oksidativnog oštećenja. U plodovima čili papričica najzastupljeniji flavonoidi su luteolin, kvercetin, kemferol i rutin [5,6].

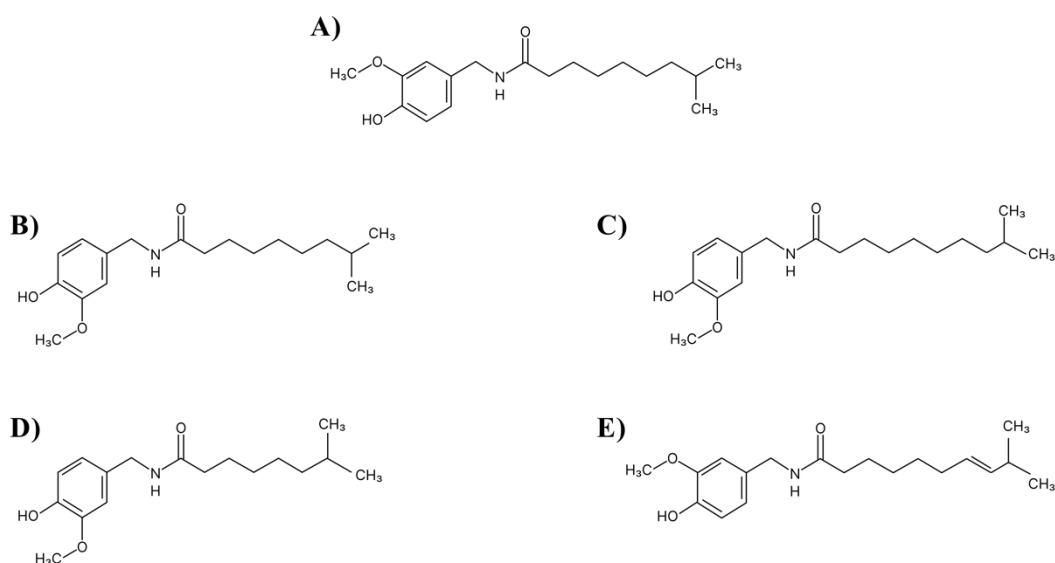


Slika 3. Kemijska struktura najzastupljenijih flavonoida u čili papričicama; A) Luteolin, B) Kvercetin, C) Kemferol, D) Rutin.

Flavonoidi imaju pozitivne učinke na zdravlje, iako se njihovi mehanizmi djelovanja i dalje istražuju jer je teško kvantificirati dnevni unos i njihove izravne učinke na zdravlje. Do sada su flavonoidi povezani s antisklerotičnim, protuupalnim, antitumorskim, antitrombogenim, antivirusnim i antiosteoporotskim učincima te mogu djelovati i kao preventivno sredstvo stvaranju tumora, među ostalim učincima [5].

2.2.3. Kapsaicinoidi

Čili papričice proizvode mnoge spojeve slične kapsaicinu, koji se zbog te sličnosti svrstavaju u jednu skupinu nazvanu kapsaicinoidi. Kapsaicinoidi uključuju dihidrokapsaicin, nordihidrokapsaicin, homodihidrokapsaicin i homokapsaicin [7].



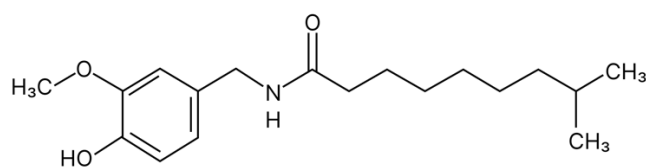
Slika 4. Kemijske strukture kapsaicinoida; A) Kapsaicin, B) Dihidrokapisaicin, C) Homodihidrokapisaicin, D) Nordihidrokapisaicin, E) Homokapisaicin.

Ove molekule slične su po strukturi i aktivnosti, međutim nisu toliko zastupljene u odnosu na kapsaicin, koji može činiti i do 80 % sadržaja kapsaicinoida u čili papričicama. Oporost svih ovih molekula naglašava činjenicu da je ova aktivnost definirana uglavnom područjem benzenskog prstena, međutim duljina acilnog lanca može je modificirati [7].

Kapsaicinoidi se unutar tkiva posteljice ploda čili papričice u razvoju sintetiziraju 20 do 30 dana nakon formiranja mahuna i nastavljaju se nakupljati kako plod sazrijeva. Osim genetike, koncentracija kapsaicinoida ovisi o drugim čimbenicima, kao što su stupanj zrelosti i agronomski uvjeti uzgoja. Osim kapsaicinoida, postoje i druge skupine molekula koje dijele sličnosti s kapsaicinom, kao što su kapsinoidi, sa smanjenom ljutinom, i iznimno snažni resiniferoidi. Sve ove molekule povezane su s kapsaicinom te poput njega posjeduju određena terapijska svojstva [7,8].

2.3. Kapsaicin

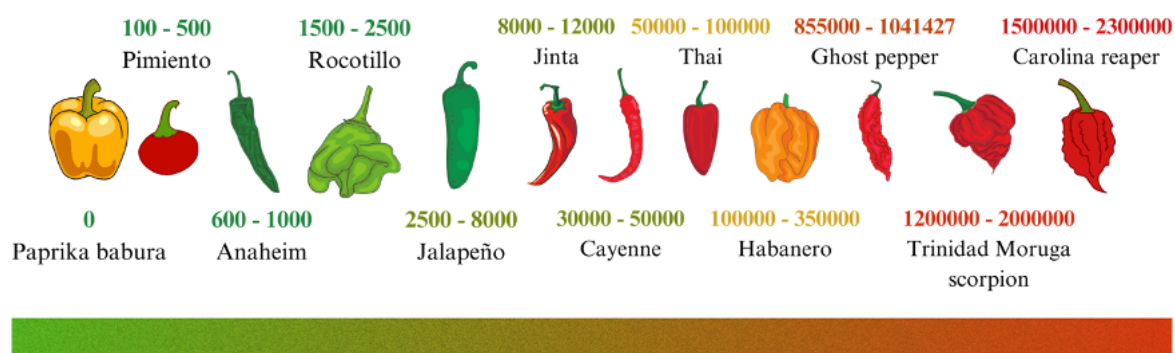
Kapsaicin (8-metil-N-vanilil-6-nonenamid) je kristalni, lipofilni alkaloid bez boje i mirisa, molekulske formule $C_{18}H_{27}NO_3$.



Slika 5. Kemijska struktura kapsaicina.

Član je obitelji vaniloida koji posjeduju vanilil(4-hidroksi-3-metoksibenzil) skupinu koja je zaslužna za njegovu biološku aktivnost. Strukturno, kao i drugi vaniloidi, kapsaicin ima benzenski prsten i dugi hidrofobni ugljikov rep s polarnom amidnom skupinom (Slika 2.). Budući da nije topljiv u vodi, za njegovo se otapanje koriste alkoholi i druga organska otapala. Kapsaicin i dihidrokapsaicin čine 80 – 90 % ukupnih kapsaicinoida koji se nalaze u papričicama u koncentracijama od 0,1 - 1,0 %, odnosno u omjeru 1:1 - 2:1. Sami kapsaicin u velikim je količinama prisutan u tkivu posteljice koja sadrži sjemenke, unutarnjim ovojnica i, u manjoj mjeri, drugim mesnatim dijelovima plodova roda *Capsicum* [9].

Stupanj ljutine karakterizira se pomoću Scovilleovih jedinica (engl. *Scoville Heat Units, SHU*) mjenjenih na temelju koncentracije kapsaicinoidnih spojeva u čili papričicama. SHU ljestvica mjeri koliko je puta ekstrakt razrijeđen kako bi oština, odnosno ljutina papričice postala neprimjetna u zašećerenoj vodi. Za dobivanje SHU vrijednosti, vrijednost koncentracije kapsaicina u mg L⁻¹ množi se sa 16 jer čisti kapsaicin ima čak 16 milijuna Scovilleovih jedinica [10, 11]. Prema ovoj ljestvici, čili papričica Pimiento ima 100 - 500 SHU, Jinta čili 8000 – 12000 SHU, a Trinidad Moruga scorpion ima 1,2 milijuna SHU.



Slika 6. Scovilleova ljestvica ljutine.

2.4. Ekstrakcija krutina-kapljevina

Ekstrakcija krutina-kapljevina (engl. *Solid-Liquid Extraction, SLE*) ravnotežni je separacijski proces uklanjanja jedne ili više komponenti iz čvrste smjese uz pomoć selektivnog otapala [12]. Ova tehnika od iznimne je važnosti jer se intenzivno koristi u prehrambenoj (npr. ekstrakcija šećera iz šećerne trske ili šećerne repe; izolacija biljnih ulja iz različitih sjemenki) i farmaceutskoj industriji (npr. ekstrakcija aktivnih komponenti iz ljekovitog bilja) [13].

Otapala koja se obično koriste pri ekstrakciji komponenata iz hrane su voda, etanol (ili mješavine voda-etanol), heksan i ugljikov dioksid. Pri samom odabiru otapala treba uzeti u obzir njegovu topljivost, selektivnost, cijenu i sigurnost. Pritom svojstva prikladnog ekstrakcijskog otapala uključuju visoku topljivost za ciljane spojeve, selektivnost, nisku toksičnost, nisku hlapljivost, toplinsku stabilnost, inertnost, lako uklanjanje, dostupnost, kompatibilnost s analitičkim tehnikama i ekološku prihvatljivost [13].

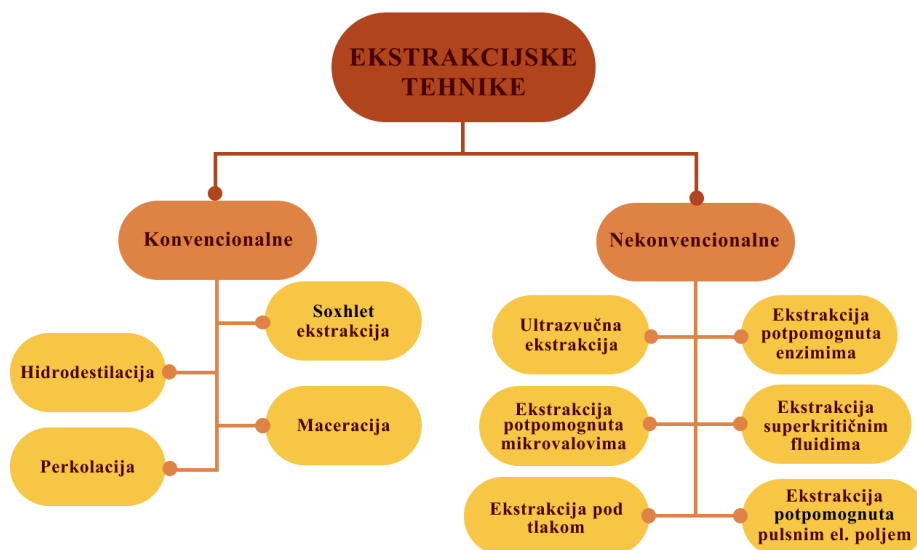
Tijekom ekstrakcije, koncentracija otopljene tvari unutar krutine varira što dovodi do nestacionarnog ili nestabilnog stanja [14]. Niz fenomenoloških koraka mora se odvijati tijekom međudjelovanja između čestica koje sadrže otopljenu tvar i otapala koje utječe na odvajanje:

- Difuzija otapala u krutu matricu
- Otapanje i/ili razgradnja komponenata
- Prijenos otopljene tvari na vanjsku površinu krute matrice
- Migracija ekstrahirane otopljene tvari s vanjske površine krutine u masu otopine
- Kretanje ekstrakta u odnosu na krutinu (tj. istiskivanje ekstrakta)
- Odvajanje i ispuštanje ekstrakta i krutine

Postizanje maksimalnog iskorištenja i najviše kvalitete željenih spojeva glavni je cilj procesa ekstrakcije [13].

2.5. Tehnike ekstrakcije kapsaicina

Ekstrakcija kapsaicina, ali i drugih bioaktivnih komponenata iz biljaka, može se provesti primjenom različitih tehnika koje se općenito dijele na konvencionalne i nekonvencionalne [15]. Pritom mogu postojati varijacije u postupcima ekstrakcije koje obično ovise o ključnim čimbenicima kao što su vrijeme trajanja ekstrakcije, temperatura, veličina čestica tkiva, omjer otapala i uzorka te pH otapala [13].



Slika 7. Podjela ekstrakcijskih tehnika.

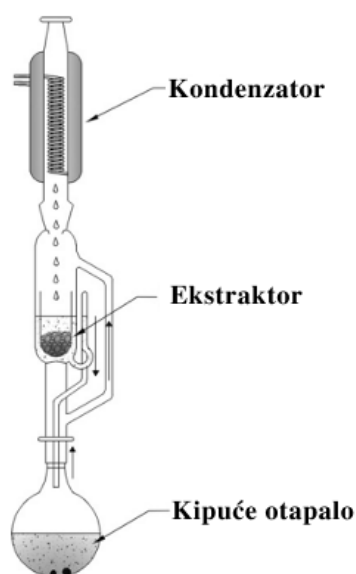
U konvencionalne tehnike ubrajamo maceraciju, perkolaciju, Soxhlet ekstrakciju, hidrodestilaciju i druge, a u nekonvencionalne ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (engl. *Microwave Assisted Extraction, MAE*), ultrazvučnu ekstrakciju (engl. *Ultrasound Assisted Extraction, UAE*), ekstrakciju superkritičnim fluidima (engl. *Supercritical Fluid Extraction, SFE*) i druge [16]. Za potrebe ovog rada odabrane su tehnike ekstrakcija uz magnetsko miješanje, Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija te hidrodestilacija.

2.4.1. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija vrlo je korisna tehnika koja se često koristi za ekstrakciju vrijednih spojeva iz biljnih materijala kao što su lišće, korijenje, sjemenke i stabljike. Učinkovitost ove tehnike uglavnom je u korelaciji s tri međusobno povezana čimbenika: topljivošću, prijenosom tvari i sastavu i svojstvima materijala iz kojeg se vrši ekstrakcija (matrice) [17]. Dakle, prije same provedbe potrebno je razmotriti nekoliko faktora – karakteristike matrice, vrstu otapala, omjer otapala i krutine, temperaturu, tlak i vrijeme ekstrakcije i isparavanja. Vrsta i priroda uzorka određuju broj različitih koraka koji se moraju provesti tijekom postupka pripreme uzorka. U prvom koraku uzorak se obično homogenizira, usitnjava i važe. Kako bi se osigurala optimalna učinkovitost ekstrakcije nepolarnih, ne(polu)hlapljivih organskih spojeva, preporučuje se da se čvrste matrice koje sadrže vodu kao što su tla, biljna tkiva, hrana, sedimenti, kanalizacijski mulj i sl. osuše sredstvom za sušenje (npr. natrijev sulfat) prije

Soxhlet ekstrakcije. Prisutnost vode u uzorku može smanjiti učinkovitost ekstrakcije otapalom, što dovodi do niskog iskorištenja nepolarnih spojeva.

Soxhlet ekstrakcija obično ne zahtijeva ekstremne procesne uvjete, zbog čega je najvažniji aspekt odabir odgovarajućeg otapala za ekstrakciju ciljanih spojeva. Budući da izbor otapala značajno utječe na učinkovitost ekstrakcije, odabir otapala trebao bi se temeljiti na njegovoj sposobnosti da otopi ciljane spojeve bez utjecaja na matricu uzorka. Pritom treba uzeti u obzir vrstu uzorka i interakcije između spojeva i matrice uzorka. Spojevi ponekad mogu biti čvrsto vezani za matricu pa je potrebno odabrati otapalo koje će pocijepati tu vezu. Važan aspekt u tom pogledu je polarnost ekstrakcijskog otapala. Polarnost otapala treba biti slična onoj ciljanih spojeva; ako su molekule ciljanog spoja polarne, onda otapalo također treba biti polarno kako bi se osigurao dobar kontakt i otapanje spoja. U suprotnom, ako su spojevi nepolarni, potrebno je koristiti nepolarno otapalo [17].



Slika 8. Konvencionalni Soxhlet ekstraktor [17].

Soxhlet ekstrakcija ima neke vrlo važne prednosti:

- Uzorak se kontinuirano izlaže svježim dijelovima otapala, omogućujući spojevima da se otapaju i ponovno kondenziraju u tikvicu; ovakav neprestani ciklus održava dinamičku ravnotežu između uzorka i otapala
- Zagrijavanje destilacijske tikvice osigurava relativno visoku temperaturu tijekom cijelog procesa ekstrakcije
- Metodologija je jednostavna – potrebno je vrlo malo specijalizirane obuke

- Nije potrebno filtriranje nakon ispiranja
- Uređaj je jednostavan i jeftin
- Moguća je istodobna izvedba ekstrakcije iz više uzoraka, čime se može povećati propusnost uzorka
- Ekstrakcija spojeva može se izvesti iz veće mase uzorka u usporedbi s drugim tehnikama ekstrakcije iz krutih uzoraka; širok raspon spojeva može se ekstrahirati iz različitih čvrstih matrica
- Brojni suvremeni analitički postupci temelje se na ovoj tehnici

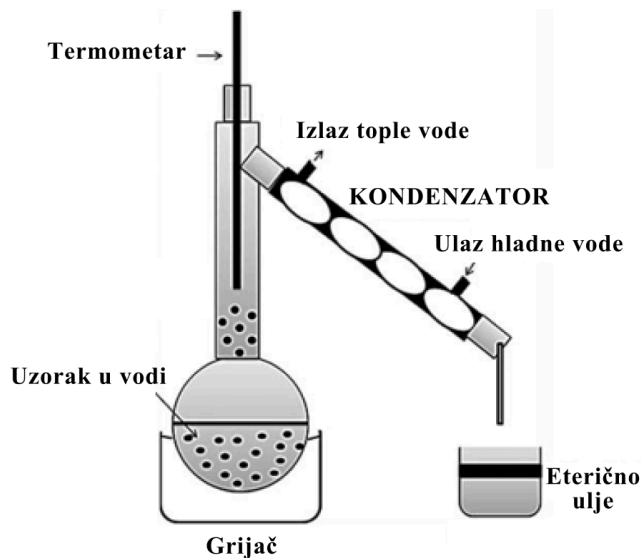
Međutim, također ima neke značajne nedostatke:

- Vrijeme ekstrakcije je dugo (do 48 sati)
- Koriste se velike količine otapala pa se javlja problem pravilnog zbrinjavanja otpada
- Spojevi se mogu termički razgraditi tijekom dugog procesa ekstrakcije
- Nakon ekstrakcije potreban je korak isparavanja/koncentriranja

Usprkos ovim nedostacima, Soxhlet ekstrakcija i danas služi i kao referentna tehnika za ekstrakciju iz krutih uzoraka s kojom se uspoređuje učinkovitost mnogih drugih ekstrakcijskih tehnika.

2.4.2. Hidrodestilacija

Hidrodestilacija je konvencionalna metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva i eteričnih ulja iz biljaka. Postoje tri vrste hidrodestilacije: destilacija vodom, destilacija vodom i vodenom parom i izravna destilacija vodenom parom [18]. Kod postupka hidrodestilacije, biljni materijali prvo se stavljaju u odjeljak za destilaciju, a zatim se doda dovoljna količina vode koja se zagrijava do vrenja. Alternativno, para se izravno dovodi u kontakt s biljnim materijalom. Prodiranjem vruće vode ili vodene pare u biljna tkiva (hidrodifuzija), dolazi do oslobađanja bioaktivnih spojeva. Nakon ekstrakcije, parna smjesa vode i ulja, koja sadrži ekstrahirane bioaktivne spojeve, kondenzira se neizravnim hlađenjem. Ovako kondenzirana smjesa zatim teče iz kondenzatora u separator gdje se ulje, uslijed manje gustoće, prirodno odvaja od vode te se skuplja za daljnju upotrebu.



Slika 9. Aparatura za ekstrakciju hidrodestilacijom [18].

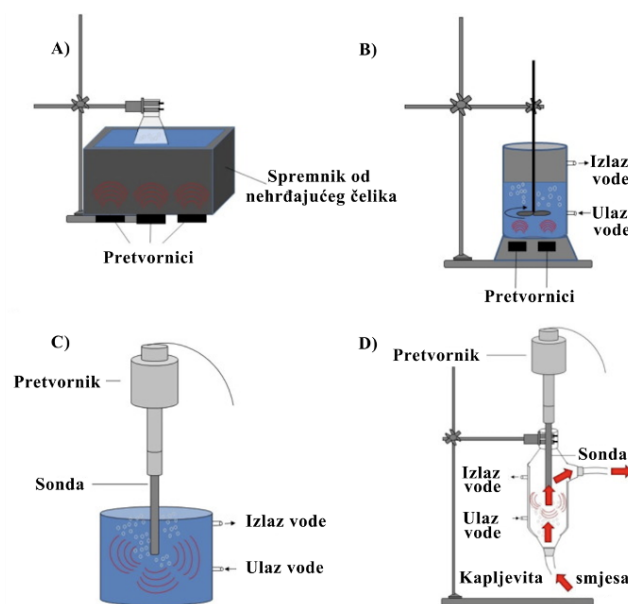
Hidrodestilacija općenito može obuhvaćati tri fizikalno-kemijska procesa: hidrodifuziju, hidrolizu i toplinsku razgradnju. Navedeni procesi se ne odvijaju uvijek, već njihova pojava ovisi o različitim faktorima poput vrste biljnog materijala te procesnih uvjeta, ponajviše temperature. Pri višim temperaturama ekstrakcije može doći do gubitka hlapljivih spojeva, odnosno spojeva niskih vrelišta, uslijed njihovog isparavanja. Upravo to predstavlja glavni nedostatak ove tehnike te u određenoj mjeri ograničava njenu upotrebu [18].

Učinkovitost ekstrakcije bilo koje konvencionalne metode uglavnom ovisi o izboru otapala.

2.4.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija ili ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom koristi ultrazvučnu energiju i otapala za ekstrakciju ciljanih spojeva iz različitih biljnih matrica. Ultrazvuk je mehanički val čija je frekvencija (> 20 kHz) viša od čujnog frekvencijskog raspona ljudskog sluha (20 Hz do 20 kHz) [19]. Ti se valovi sastoje od niza ciklusa kontrakcije i ekspanzije koji se mogu širiti kroz kruti, kapljeviti ili plinoviti medij, inducirajući premještanje i pomak molekula s njihovih izvornih pozicija. Kod zvučnih valova visokog intenziteta, negativni tlak tijekom ekspanzije premašuje privlačnu silu koja spaja molekule zajedno, razdvajajući ih i stvarajući kavitacijske mjehuriće. Ovi mjehurići rastu kroz koalescenciju i kasnije kolabiraju tijekom faze kontrakcije, stvarajući tzv. „vruće točke“ i ekstremne lokalne uvjete. Temperatura

može doseći i do 5000 K, a porast tlaka može biti i do 1000 atm. Te vruće točke ubrzavaju biokemijske reakcije u njihovoj blizini.



Slika 10. Različiti ultrazvučni sustavi: A) Ultrazvučna kupka, B) Ultrazvučni reaktor s miješalom, C) Ultrazvučna sonda, D) Kontinuirana sonikacija ultrazvučnom sondom [20].

Akustična kavitacija je glavni mehanizam koji je uključen u ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom. Kavitacijski mjehurići koji kolabiraju i zvučni valovi mogu izazvati jedan ili kombinaciju više fenomena kao što su fragmentacija, lokalizirana erozija, stvaranje pora, posmična sila, povećana apsorpcija i indeks bubrenja u staničnoj matrici biljke. Kavitacijski mjehurići koji kolabiraju stvaraju udarne valove, a ubrzani međučestični sudari uzrokuju fragmentaciju stanične strukture. Brza fragmentacija dovodi do otapanja bioaktivne komponente u otapalu zbog smanjenja veličine čestica, povećane površine i velikih brzina prijenosa tvari u graničnom sloju krute matrice. Ultrazvuk dovodi do lokaliziranog oštećenja biljnog tkiva koje se naziva erozija. Ova se erozija također može pripisati imploziji kavitacijskih mjehurića na površini biljnog tkiva. Erodirani dio olakšava kontakt otapala s bioaktivnim spojevima unutar biljnog materijala, povećavajući učinkovitost ekstrakcije. Stvaranje pora tijekom kavitacije, fenomen poznat pod imenom "sonoporacija", u staničnim membranama rezultira otpuštanjem bioaktivnih spojeva prisutnih u stanicama. Dodatno, stvaranje i kolaps kavitacijskih mjehurića izazivaju smične sile i turbulencije unutar kapljevine. Rezultat toga jest razgradnja staničnih stijenki, što pridonosi oslobađanju bioaktivnog spoja. Ultrazvuk povećava apsorpciju vode komine, čime se povećava dostupnost vode kao otapala

za bioaktivne spojeve koji se ekstrahiraju, zajedno s povećanom difuznošću samih bioaktivnih spojeva. Ultrazvuk također povećava indeks bubrenja matrice biljnog tkiva, što pomaže u desorpciji i difuziji otopljenih tvari. Povećanje prinosa kod ultrazvučne ekstrakcije ne može se pripisati samo jednom mehanizmu, već je rezultat kombiniranog učinka svih navedenih mehanizama [19].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U sklopu ovog rada provedena je ekstrakcija kapsaicina iz tri različite vrste čili papričica korištenjem četiri različite ekstrakcijske tehnike. Cilj rada bio je odrediti početnu koncentraciju kapsaicina za svaku od papričica te procijeniti stabilnost dobivenih ekstrakata mjerenjem iste u različitim vremenskim intervalima. Također je bilo potrebno utvrditi utjecaj čimbenika poput vrste papričice, ekstrakcijske tehnike i procesnih uvjeta na učinkovitost ekstrakcije, odnosno dobivenu koncentraciju kapsaicina u ekstraktu.

3.1. Materijali i kemikalije

Tri različite vrste sušenih cijelih čili papričica naručene su od njemačkog dobavljača „Chili Food“ (67098, Bad Dürkheim):

- Pimiento (*Capsicum annuum*)
- Jinta (*Capsicum annuum*)
- Trinidad Moruga scorpion (*Capsicum chinense*)



Slika 11. Korištene čili papričice; Pimiento (lijevo), Jinta (sredina) i Trinidad Moruga scorpion (desno).

Za provedbu ekstrakcijskih tehnika te analize dobivenih ekstrakata korištene su sljedeće kemikalije:

- Apsolutni etanol, GRAM-MOL d.o.o.
- Kapsaicin (Prirodni) CAS RN ®: 404-86-4 >60,0%, TCI



Slika 12. Korištene kemikalije; apsolutni etanol (lijevo) i kapsaicin (desno).

3.2. Priprava uzoraka

Čili papričice ravnomjerno su narezane na manje komadiće kuhinjskim nožem kako bi se povećala specifična međufazna površina. Konvencionalno usitnjavanje u tarioniku bilo neodrživo zbog njihove žilave teksture i otpornosti. Jedan dio ovako pripremljenih uzoraka direktno je korišten za ekstrakciju, dok je drugi dio podvrgnut infracrvenom sušenju na 90 °C uz pomoć analizatora vlage KERN DBS 60-3.



Slika 13. Pripremljeni uzorci čili papričica (lijevo); provedba infracrvenog sušenja čili papričica (desno).

3.3. Tehnike ekstrakcije kapsaicina

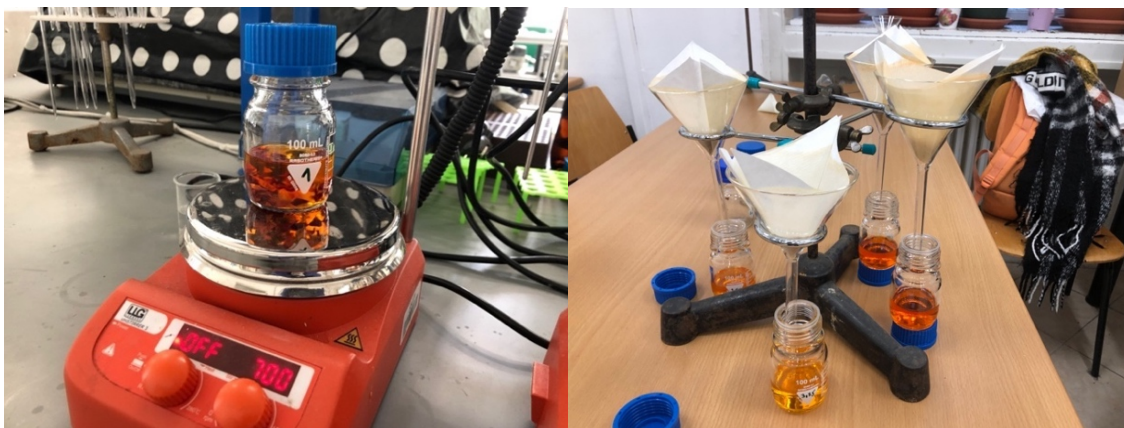
Za potrebe ekstrakcije kapsaicina iz prethodno pripremljenih uzoraka čili papričica korištene su sljedeće ekstrakcijske tehnike:

- Ekstrakcija uz magnetsko miješanje
- Soxhlet ekstrakcija
- Ultrazvučna ekstrakcija
- Hidrodestilacija

3.3.1. Ekstrakcija kapsaicina uz magnetsko miješanje

Ekstrakcija kapsaicina uz magnetsko miješanje provodila se pri temperaturama $T = 25$ i $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ te brzini okretaja miješala od 700 o/min u vremenskim ciklusima u trajanju od $t = 0,5$; 1; 2 i 3 sata. Uzorci su stavljeni u Schott bočice volumena $V = 100\text{ mL}$ zajedno s magnetom. Kao otapalo je korišten apsolutni etanol i njegov je volumen iznosio $V = 50\text{ mL}$, a masa svakog uzorka čili papričica iznosila je približno $m = 1\text{ g}$.

Nakon ekstrakcije, suspenzija je filtrirana preko običnog lijevka uz pomoć filter papira.



Slika 14. Provedba ekstrakcije kapsaicina uz magnetsko miješanje (lijevo), filtracija nakon ekstrakcije (desno).

3.3.2. Soxhlet ekstrakcija kapsaicina

Soxhlet ekstrakcija kapsaicina provodila se za „svježe“ uzorke papričica te za uzorke koji su prethodno podvrgnuti infracrvenom sušenju. Kao otapalo je korišten apsolutni etanol

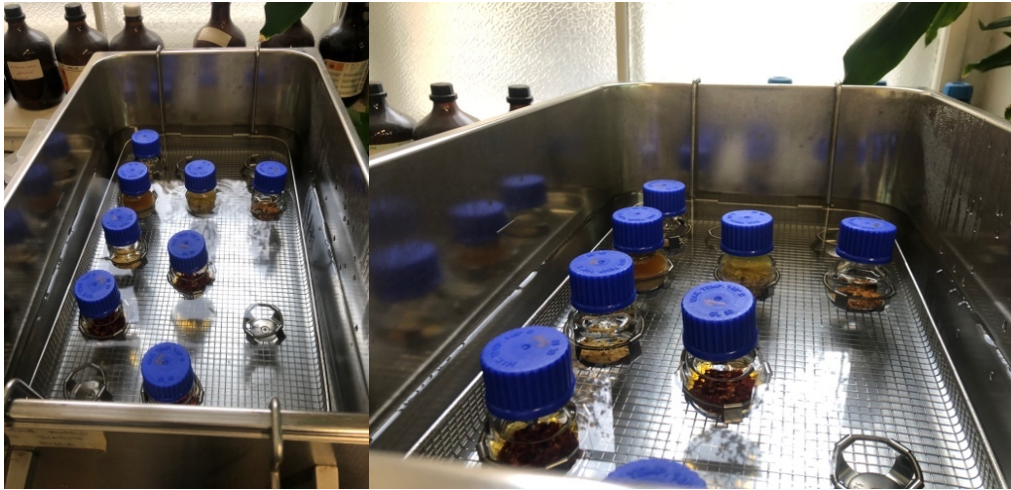
volumena $V = 250$ mL koji je dodan u tikvicu s okruglim dnom zajedno s kamenčićima za vrenje radi sprječavanja zakašnjelog vrenja. Tikvica se potom se postavila u električni grijač te prekrila aluminijskom folijom radi smanjenja gubitka topline u okoliš. Uzorci su stavljeni u posudu za ekstrakciju, u tuljac napravljen od filter papira. Masa svakog uzorka iznosila je približno $m = 14$ g, a vrijeme ekstrakcije iznosilo je 3 sata nakon što je uočena prva kap destilata.



Slika 15. Provedba Soxhlet ekstrakcije kapsaicina.

3.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija kapsaicina

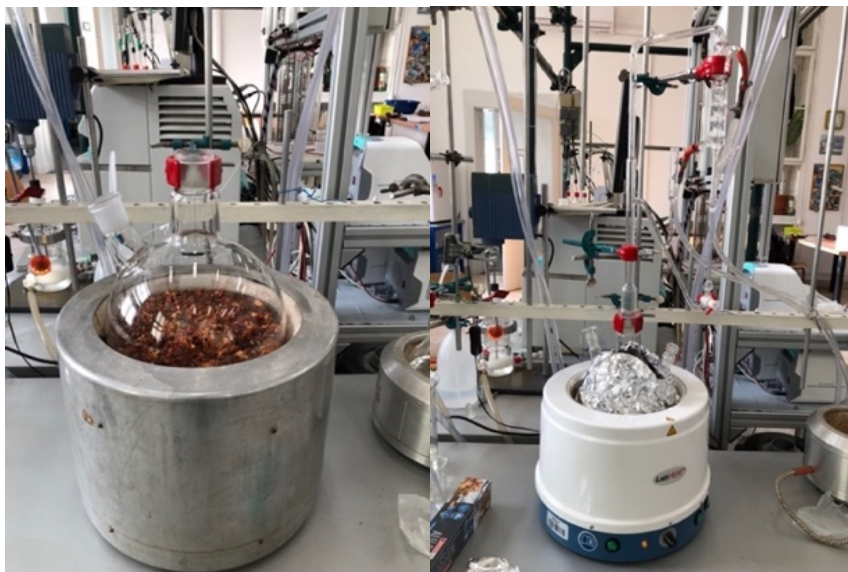
Ultrazvučna ekstrakcija kapsaicina iz čili papričica provodila se pri temperaturama $T = 25$ °C i 50 °C u trajanju od 30 minuta. Uzorci su stavljeni u Schott bočice volumena $V = 100$ mL. Kao otapalo je korišten apsolutni etanol volumena $V = 50$ mL, a masa svakog uzorka iznosila je približno $m = 1$ g.



Slika 16. Provedba ultrazvučne ekstrakcije kapsaicina.

3.3.4. Ekstrakcija kapsaicina hidrodestilacijom

Ekstrakcija kapsaicina hidrodestilacijom provodila se u aparaturi prema Clevengeru za uzorke čili papričica mase $m = 80$ g. Uzorci su se stavljali u tikvicu s okruglim dnom volumena $V = 1$ L, odnosno $V = 2$ L zajedno sa kamenčićima za vrenje. Nakon toga dodana je destilirana voda volumena $V = 500$ mL u tikvicu volumena 1 L, odnosno volumena $V = 1$ L destilirane vode u tikvicu volumena 2 L. Tikvica se potom postavila u električni grijač te prekrila aluminijskom folijom radi smanjenja gubitka topline u okoliš. Vrijeme hidrodestilacije iznosilo je 3 sata nakon što je uočena prva kap destilata. Po završetku postupka se očitao volumen ekstrahiranog ulja (ukoliko ga je bilo) na graduiranom dijelu aparature.



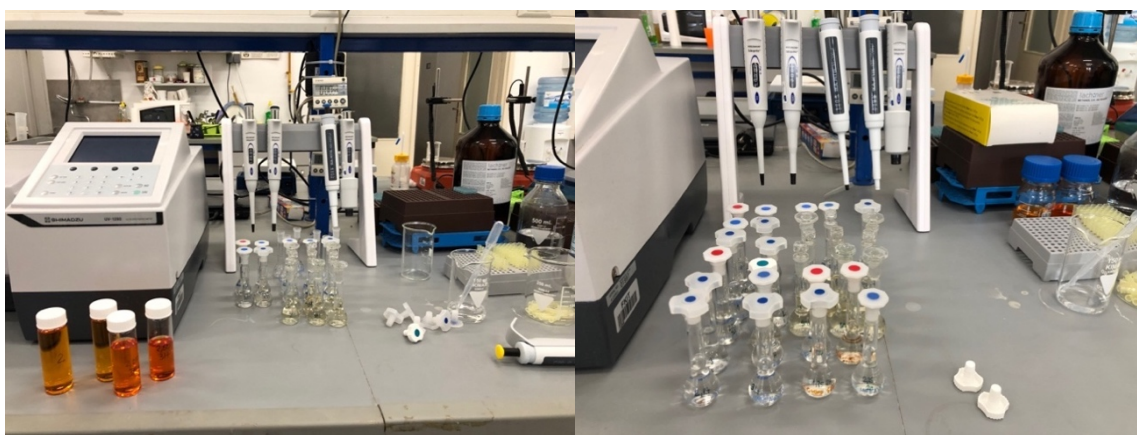
Slika 17. Provedba ekstrakcije kapsaicina hidrodestilacijom.

3.4. Tehnike analize uzoraka

3.4.1. UV/Vis spektrofotometrija

Za analizu dobivenih ekstrakata, odnosno određivanje koncentracije kapsaicina u dobivenim ekstraktima, korištena je UV/Vis spektrofotometrija. Nakon provedbe ekstrakcije uz magnetsko miješanje, Soxhlet ekstrakcije te ultrazvučne ekstrakcije, svi uzorci analizirani su uz pomoć Shimadzu UV-1280 UV/Vis spektrofotometra.

Za potrebe provođenja spektrofotometrijske analize, uzorci su u različitim omjerima (ovisno o očekivanoj koncentraciji kapsaicina u ekstraktu) razrjeđivani apsolutnim etanolom u tikvici volumena $V = 10$ mL. Prije provedbe mjerenja za uzorke na spektrofotometru snimljen je spektar otapala, odnosno apsolutnog etanola, kako bi se dobila bazna linija. Kvarcna kiveta je zatim isprana malom količinom uzorka u svrhu uklanjanja potencijalnih nečistoća, kako bi se osigurala što točnija mjerenja. Snimanje spektara provodilo se pri valnoj duljini od $\lambda = 281$ nm, s obzirom da ta valna duljina prema literaturnim podacima predstavlja maksimalnu valnu duljinu apsorpcije za kapsaicin u UV/Vis spektru.



Slika 18. Provedba spektrofotometrijske analize ekstrakata.

Za određivanje koncentracije kapsaicina u svakom pojedinom ekstraktu, odnosno za dobivanje kalibracijskog pravca, pripravljena je standardna otopina čistog kapsaicina koncentracije $\gamma = 100$ mg L⁻¹. Na preciznoj analitičkoj vagi izvagana je masa čistog kapsaicina koja je iznosila $m = 10,00$ mg. Prilikom vaganja bilo je važno oprezno rukovanje te nošenje adekvatne zaštitne opreme s obzirom da čisti kapsaicin posjeduje izrazito iritirajuća svojstva koja mogu prouzročiti nadražaj kože i dišnih puteva. Odvaga čistog kapsaicina prebačena je u odmjernu tikvicu volumena $V = 100$ mL koja je zatim dopunjena apsolutnim etanolom do

oznake i stavljena u hladnjak kako bi se duže održala stabilnost otopine. Ovaj je postupak još jednom ponovljen tijekom eksperimentalnog perioda ovog rada pri čemu je uzeta masa čistog kapsaicina od $m = 25,05$ mg te volumen apsolutnog etanola od $V = 250$ mL. Standardne otopine općenito se pripremaju više puta kako bi se poboljšala točnost, smanjile pogreške i potvrdili podaci osiguravajući dosljednost i pouzdanost u laboratorijskim mjerenjima.

3.4.2. Mikrobiološka analiza

Za analizu antimikrobne aktivnosti kapsaicina provela se mikrobiološka analiza ekstrakta dobivenog hidrodestilacijom. Testni organizmi korišteni u svrhu ove analize bili su Gram-negativne bakterijske kulture *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-pozitivne bakterijske kulture *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* te kvasac *Candida lipolytica*.

Hranjive podloge za uzgoj bakterija (hranjivi agar) i kvasca (malt agar) pripremljene su prema uputama proizvođača (Biolife Manual, drugo izdanje, Ingraf, Italija 1991.). Za testiranje osjetljivosti, Mueller Hinton Broth podloge homogenizirane su, dovedene do vrenja i sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri 120 °C i 1,1 atm.

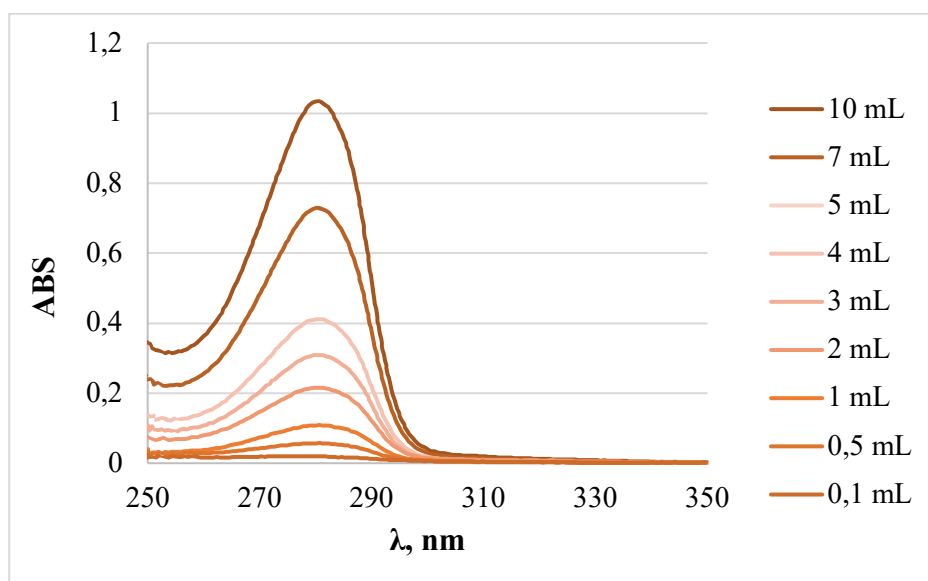
Antimikrobno ispitivanje ekstrakata provedeno je disk-difuzijskim testom, koristeći NCCLS postupak (CLSI, 2012). U Petrijevu zdjelicu s Mueller Hinton Broth podlogom dodano je 0,1 cm³ suspenzije mikroorganizama (koncentracija 10⁶ stanica/cm³), koja je homogenizirana štapićem po Drigalskom. Na podlogu su postavljeni diskovi promjera 6 mm. Na svaki disk naneseo je 0,02 cm³ dobivenog ekstrakta. Zdjelice s bakterijama inkubirane su 24 sata pri 37 °C, dok su zdjelice s kvascem inkubirane 3 dana pri 28 °C. Nakon inkubacije, izmjerene su zone inhibicije koje predstavljaju rezultat antimikrobnog djelovanja kapsaicina na mikroorganizme.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje koncentracije kapsaicina

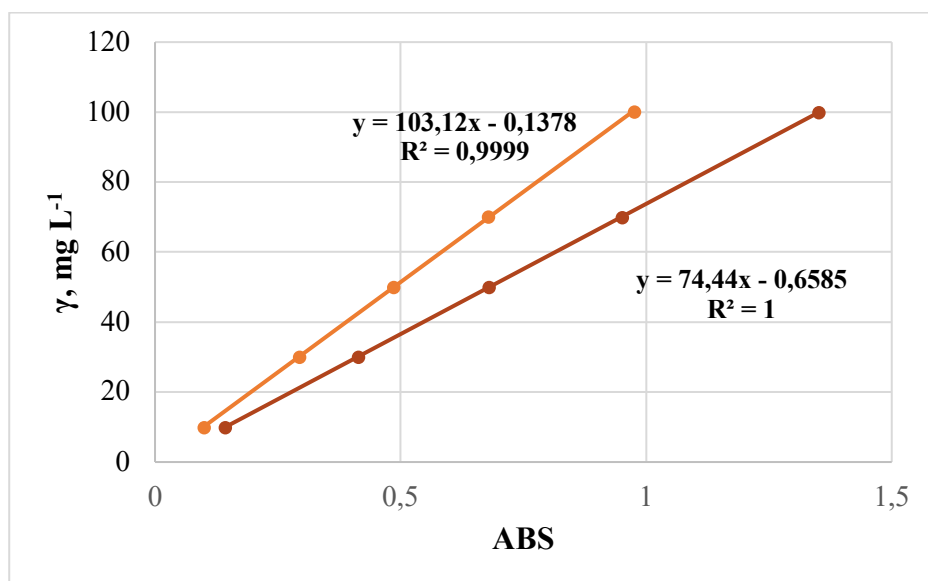
Koncentracija kapsaicina je određivala se UV/Vis spektrofotometrijom. To je usporedbena analitička metoda, prema tome za određivanje koncentracije kapsaicina u dobivenom ekstraktu bilo je potrebno prvo snimiti UV/Vis spektar standardne otopine.

Standardna otopina je postupno razrjeđivana apsolutnim etanolom u različitim omjerima, uz zabilježavanje odgovarajućih UV/Vis spektara za svako razrjeđenje.



Slika 19. UV/Vis spektri standardne otopine kapsaicina.

Na temelju dobivenih spektara vidljiva je povezanost između volumena standardne otopine, a samim time i koncentracije kapsaicina, i intenziteta apsorpcije. Svaka otopina pokazala je za kapsaicin karakteristični maksimum apsorpcije u rasponu 280 - 290 nm, međutim on je najizraženiji kod prvotno pripremljene standardne otopine kapsaicina.



Slika 20. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kapsaicina.

Sljedeći korak bio je prikazati baždarni dijagram na temelju dobivenih podataka. To je grafički prikaz ovisnosti početne koncentracije, u ovom slučaju koncentracije standardne otopine, o apsorbanciji. Prikazani baždarni dijagram (slika 20.) odnosi se na standardnu otopinu kapsaicina analiziranu u različitim vremenskim intervalima. Pritom, crvena linija predstavlja prvo mjerenje (na dan kada je standardna otopina pripravljena), a narančasta mjerenje nakon 5 dana od pripreme standardne otopine. Valja napomenuti da oba kalibracijska pravca pokazuju izvanredna podudaranja s promatranim podacima, s obzirom da je R^2 vrijednost 1, odnosno 0,9999. To ukazuje na gotovo savršenu usklađenost između predviđanja modela i stvarnih mjerenja, a ovakva visoka razina slaganja naglašava točnost i pouzdanost procesa kalibracije.

Na temelju baždarnog dijagrama određene su koncentracije kapsaicina u dobivenim ekstraktima koje se nalaze u sljedećim tablicama. U svrhu lakšeg razumijevanja, u preostalom dijelu rada svaka vrsta čili papričice biti će označena brojem; pritom broj 1 označava „Pimiento“ papričicu, broj 2 „Jinta“ papričicu te broj 3 „Trinidad Moruga scorpion“ papričicu.

Tablica 1. Početne koncentracije kapsaicina dobivene ekstrakcijom uz magnetsko miješanje.

t, h	T, °C	γ_1, mg L⁻¹	γ_2, mg L⁻¹	γ_3, mg L⁻¹
0,5	25	73,90	45,03	1248,44
1	25	138,87	72,87	1257,37
2	25	140,90	151,21	1440,21
2	50	171,84	223,40	1914,56
3	25	180,11	261,23	937,01
3	50	251,27	208,99	1125,72

Tablica 2. Početne koncentracije kapsaicina dobivene Soxhlet ekstrakcijom.

Stanje	γ_1, mg L⁻¹	γ_2, mg L⁻¹	γ_3, mg L⁻¹
Svježa	1292,43	997,51	5355,35
Sušena	1669,85	1886,40	7648,04

Tablica 3. Početne koncentracije kapsaicina dobivene ultrazvučnom ekstrakcijom.

T, °C	γ_1, mg L⁻¹	γ_2, mg L⁻¹	γ_3, mg L⁻¹
25	131,30	100,36	1212,00
50	189,05	139,55	1273,87

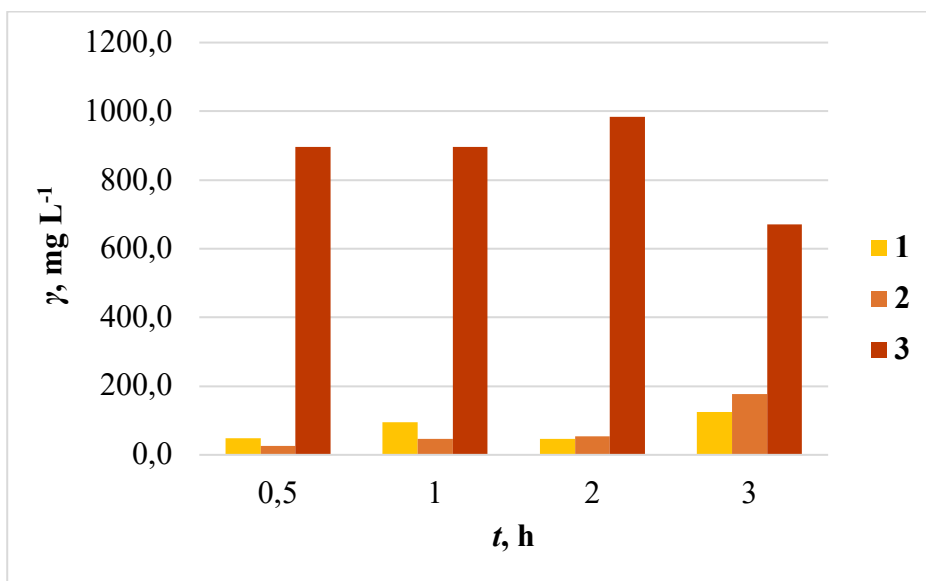
Nakon određivanja koncentracije kapsaicina za svaku pojedinu papričicu, uočeno je da čili papričica „Jinta“ u gotovo svim mjerenjima ima manji sadržaj kapsaicina od papričice „Pimiento“. Ovakvi rezultati nisu u skladu sa literaturnim podacima, prema kojima bi gledajući SHU vrijednosti „Jinta“ papričica trebala biti čak 120 puta ljuća od „Pimiento“. Genetske varijacije, okolišni čimbenici te zrelost papričica samo su neki od potencijalnih faktora koji mogu utjecati na sadržaj kapsaicina u pojedinoj papričici [21].

Čak i unutar iste vrste, čili papričice mogu pokazivati značajnu genetsku raznolikost. Moguće je da su specifični primjerci „Jinta“ i „Pimiento“ korišteni u sklopu ovoga rada posjedovali genetske osobine koje su dovele do nižeg sadržaja kapsaicina u „Jinti“ i višeg sadržaja u „Pimentu“. Nadalje, uvjeti okoliša tijekom rasta papričica, poput sastava tla, temperature, vlažnosti i izloženosti sunčevoj svjetlosti također mogu utjecati na proizvodnju kapsaicina. Osim toga, i faza u kojoj se beru čili papričice može utjecati na njihov sadržaj kapsaicina. Ukoliko su „Jinta“ i „Pimiento“ ubrane u različitim fazama zrelosti, to bi moglo objasniti razliku u razinama kapsaicina. Papričice ubrane kasnije u svom ciklusu rasta obično posjeduju više koncentracije kapsaicina [21].

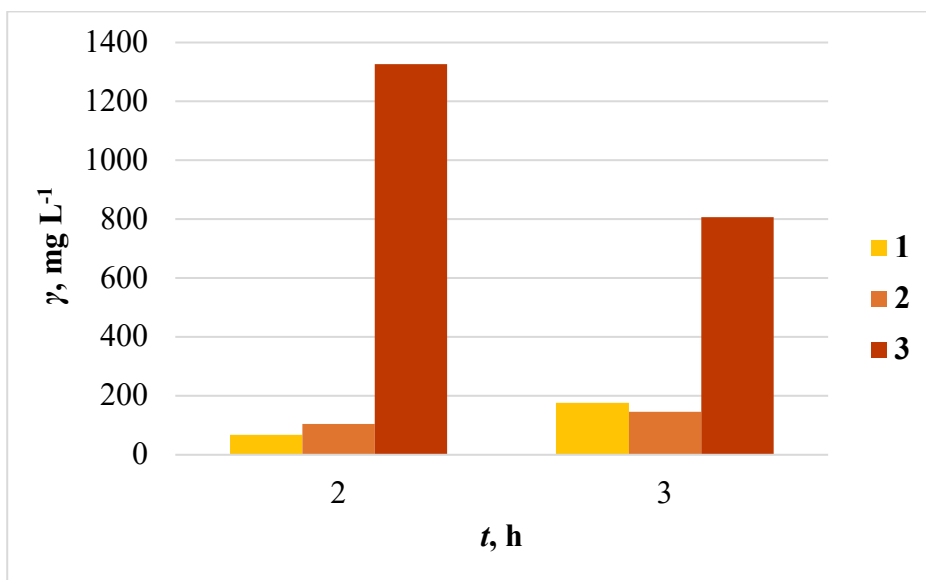
4.2. Utjecaj procesnih uvjeta na učinkovitost ekstrakcije

Jedan od ciljeva ovog rada bio je razlučiti pojedinačne utjecaje različitih čimbenika na cjelokupan proces ekstrakcije, odnosno utvrditi kako ti čimbenici doprinose konačnoj koncentraciji kapsaicina u ekstraktima. U tu svrhu izrađeni su grafički prikazi različitih kombinacija spomenutih čimbenika, a to su:

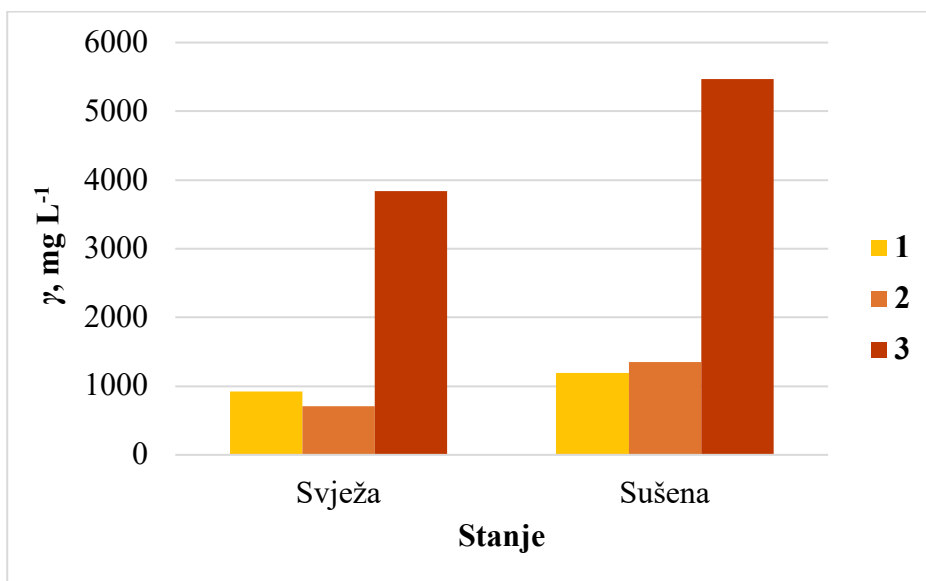
- Vrijeme trajanja ekstrakcije
- Temperatura
- Stanje papričica (svježe/sušene)
- Izbor ekstrakcijske tehnike



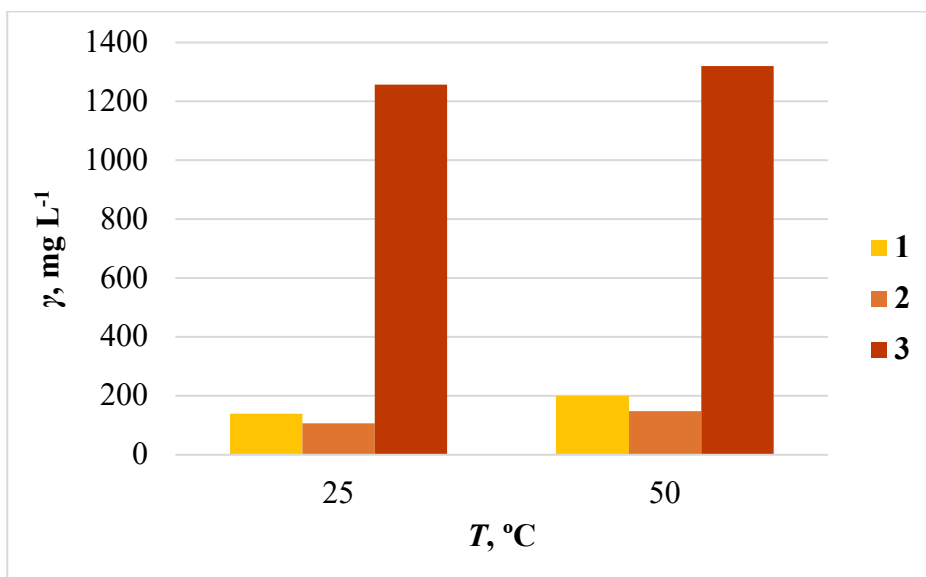
Slika 21. Utjecaj vrste papričica i vremena trajanja procesa na učinkovitost ekstrakcije kapsaicina – magnetska miješalica pri 25 °C.



Slika 22. Utjecaj vrste papričica i vremena trajanja procesa na učinkovitost ekstrakcije kapsaicina – magnetska miješalica pri 50 °C.



Slika 23. Utjecaj vrste papričica i udjela vode na učinkovitost ekstrakcije kapsaicina – Soxhlet ekstrakcija.



Slika 24. Utjecaj vrste papričica i temperature na učinkovitost ekstrakcije kapsaicina – ultrazvučna ekstrakcija.

Ekstrakcija kapsaicina iz čili papričica može biti vrlo složen proces na kojeg utječe mnoštvo različitih čimbenika. Analiza dobivenih rezultata dovela je do nekoliko ključnih spoznaja.

- **Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije**

Prisutna je direktna korelacija između trajanja ekstrakcije i koncentracije kapsaicina u ekstraktu. Duže vrijeme trajanja ekstrakcije rezultira dužim kontaktom biljnog materijala s otapalom [22]. To olakšava razgradnju staničnih stijenki i membrana biljnog materijala, omogućujući temeljitiju difuziju molekula kapsaicina u fazu otapala. Posljedično, veća koncentracija kapsaicina se postiže u ekstraktu.

- **Utjecaj temperature**

Temperatura se također pokazala kao važan faktor koji utječe na učinkovitost ekstrakcije kapsaicina. Prema dobivenim rezultatima, provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama rezultira odgovarajućim povećanjem koncentracije kapsaicina u ekstraktu. Povišene temperature povoljno utječu na topljivost molekula kapsaicina, budući da veća toplinska energija olakšava njihovo oslobađanje iz čili papričica u otapalo [23]. Povišenjem temperature raste i kinetička energija molekula, što uzrokuje češće sudare i brži prijenos tvari te ubrzava difuziju kapsaicina u otapalo.

- **Utjecaj stanja čili papričice**

Rezultati pokazuju da stanje čili papričice, bila ona „svježa“ ili sušena, značajno utječe na učinkovitost ekstrakcije. Ekstrakcija iz suhih čili papričica rezultirala je višim koncentracijama kapsaicina u ekstraktu u usporedbi sa „svježim“ papričicama. Razlog tome može biti kombinacija mnogih različitih čimbenika. Svježe papričice općenito sadrže relativno visok udio vode koja može razrijediti kapsaicin. Papričice korištene za potrebe ovog rada bile su sušene, međutim nakon što su dodatno podvrgnute infracrvenom sušenju ustanovilo se da su sadržavale otprilike 10 – 13 % vode, ovisno o papričici. Smanjenje sadržaja vode (sušenje) olakšava ekstrakciju kapsaicina jer ga čini pristupačnijim otapalu i time direktno doprinosi njegovoj povećanoj koncentraciji u ekstraktu. Također, kako se voda uklanja, kapsaicin i drugi bioaktivni spojevi papričica postaju koncentriraniji [24]. Nadalje, struktura sušenih čili

papričica razlikuje se od svježih – sušene obično imaju porozniju strukturu, zbog čega se ostvaruje bolji kontakt biljnog materijala s otapalom. Tijekom procesa sušenja može doći i do raznih kemijskih promjena. Neke od tih promjena uključuju razgradnju spojeva koji potencijalno mogu ometati ekstrakciju kapsaicina. Osim toga, sušenje pomaže u očuvanju kapsaicina tijekom vremena, s obzirom da voda prisutna u papričicama može pospješiti rast mikroba i razgradnju kapsaicinoida [25].

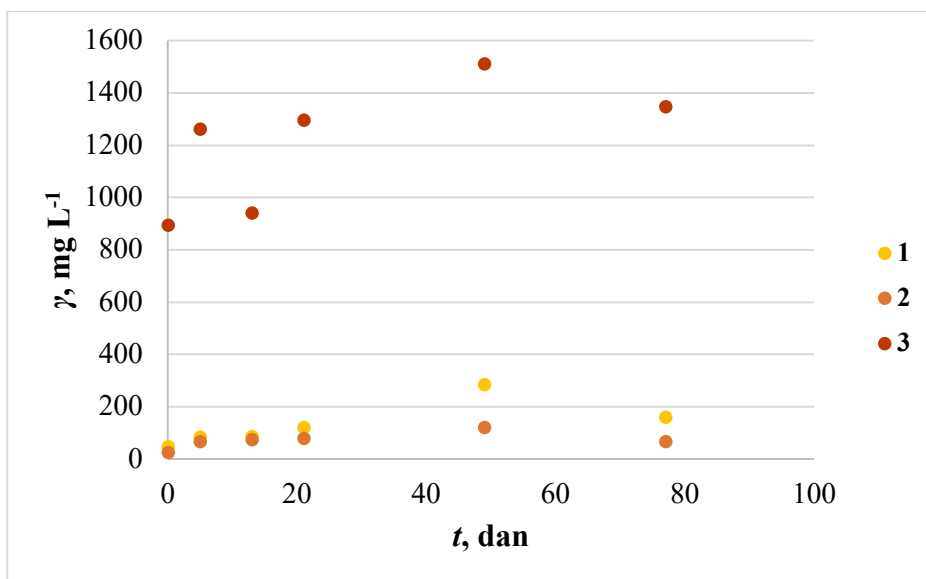
- **Utjecaj izbora ekstrakcijske tehnike**

Izravna usporedba korištenih ekstrakcijskih tehnika prilično je izazovna jer nisu sve provedene pri istim procesnim uvjetima. Međutim, ipak se može ustanoviti kako Soxhlet ekstrakcija dosljedno pokazuje najviše koncentracije kapsaicina u ekstraktu. Razlog tome je činjenica da se ova tehnika provodila pri procesnim uvjetima koji su se pokazali najpovoljnijim za dobivanje povećane koncentracije kapsaicina u ekstraktu, odnosno za povećanje učinkovitosti ekstrakcije – povišena temperatura (temperatura vrenja) i duže vrijeme trajanja ekstrakcije (3 sata). Štoviše, upotreba sušenih čili papričica dodatno je povećala prinose kapsaicina u Soxhlet ekstrakciji uslijed različitih, prethodno navedenih čimbenika.

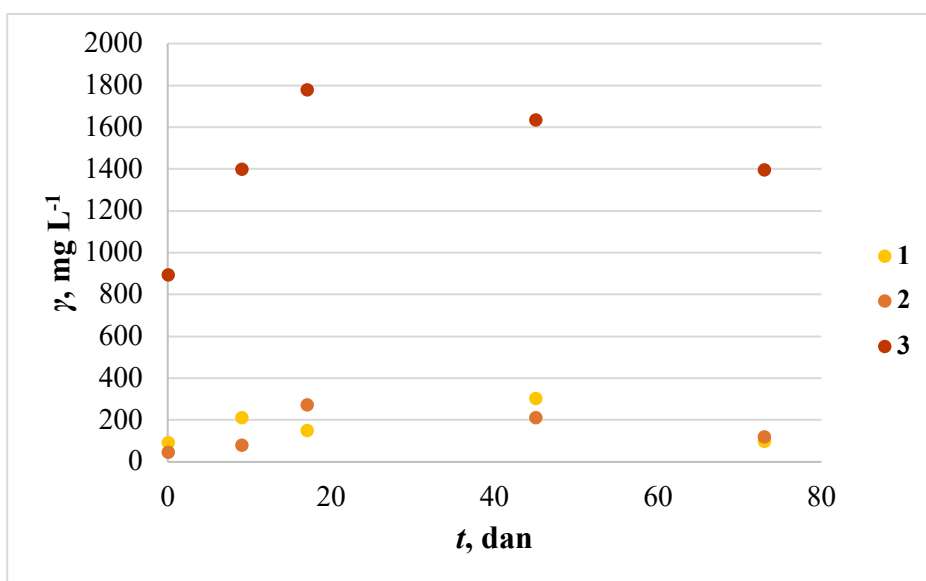
Ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija uz magnetsko miješanje pokazale su usporedive rezultate koji su malo varirali ovisno o specifičnim uvjetima.

4.3. Stabilnost kapsaicina

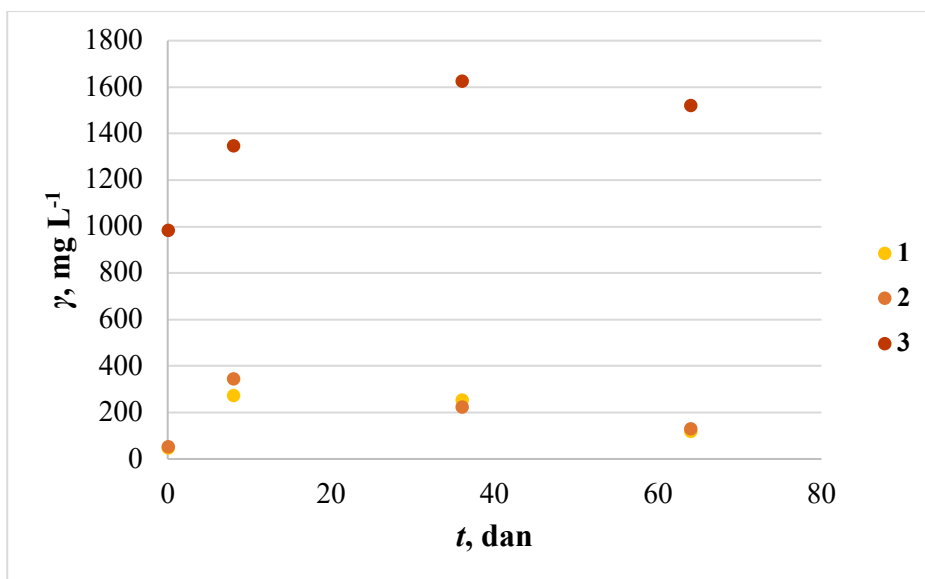
Procjena stabilnosti kapsaicina u dobivenim ekstraktima uključivala je višestruko određivanje njegove koncentracije tijekom vremenskog perioda od otprilike 3 mjeseca. Stabilnost je vizualno prikazana kao korelacija između izmjerenih koncentracija kapsaicina i vremenskog trajanja u danima.



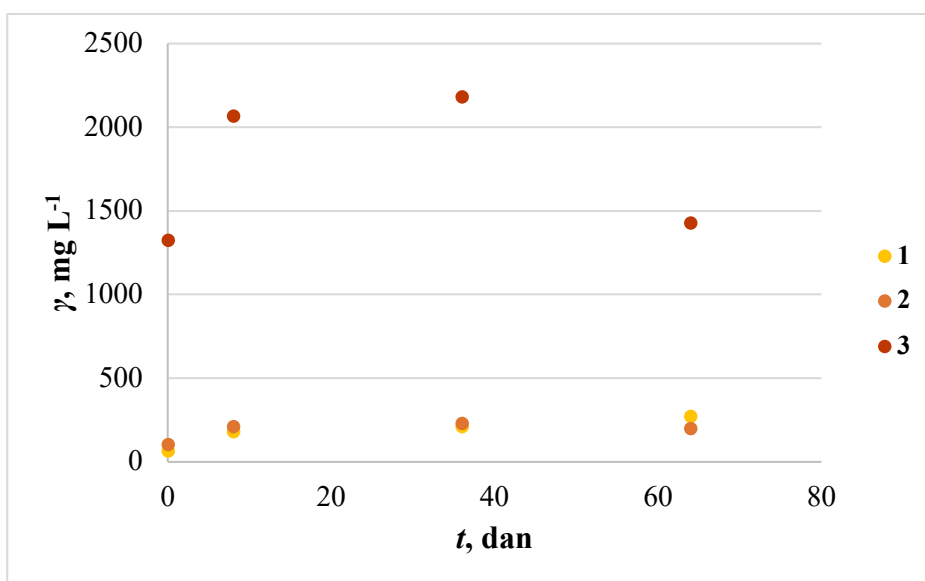
Slika 25. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ekstrakcijom uz magnetsko miješanje (procesni uvjeti: T = 25 °C, t = 0,5 h) s vremenom.



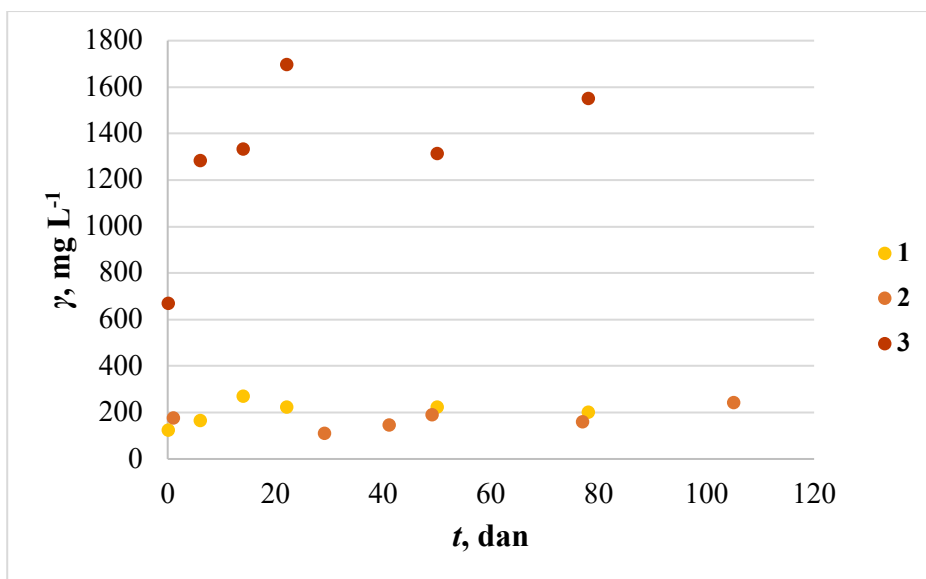
Slika 26. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ekstrakcijom uz magnetsko miješanje (procesni uvjeti: T = 25 °C, t = 1 h) s vremenom.



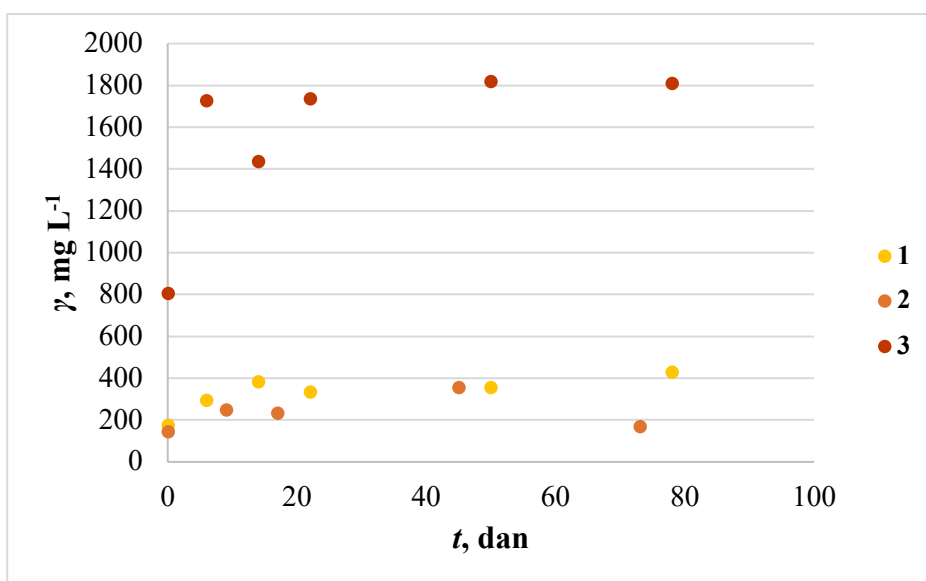
Slika 27. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ekstrakcijom uz magnetsko miješanje (procesni uvjeti: T = 25 °C, t = 2 h) s vremenom.



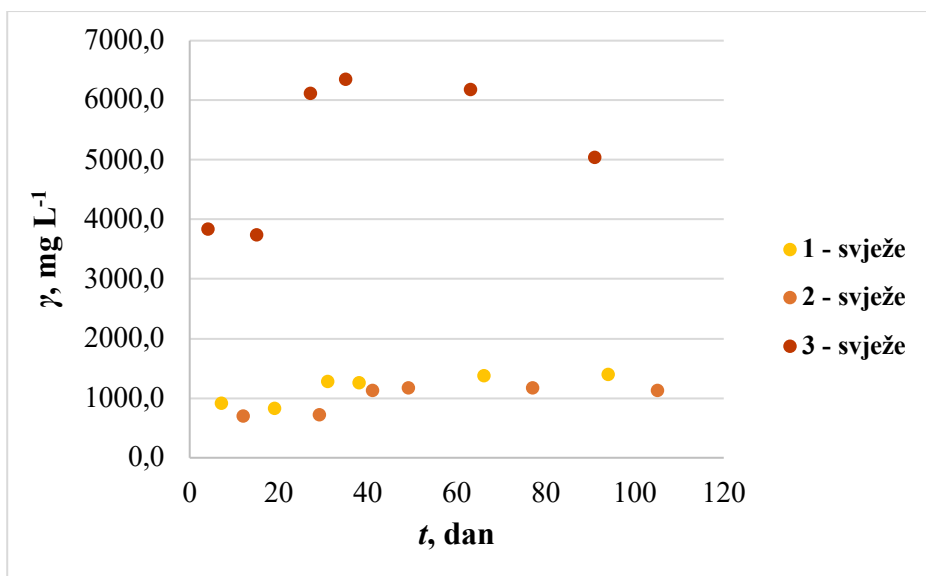
Slika 28. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ekstrakcijom uz magnetsko miješanje (procesni uvjeti: T = 50 °C, t = 2 h) s vremenom.



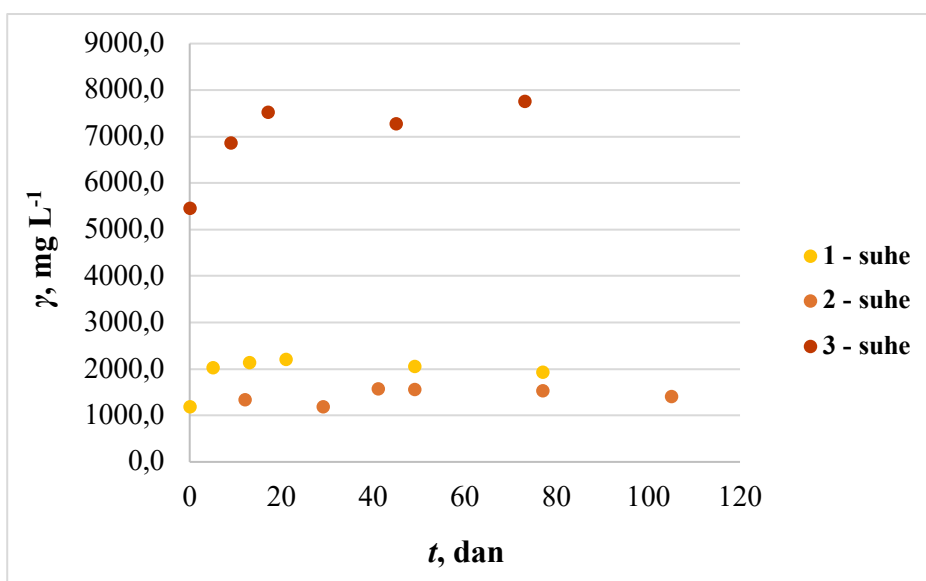
Slika 29. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ekstrakcijom uz magnetsko miješanje (procesni uvjeti: T = 25 °C, t = 3 h) s vremenom.



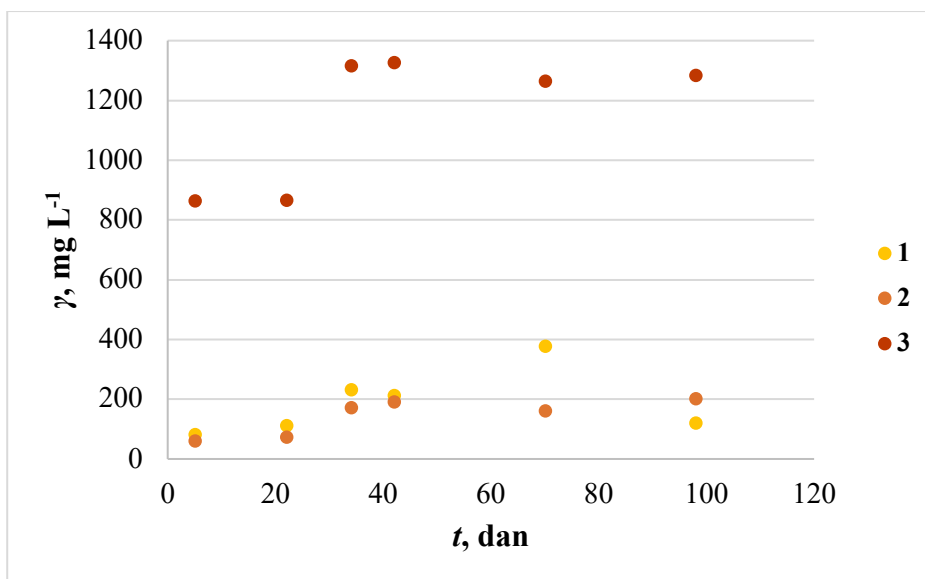
Slika 30. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ekstrakcijom uz magnetsko miješanje (procesni uvjeti: T = 50 °C, t = 3 h) s vremenom.



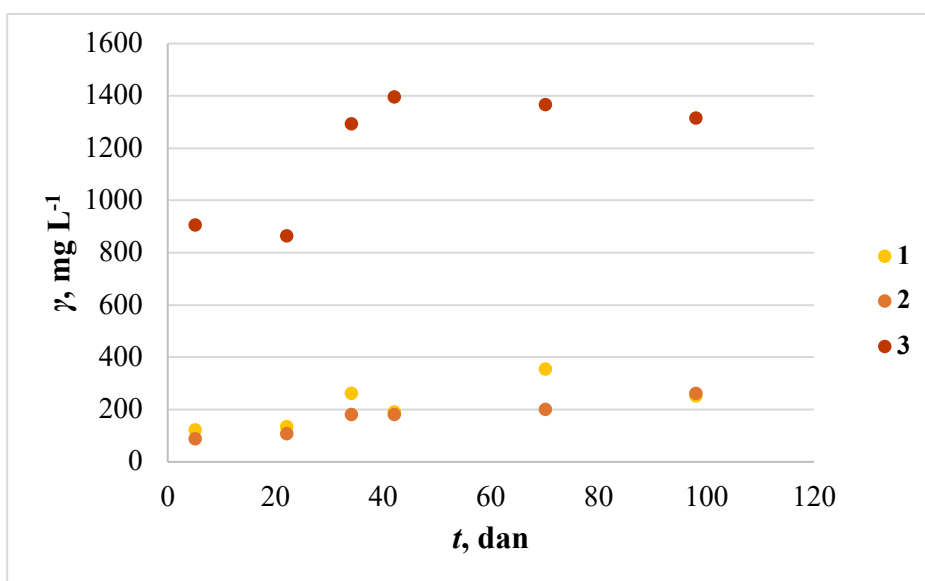
Slika 31. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog Soxhlet ekstrakcijom s vremenom za svježe čili papričice.



Slika 32. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog Soxhlet ekstrakcijom s vremenom za sušene čili papričice.



Slika 33. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ultrazvučnom ekstrakcijom (pri 25 °C) s vremenom.



Slika 34. Promjena koncentracije kapsaicina dobivenog ultrazvučnom ekstrakcijom (pri 50 °C) s vremenom.

Primarni cilj procjene stabilnosti kapsaicina bio je utvrditi kako se njegova koncentracija u ekstraktima mijenja tijekom vremena. Ekstrakti su držani u zatvorenim Schott bočicama i odmjernim tikvicama na sobnoj temperaturi uz minimalno dopiranje sunčeve

svjetlosti. Očekivani ishod pri određivanju stabilnosti bio je da će se koncentracija kapsaicina u ekstraktima s vremenom smanjivati uslijed njegove postupne degradacije, međutim prema gore navedenim grafičkim prikazima uočava se složenija dinamika u podacima. Naime, vidljivo je da dolazi do oscilacija u vrijednostima koncentracije kapsaicina u ekstraktima. Također, u rezultatima se može uočiti neočekivan trend – u većini slučajeva koncentracija kapsaicina u ekstraktima inicijalno raste i dosegne određeni maksimum, nakon čega dolazi do pada. Sve to može biti posljedica djelovanja različitih čimbenika.

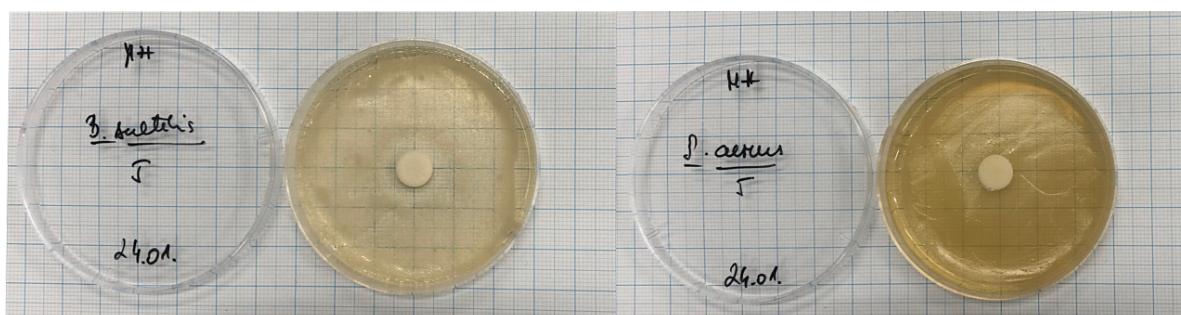
Temperatura te izloženost svjetlosti i kisiku su okolišni čimbenici koji općenito mogu utjecati na stabilnost kapsaicina i brzinu njegove razgradnje. Oscilacije u temperaturi tijekom skladištenja, čak i unutar prihvatljivih granica, mogu potencijalno utjecati na stabilnost kapsaicina. Ekstrakti su bili pohranjeni na sobnoj temperaturi, koja nije konstantna i može prirodno varirati. Povećanje temperature općenito može ubrzati proces razgradnje kapsaicina, dok njeno smanjenje može usporiti ovaj proces. Dakle, promjene temperature tijekom skladištenja mogu biti jedan od faktora koji objašnjavaju oscilacije u koncentraciji kapsaicina u ekstraktima. Izlaganje svjetlosti i kisiku također može utjecati na stabilnost kapsaicina, međutim ovi čimbenici obično dovode do brže razgradnje kapsaicina i njihov utjecaj rezultira smanjenjem koncentracije tijekom vremena. Kapsaicin je osjetljiv na svjetlost jer ona može potaknuti reakcije fotodegradacije u molekulama kapsaicina, čime nastaju razgradni produkti i smanjuje se koncentracija kapsaicina. Kisik, s druge strane, može pokrenuti oksidativne reakcije koje razgrađuju kapsaicin, što također može rezultirati smanjenjem njegove koncentracije [26]. Za bolje razumijevanje specifičnih mehanizama koji se pritom odvijaju potrebni su dodatni eksperimenti i analize, uključujući i istraživanje kinetike razgradnje kapsaicina u apsolutnom etanolu u kontroliranim uvjetima.

Osim okolišnih čimbenika, važno je razmotriti i one eksperimentalne koji ne utječu na samu stabilnost, ali mogu uvelike utjecati na točnost i pouzdanost eksperimentalnih podataka, odnosno dobivenih rezultata. Naime, s obzirom da je analiza ekstrakata uključivala njihovo razrjeđivanje do vrlo niskih koncentracija, izgledno je da je došlo do pogrešaka koje proizlaze iz samog postupka razrjeđivanja ili nesavršenosti mjernog instrumenata. Pri radu s izrazito niskim koncentracijama čak i manje pogreške u mjerenju mogu se činiti neproporcionalno značajnima. Uzevši sve navedeno u obzir, kapsaicin se u dobivenim ekstraktima može smatrati relativno stabilnim.

4.4. Antimikrobna aktivnost kapsaicina

Za potrebe ispitivanja antimikrobne aktivnosti kapsaicina provodila se hidrodestilacija čili papričica, čime je dobiveno eterično ulje bogato kapsaicinom. Pritom je samo pri ekstrakciji čili papričice „Trinidad Moruga scorpion“ dobivena dostatna količina eteričnog ulja koja je iznosila $V = 0,2$ mL. Potencijalni razlog tome je lipofilna priroda kapsaicina, koja nije idealna za visoke prinose kada se voda koristi kao primarno otapalo. Dodatni faktori poput temperature, tlaka i trajanja procesa hidrodestilacije također bi mogli biti uzročnici ovakvog ishoda provedenog procesa.

Dobiveno eterično ulje korišteno je u svrhu mikrobiološke analize, odnosno procjene antimikrobne aktivnosti kapsaicina koje ono sadrži. Kao što je prethodno spomenuto, korišteni testni organizmi bili su bakterijske kulture *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, te kvasac *C. lipolytica*. Rezultati mikrobiološke analize pokazali su da je eterično ulje kapsaicina imalo inhibicijski učinak samo na organizme *B. subtilis* i *S. aureus*. Pritom je promjer zone inhibicije za *B. Subtilis* iznosio $r = 16$ mm, a promjer zone inhibicije za *S. aureus* bio je jednak promjeru diska, odnosno iznosio je $r = 6$ mm.



Slika 35. Prikaz zona inhibicija za eterično ulje kapsaicina.

Obje ove bakterije su Gram-pozitivne, što upućuje na potencijalnu korelaciju antimikrobnih svojstava kapsaicina sa strukturom bakterijske stanične stijenke, međutim ovakva selektivna inhibicija može biti rezultat mnogočega. Sama antimikrobna aktivnost kapsaicina uvelike ovisi o raznim čimbenicima poput bakterijskih vrsti i sojeva, korištenih eksperimentalnih modela te odgovarajućim spojevima i primijenjenoj dozi [27].

Ekstrakti dobiveni ostalim tehnikama ekstrakcije nisu se smatrali prikladnima za procjenu antimikrobne aktivnosti zbog toksičnosti korištenog otapala, apsolutnog etanola, koji bi onemogućio procjenu učinka kapsaicina.

5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog rada provedena je ekstrakcija kapsaicina iz tri različite vrste čili papričica korištenjem četiri odabrane ekstrakcijske tehnike. Ispitan je utjecaj procesnih uvjeta (vrijeme trajanja ekstrakcije, temperatura, stanje čili papričice) te izbora ekstrakcijske tehnike na učinkovitost ekstrakcije. Utvrđena je stabilnost kapsaicina mjerenjem njegove koncentracije u dobivenim ekstraktima u različitim vremenskim intervalima. Provedena je i mikrobiološka analiza kojom je procijenjena antimikrobna aktivnost kapsaicina.

Prema dobivenim rezultatima, najpovoljniji uvjeti za ostvarivanje većeg prinosa kapsaicina u ekstraktima bili su duže vrijeme trajanja ekstrakcije, više temperature te sušene čili papričice. Pritom se Soxhlet ekstrakcija istaknula kao najučinkovitija od korištenih ekstrakcijskih tehnika. Rezultati također ukazuju na to da je kapsaicin, uzevši u obzir sve utjecajne čimbenike, relativno stabilan u dobivenim ekstraktima. Nadalje, dobiveno eterično ulje kapsaicina imalo je inhibicijski učinak na Gram-pozitivne bakterijske kulture *B. subtilis* i *S. aureus*, pri čemu je značajniji inhibicijski učinak kapsaicina primijećen kod *B. Subtilis*.

6. LITERATURA

- [1] N. Mohd Hassan, N. A. Yusof, A. F. Yahaya, N. N. Mohd Rozali, R. Othman, Carotenoids of *Capsicum* Fruits: Pigment Profile and Health-Promoting Functional Attributes, *Antioxidants* **8** (2019) 469, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- [2] G. E. Batiha, A. Alqahtani, O. A. Ojo, H. M. Shaheen, L. Wasef, M. Elzeiny, M. Ismail, M. Shalaby, T. Murata, A. Zaragoza-Bastida, N. Rivero-Perez, A. Magdy Beshbishy, K. I. Kasozi, P. Jeandet, H. F. Hetta, Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some *Capsicum* spp. and Capsaicinoids, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 5179, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21155179>
- [3] A. S. Antonio, L. S. M. Wiedemann, V. F. Veiga Junior, The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites, *RSC Adv.* **8** (2018) 25767-25784, doi: <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>
- [4] X. Wang, J. Cao, Y. Wu, Q. Wang, J. Xiao, Flavonoids, Antioxidant Potential, and Acetylcholinesterase Inhibition Activity of the Extracts from the Gametophyte and Archegoniophore of *Marchantia polymorpha* L., *Molecules* **21** (2016) 360, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21030360>
- [4] M. G. Villa-Rivera, N. Ochoa-Alejo, Chili Pepper Carotenoids: Nutraceutical Properties and Mechanisms of Action, *Molecules* **25** (2020) 5573, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25235573>
- [5] A. M. Vera-Guzmán, E. N. Aquino-Bolaños, E. Heredia-García, J. C. Carrillo-Rodríguez, S. Hernández-Delgado, and J. L. Chávez-Servia, Flavonoid and Capsaicinoid Contents and Consumption of Mexican Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) Landraces, *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*, InTech (2017), doi: <https://doi.org/10.5772/68076>
- [6] J. Echave, A. González Pereira, M. Rodríguez, M. Prieto, J. Simal-Gandara, (2020). *Capsicum* Seeds as a Source of Bioactive Compounds: Biological Properties, Extraction Systems, and Industrial Application, *Capsicum* (2020), doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.91785>
- [7] V. Fattori, M. S. Hohmann, A. C. Rossaneis, F. A. Pinho-Ribeiro, W. A. Verri, Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses, *Molecules* **21** (2016) 844, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21070844>
- [8] M. Hamed, D. Kalita, M. E. Bartolo, S. S. Jayanty, Capsaicinoids, Polyphenols and Antioxidant Activities of *Capsicum annuum*: Comparative Study of the Effect of Ripening

- Stage and Cooking Methods, Antioxidants **8** (2019) 364, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8090364>
- [9] *M. Hayman, P. C. A. Kam*, Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications, *Curr. Anaesth. Crit. Care* **19** (2008) 338–343, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.07.003>
- [11] R. D. Crapnell, C. E. Banks, Electroanalytical overview: the pungency of chile and chilli products determined via the sensing of capsaicinoids, *Analyst* **146** (2021) 2769–2783, doi: <https://doi.org/10.1039/D1AN00086A>
- [10] URL: <https://www.britannica.com/science/capsaicin> (pristup 29.4.2023.)
- [11] R. D. Crapnell, C. E. Banks, Electroanalytical overview: the pungency of chile and chilli products determined via the sensing of capsaicinoids, *Analyst* **146** (2021) 2769–2783, doi: <https://doi.org/10.1039/D1AN00086A>
- [12] A. Sander, *Toplinski separacijski procesi (interna skripta); Jedinične operacije u ekoinženjerstvu; I dio*, Zagreb (2011)
- [13] *S. Fongang Fotsing Yannick, J.J. Bankeu Kezetas, B. Gaber El-Saber, A. Iftikhar, B. Lenta Ndjakou*, Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs, *Natural Medicinal Plants*, IntechOpen (2022), doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>
- [14] C. Tzia, G. Liadakis, *Extraction optimization in food engineering*, CRC Press (2003), doi: <https://doi.org/10.1201/9780824756185>
- [15] *D. Đukić et al.*, Conventional and unconventional extraction methods applied to the plant, *Thymus serpyllum L*, *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **85** (2017), doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/85/1/012064>
- [16] *T. Ichim, A. C. Blaga*, Extraction methods of capsaicin, *Buletinul Institutului Politehnic din Iași - Publicat de Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași* **67** (2021)
- [17] *A. Zygler, M. Słomińska, J. Namieśnik*, Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, **2** (2012) 65–82, doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381373-2.00037-5>
- [18] *J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, A. K. M. Omar et al.*, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* **117** (2013) 426–436, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- [19] *K. Kumar, S. Srivastav, V. S. Sharanagat*, Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review, *Ultrason Sonochem* **70** (2021) 105325, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

- [20] P. M. Bucur, C. Radulescu, G. Radu, B. Bucur, Cavitation-Effect-Based Treatments and Extractions for Superior Fruit and Milk Valorisation, *Molecules* **28** (2023) 4677, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28124677>
- [21] A. González-Zamora, E. Sierra-Campos, J. G. Luna-Ortega, R. Pérez-Morales, J. C. Rodríguez Ortiz, J. L. García-Hernández, Characterization of different *Capsicum* varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature, *Molecules* **18** (2013) 13471-86, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules181113471>
- [22] A. Paulina, A. Bahtiar, R. Tjandrawinata, Influence of Extraction Parameters on the Yield, Phytochemical, TLC-Densitometric Quantification of Quercetin, and LC-MS Profile, and how to Standardize Different Batches for Long Term from *Ageratum conyzoides* L. Leaves, *Pharmacogn. J.* **9** (2017) 767-774, doi: <https://doi.org/10.5530/pj.2017.6.121>
- [23] W. Si, S. Man, Z. Y. Chenb, H. Chung, Stability of Capsaicinoid Content at Raised Temperatures, *Nat. Prod. Commun.* **9** (2014) 985-8, doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900726>
- [24] P. Popelka, P. Jevinová, Š. Karel, P. Roba, Determination of Capsaicin Content and Pungency Level of Different Fresh and Dried Chilli Peppers, *Folia Vet.* **61** (2017), doi: <https://doi.org/10.1515/fv-2017-0012>
- [25] A. Plaskova, J. Mlcek, New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food, *Front Nutr.* **28** (2023) 1118761, doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1118761>
- [26] U. Schweiggert-Weisz, A. Schieber, R. Carle, Effects of blanching and storage on capsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili peppers (*Capsicum frutescens* L.), *IFSET* **7** (2006) 217-224, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.03.003>
- [27] S. Füchtbauer, S. Mousavi, S. Bereswill, M. M. Heimesaat, Antibacterial properties of capsaicin and its derivatives and their potential to fight antibiotic resistance - A literature survey, *Eur J Microbiol Immunol* **11** (2021) 10-17, doi: <https://doi.org/10.1556/1886.2021.00003>