

# Primjena kombiniranog postupka mikrovalne ekstrakcije i inkapsulacije ciklodekstrinima u izradi ekstrakta komine masline

---

**Domin, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:187116>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ana Domin**

**Primjena kombiniranog postupka mikrovalne  
ekstrakcije i inkapsulacije ciklodekstrinima u  
izradi ekstrakta komine masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

*Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na stručnom mentorstvu, savjetima i suradnji. Zahvaljujem asistentici Sanji Jurmanović na pomoći i strpljenju.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju, te svim svojim prijateljima i kolegama na pomoći i podršci.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Komina masline</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. <i>Maslina općenito</i> .....	<b>1</b>
1.1.2. <i>Prerada ploda masline</i> .....	<b>1</b>
1.1.3. <i>Fenoli</i> .....	<b>3</b>
1.1.4. <i>Kemijski sastav ploda i maslinovog ulja</i> .....	<b>4</b>
1.1.5. <i>Komina masline</i> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Ciklodekstrini</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3. Antioksidacijski potencijal</b> .....	<b>9</b>
1.3.1. <i>Metode gašenja slobodnih radikala</i> .....	<b>10</b>
1.3.2. <i>Metode redukcije metalnih iona</i> .....	<b>13</b>
1.3.3. <i>Ostale metode</i> .....	<b>14</b>
<b>1.4. Mikrovalna ekstrakcija (ME)</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>18</b>
3.1.1. <i>Kemikalije:</i> .....	<b>18</b>
3.1.2. <i>Oprema</i> .....	<b>18</b>
3.1.3. <i>Priprema uzorka komine masline za daljnje eksperimente</i> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Metode</b> .....	<b>19</b>
3.2.1. <i>Ekstrakcija</i> .....	<b>19</b>
3.2.2. <i>Priprema uzoraka za analizu antioksidativne učinkovitosti</i> .....	<b>20</b>
3.2.3. <i>Određivanje ukupnog redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom</i> .....	<b>21</b>
3.2.4. <i>Određivanje sposobnosti hvatanja radikala TEAC (ABTS) metodom</i> .....	<b>22</b>
3.2.5. <i>Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH testom</i> .....	<b>24</b>
3.2.6 <i>Statistička analiza</i> .....	<b>25</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1. Rezultati</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2. Rasprava</b> .....	<b>36</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>39</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>44</b>

<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>46</b>
<b>8.1. Popis kratica.....</b>	<b>46</b>
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. Komina masline

### 1.1.1. Maslina općenito

*Olea europaea*, *Oleaceae*, hrvatskog naziva maslina, rasprostranjena je na području Mediterana, Azije i Afrike. Razlikujemo nekoliko podvrsta s obzirom na geografski položaj: *Olea europaea subsp. europaea* (Mediteran), *Olea europaea subsp. cuspidata* (Afrika, Kina), *Olea europaea subsp. guanchica* (Kanarsko otočje), *Olea europaea subsp. cerasiformis* (Madeira, Portugal), *Olea europaea subsp. maroccana* (Maroko) i *Olea europaea subsp. laperrinei* (sjeverna Afrika) (Besnard i sur., 2009; Green, 2002). Zimzeleno stablo ili grm doseže visinu 8-15 metara. Karakteristični kožnati, eliptični listovi dugi 4-10 cm, na naličju su tamnozeleni, dok je donja strana lista bijelo-srebrna. Mali, bijeli cvjetovi rastu u grozdovima. Plod je koštunica s mesnatim usplođem i sjemenkom, najvećim dijelom zelene ili ljubičaste boje. Maslina se u Hrvatskoj uzgaja na području Istre i Dalmacije. Istra daje 11 autohtonih sorti, od kojih su pet vodećih: Buža, Istarska bjelica, Karbonaca, Oblica i Rošinjola. Svako drvo daje 15-40 kilograma maslina, ovisno o vremenskim uvjetima, a plodovi se u najvećoj mjeri koriste za proizvodnju maslinovog ulja.

### 1.1.2. Prerada ploda masline

98% svjetske proizvodnje maslinovog ulja odnosi se na Mediteranske zemlje (Sesli i sur., 2009), a vodeći proizvođači su Španjolska, Italija, Grčka i Portugal.

Za proizvodnju prirodnog maslinovog ulja koristi se plod, koji se mehanički obrađuje. Kvaliteta ulja definirana je prema sadržaju slobodnih masnih kiselina, izraženih kao oleinska kiselina. Tako se prirodna ulja, s obzirom na kvalitetu, mogu podijeliti na:

1. Ekstra-djevičansko maslinovo ulje – najviše 0,8 grama oleinske kiseline na 100 grama ulja
2. Djevičansko maslinovo ulje – najviše 2 grama oleinske kiseline na 100 grama ulja

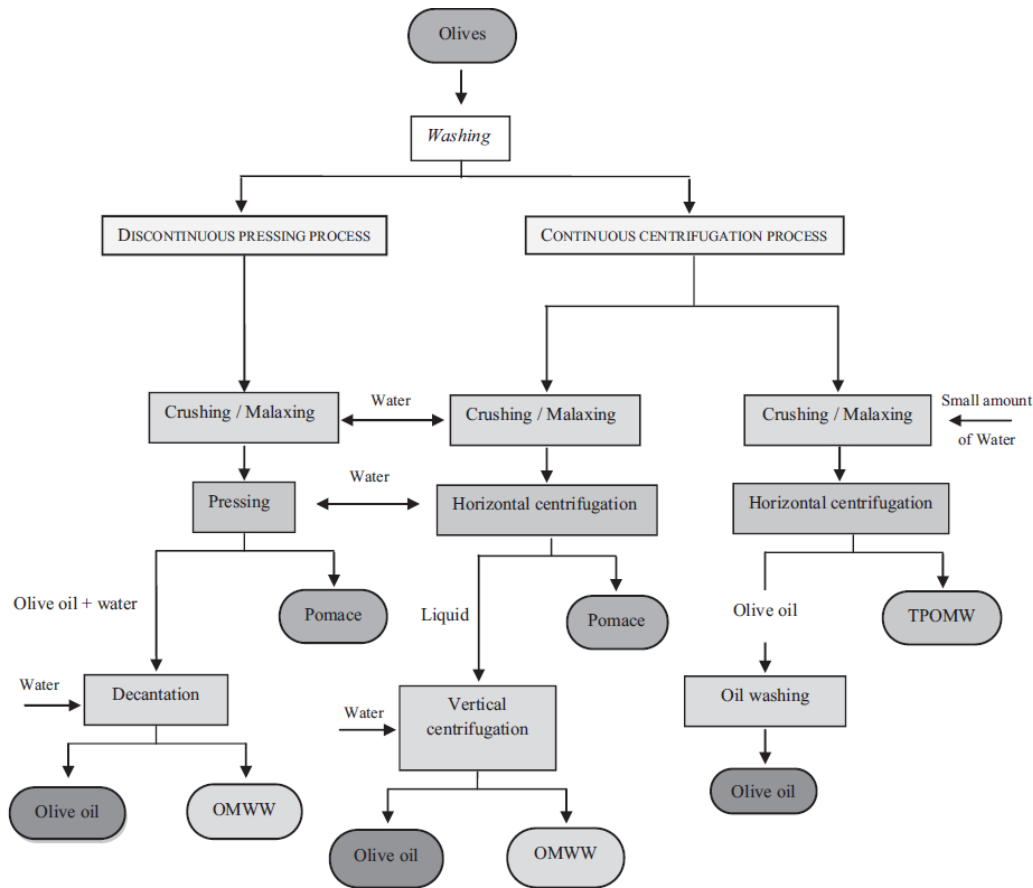
3. Maslinovo ulje lampante – više od 2 grama kiseline na 100 grama ulja; nije za neposrednu potrošnju.

Ekstrakcija maslinovog ulja iz ploda provodi se na jedan od tri načina: *diskontinuirani proces*, *trofazni kontinuirani proces* i *dvofazni kontinuirani proces*. Ekstrakcijama uz maslinovo ulje dobivamo i nusprodukte: kominu masline i otpadne vode (*OMWW – olive mill wastewater*). Shema procesa ekstrakcije prikazana je na Slici 1.

U *diskontinuiranom procesu*, pasta dobivena mljevenjem plodova nanese se na diskove od sintetičkih vlakana. Nakon toga slijedi prešanje i odvajanje komine (čvrsta faza) od emulzije ulja i vode (tekuća faza). Dodaje se mala količina vode radi odvajanja ulja od ostatka tekućeg dijela. Komina i emulzija koja sadrži ulje odvajaju se od otpadne vode procesom dekantacije. Ovaj način dobivanja maslinovog ulja najstariji je i najrašireniji, a njegove prednosti su jednostavnost, jeftina oprema i stvaranje male količine otpadne vode u usporedbi s trofaznim kontinuiranim procesom. Nedostaci su diskontinuiranost i potreba za velikim brojem radnika.

*Trofazni kontinuirani proces* temelji se na različitoj gustoći supstanci koje čine tekuću fazu. Nakon mljevenja plodova slijedi horizontalno centrifugiranje, nakon kojeg se tekuća frakcija podvrgava vertikalnom centrifugiranju. Ovim procesom postiže se potpuna automatizacija procesa i dobiva se kvalitetnije ulje. Mane procesa su stvaranje veće količine otpadne vode, veća potrošnja energije i vode (80-120 L/100 kg maslina) (Albuquerque i sur., 2004) i skuplja instalacija postrojenja (Roig i sur., 2006).

Devedesetih godina razvijen je *dvofazni kontinuirani proces* kako bi se smanjilo stvaranje otpadnih voda. U ovom procesu horizontalnim centrifugiranjem dobivamo maslinovo ulje i otpad dvofaznog mlina (*TPOMW - two-phase olive-mill waste*) kojeg čine komina i otpadna voda. Obradom TPOMW također možemo dobiti ulje procesima klasične ekstrakcije ili daljnjim centrifugiranjem. Iako je količina nusprodukta manja (10 L/ 100 kg maslina), on sadrži mnogo više toksičnih tvari. Ovaj proces proizvodnje maslinovog ulja dominantan je u Španjolskoj, ali i Hrvatskoj, dok u ostalim zemljama još nije prihvaćen zbog otežanog zbrinjavanja otpada iz proizvodnje (McNamara i sur., 2008).



**Slika 1.** Shema procesa ekstrakcije maslinovog ulja (preuzeto iz Vera i sur., 2011)

### 1.1.3. Fenoli

Fenoli su sekundarni biljni metaboliti. Imaju višestruku ulogu kod biljaka: odgovorni su za boju, okus, djeluju antimikrobno, štite biljku od UV zračenja, a mogu biti smješteni u svim biljnim dijelovima. Građeni su od aromatskog prstena (aglikona) za kojeg su vezane hidroksilne skupine. U fenole ubrajamo različite spojeve, od jednostavnih fenola do visoko polimeriziranih spojeva (polifenoli). Djeluju kao antioksidansi – hvatanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) štite organizam od oksidacijskog stresa. Tim, ali i brojnim drugim učincima, uzrokuju smanjenje vjerojatnosti pojave ateroskleroze, nekih tumora, te brojnih kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti kod čovjeka (López i sur., 2000; Owen i sur., 2000; Perona i sur., 2006).

Kao antioksidansi u maslinovom ulju, polifenoli povećavaju stabilnost ulja sprječavanjem autooksidacijskih procesa, te su odgovorni za njegovu gorčinu, pikantnost i oporost. Porast popularnosti maslinovog ulja kao nezaobilazne sastavnice zdravih obrazaca prehrane posljedica



je visokog sadržaja oleinske kiseline (omega-9) i visoke zastupljenosti polifenola koji imaju pozitivan učinak na lipidni profil plazme (Fki i sur., 2005) i djeluju kao prirodni antioksidansi u prevenciji bolesti (Owen i sur., 2009).

#### **1.1.4. Kemijski sastav ploda i maslinovog ulja**

Bioaktivne komponente maslina i maslinovog ulja su nepolarne sastavnice u neosapunljivoj frakciji (skvaleni, tokoferoli, steroli i triterpeni) i polarniji polifenoli, uglavnom dobro topljivi u vodi. Sastav polifenola u plodu masline i maslinovom ulju se razlikuje. Polifenoli u plodu su fenolne kiseline (benzojeva, cimetna...), fenolni alkoholi (tirozol, hidroksitirozol), flavonoidi i sekoiridoidi (oleuropein, demetiloleuropein, ligstrozid i verbaskozid). Slika 2, Slika 3 i Slika 4 prikazuju strukture oleuropeina, verbaskozida i ligstrozida.

Najzastupljeniji polifenoli u maslinovom ulju su tirosol, hidroksitirozol, različite fenolne kiseline, derivati tirosola i hidroksitirosola s elenoičnom kiselinom, npr. oleacin i oleokantal (3,4-DHPEA-EDA i *p*-HPEA-EDA), aglikoni oleuropeina i ligstrozida, te izomer aglikona oleuropeina.

#### **1.1.5. Komina masline**

Kominu masline čine pulpa ploda, sjemenka, koža i koštica. Nusprodukt je koji nastaje diskontinuiranim procesom i trofaznim kontinuiranim procesom ekstrakcije, dok je kod dvofaznog procesa dio TPOMW uz otpadne vode. Vlažnost komine u diskontinuiranom procesu je 22-25%, a u trofaznom 40-45%.

Kemijski sastav komine varira u ovisnosti o sorti masline, uvjetima uzgoja i procesu ekstrakcije (Rodriguez i sur., 2008). Bogata je biološki aktivnim tvarima, u najvećoj mjeri polifenolima. Sjemenka sadrži 3 glukoze: salidrozin (tirozol glukoza), nuezhenin (glukoza-elenolna kiselina-glukoza-tirozol) i nuezhenin-oleozin (Maestro-Duran i sur., 1994), zatim jednostavne fenole tirozol i hidroksitirozol. Nuezhenin nalazimo isključivo u sjemenkama gdje je dominantan (Ryan i sur., 2003), dok verbaskozid i 3,4 DHFEA-EDA (dekarboksimetil oleuropein) nalazimo u sjemenkama i pulpi (Fernandez-Bolaños i sur., 2002).

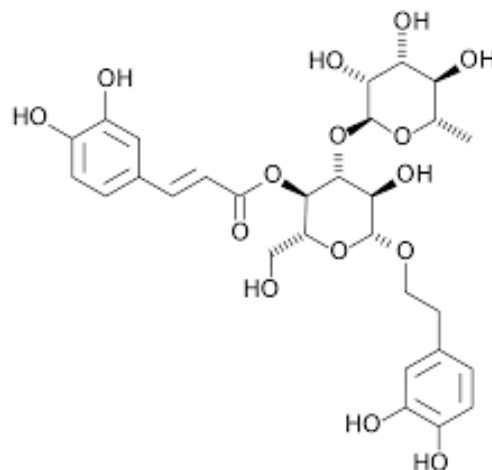
Ulje iz komine masline dobiva se na dva načina: tradicionalnom ekstrakcijom (korištenjem otapala) i fizičkom ekstrakcijom ili centrifugiranjem (sekundarno centrifugiranje).

Nedavno razvijenom ciklodekstrinima (CD) pojačanom ekstrakcijom omogućeno je dobivanje kvalitetnih ekstrakata komine masline (OPE) koji se mogu upotrijebiti kao alternativni izvor polifenola u raznim industrijama (Radić i sur., 2020).

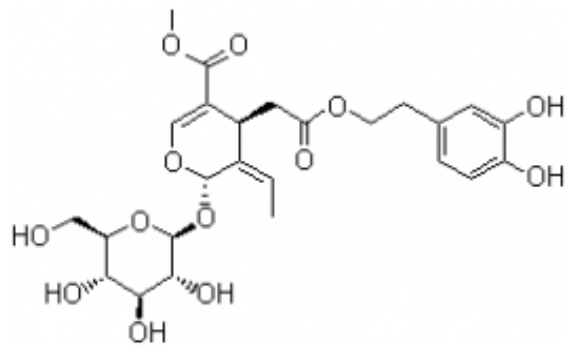
Od ostalih nusprodukata dobivamo još i *otpadnu vodu (OMWW)*, slabo kiselu, crveno-crnu tekućinu dobre provodljivosti. Nastaje u diskontinuiranom i trofaznom kontinuiranom procesu proizvodnje maslinovog ulja. Sastoji se od vode (83-92%), fenola, šećera, organskih kiselina i minerala (kalij). Stvaranje ovog nusprodukta predstavlja opasnost za okoliš.

U dvofaznom procesu proizvodnje nastaje *otpad dvofaznog mlina (TPOMW)*. To je mulj koji sadrži komade sjemenki i dijelove pulpe. Ima veću vlažnost u usporedbi sa vlažnošću komine masline koja nastaje u druga dva procesa. Sadrži minerale, u najvećoj mjeri kalij, kalcij i natrij.

Slika 5 prikazuje mogućnosti za daljnje iskorištavanje spomenutih nusprodukata.

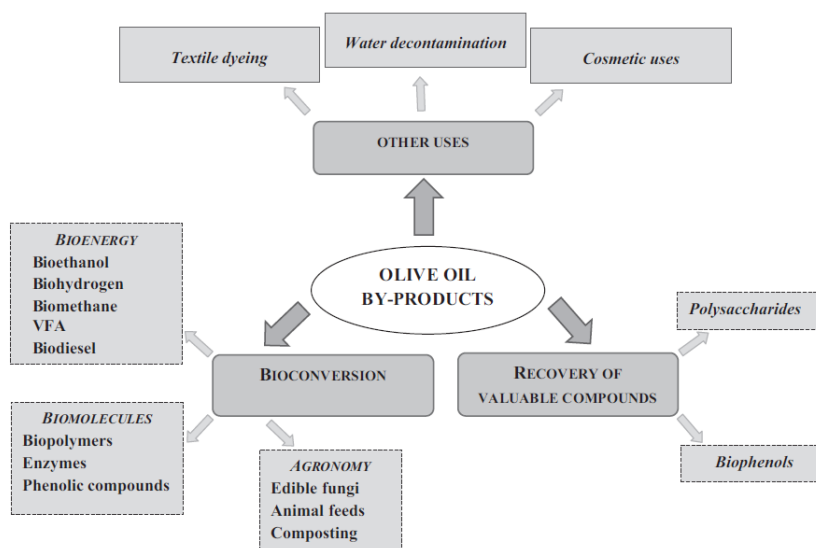


**Slika 2.** Struktura verbaskozida



**Slika 3.** Struktura oleuropeina

(preuzeto iz <https://lktlabs.com/product/oleuropein/>)



**Slika 4.** Iskoristivost nusprodukata proizvodnje maslinovog ulja (preuzeto iz Vera i sur., 2011)

## 1.2. Ciklodekstrini

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi koji nastaju procesom enzimske razgradnje škroba. Enzim koji sudjeluje u razgradnji je ciklomaltodekstrin glukanottransferaza koja cijepa  $\alpha$ -1,4- glikozidne veze u lancima amiloze, a proizvode ga bakterije *Bacillus macerans*. Na ovaj način nastaju  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ciklodekstrini u podjednakom udjelu. Kontrolom određenih parametara kao što su temperatura, pH vrijednost smjese te dodatkom određenih organskih supstanci potencira se nastajanje jedne od navedenih vrsta ciklodekstrina. Dodatkom toluena u reakcijsku smjesu uglavnom nastaje  $\beta$ CD koji s toluenom tvori netopljivi kompleks. Dodatkom dekana u reakcijsku smjesu preferirano nastaje  $\alpha$ CD, a dodatkom  $\alpha$ -naftola i metiletilketona nastaje  $\gamma$ CD (Frömming i Szejtli, 1994).

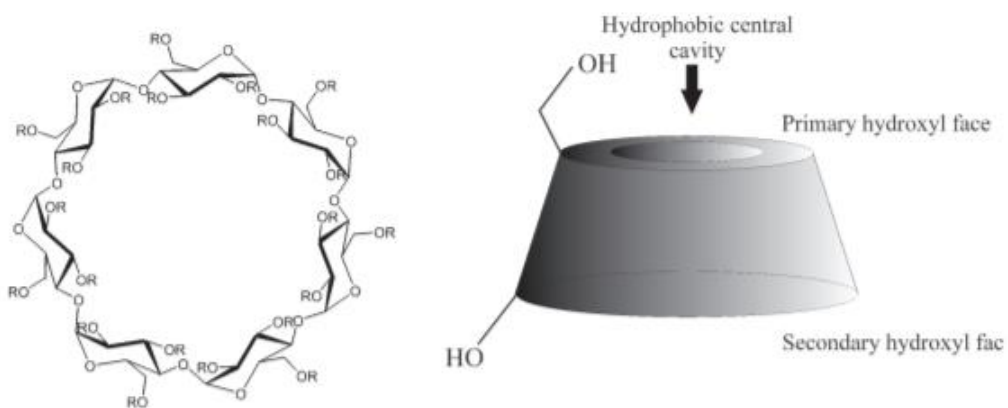
Prirodni ciklodekstrini građeni su od 6 ( $\alpha$ -), 7 ( $\beta$ -) ili 8 ( $\gamma$ -)  $\alpha$ -D-glukopiranoza međusobno povezanih  $\alpha$ -1,4- glikozidnom vezom. Ciklodekstrini s manje od 6 glukopiranoza ne mogu nastati zbog steričkih razloga, a ciklodekstrini s više od 8 podjedinica ne mogu se koristiti za stvaranje inkluzijskih kompleksa zbog nestabilnosti i teškog pročišćavanja. Glukopiranoze su u konformaciji stolca tako da su ciklodekstrini u obliku krnjeg stošca. Molekula je hidrofilna zahvaljujući hidroksilnim skupinama orijentiranim prema van. S obzirom da nije moguća rotacija oko  $\alpha$ -1,4- veze, primarne hidroksilne skupine nalaze se na užem kraju stošca, dok su sekundarne na širem. Unutrašnju šupljinu oblažu ugljikovi i kisikovi atomi koji pripadaju glukopiranoznim podjedinicama, tako da je šupljina hidrofobna.

Zbog njihove biokompatibilnosti i različitih karakteristika, ciklodekstrini mogu maskirati negativne značajke lijeka stvarajući inkluzijske komplekse (Jug i Bećirević-Laćan, 2008).

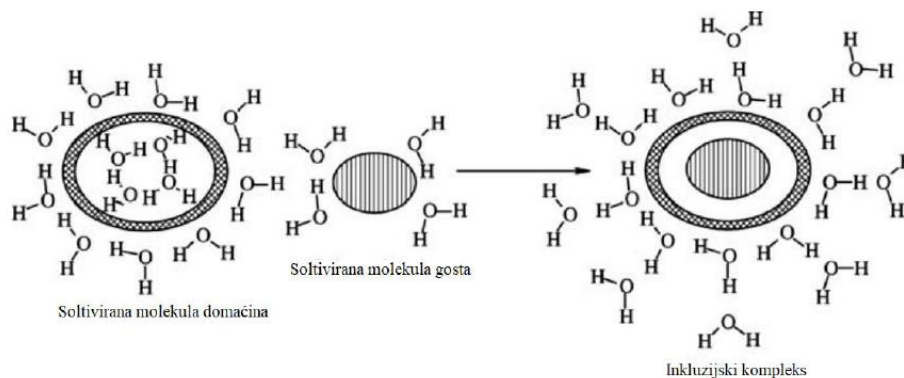
Za stvaranje spomenutih kompleksa najčešće se koristi  $\beta$ CD, čija je struktura prikazana na Slici 6, kao *molekula domaćina*. Vodikovi i kisikovi atomi daju šupljini ciklodekstrina hidrofoban karakter, čime je osiguran mikrokoliš za smještaj lipofilnih *molekula gosta* i stvaranje spomenutih kompleksa. Kada se molekula gosta smjesti u šupljinu podložna je raznim modifikacijama. Primjerice, ako je molekula slabo topljiva, molekula domaćina joj povećava topljivost, stabilnost itd. Ako je molekula gosta lijek, ciklodekstrin je ekscipijens koji maskira nepoželjne značajke lijeka kao što su loš okus, slaba topljivost u vodi i kemijska nestabilnost. Iz tih razloga koristi se i za kompleksiranje polifenola (Fang, 2010).

Inkluzijski kompleksi nastaju reakcijama kompleksiranja, u kojima su ciklodekstrini slabe Lewisove kiseline ili baze ovisno o molekuli s kojom reagiraju. Najjednostavniji je stehiometrijski omjer CD-a i molekule 1:1, ali moguć je i omjer 2:1 u slučaju prevelike molekule gosta. Glavna pokretačka snaga u stvaranju takvih kompleksa je izbacivanje visokoenergijskih molekula vode iz šupljine ciklodekstrina. Njih zamjenjuju molekule gosta iz otopine koje se smještaju u šupljinu ciklodekstrina. Pritom nastaju nekovalentne veze, primjerice Van der Waalsove sile i vodikove veze. Shematski prikaz stvaranja inkluzijskih kompleksa prikazan je na Slici 7.

Kod uvođenja novih pomoćnih tvari, primarno je voditi računa o mogućim opasnostima njihove primjene (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Budući da teško prolaze kroz membrane i ne razgrađuju se slinom ni amilazama pankreasa, gastrointestinalna, nazalna i okularna apsorpcija im je vrlo niska. Razgrađuju se djelovanjem mikroflora debelog crijeva u primarne metabolite, a dio koji se apsorbira u sistemska cirkulaciju dalje se razgrađuje do  $H_2O$  i  $CO_2$ .



**Slika 5.** Struktura  $\beta$ - ciklodekstrina (R = H) (preuzeto iz Jug i Bećirević-Laćan, 2007)



**Slika 6.** Shematski prikaz stvaranja inkluzijskog kompleksa molekule ciklodekstrina i molekule gosta (preuzeto iz Dodziuk, 2006)

### ***1.3. Antioksidacijski potencijal***

Lipidna oksidacija glavni je uzrok pogoršanja kvalitete hrane jer hrana tim procesom gubi esencijalne masne kiseline i vitamine topljive u mastima. Najvažnije mete lipidne peroksidacije su spojevi s većim brojem dvostrukih veza, kao što su višestruko nezasićene masne kiseline. Procese oksidacije masnih kiselina iniciraju najčešće reaktivne kisikove vrste kao što su hidroksilni radikal, superoksid radikal i vodikov peroksid koji brzo stupaju u reakcije s makromolekulama te ih trajno oštećuju.

Relativno male količine reaktivnih kisikovih vrsta endogeno nastaju kao produkt metaboličkih procesa u svim aerobnim organizmima (Beckman i Ames, 1998). Ako se proces stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva nekontrolirano odvija u ljudskom tijelu pri čemu dolazi do oštećenja makromolekula govorimo o nastanku oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres je, dakle, posljedica prevelikog stvaranja reaktivnih spojeva kisika (ROS) uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko – redukcijskih procesa u organizmu. Važan je etiološki čimbenik kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, dijabetesa te autoimunih bolesti (Dalton i sur., 1999).

Antioksidansi u hrani ili ljudskom organizmu odgađaju, kontroliraju ili preveniraju oksidativne procese koji vode inicijaciji i propagaciji degenerativnih bolesti u tijelu. Djeluju na različite načine:

- Inhibicija stvaranja i hvatanje reaktivnih kisikovih ili dušikovih vrsta
- Sposobnost redukcije

- Keliranje iona metala
- Inhibitori pro-oksidacijskih enzima

S obzirom na mehanizam djelovanja dijele se na primarne i sekundarne antioksidanse. Primarni djeluju kao donori vodika ili kao akceptori radikala, a sekundarni suprimiraju promotore oksidacije. Efektivnost antioksidansa generalno ovisi o njihovoj strukturi, koncentraciji, temperaturi, tipu oksidacije, stanju organizma te prisutnosti pro-oksidansa.

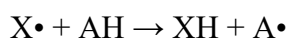
Metode mjerenja antioksidacijskog potencijala dijelimo na kemijske metode (neradikal-metode bazirane na redoks potencijalu, metode mjerenja stupnja lipidne peroksidacije) i metode mjerenja koje koriste biološke modele.

### 1.3.1. Metode gašenja slobodnih radikala

Antioksidansi mogu gasiti radikale prijenosom vodika (**HAT - hydrogen atom transfer**) ili prijenosom elektrona (**SET – single electron transfer**). Mehanizmi reakcija su različiti, ali je ishod isti. Čimbenici koji određuju mehanizam i jakost antioksidansa su energija disocijacije veze i ionizacijski potencijal.

Metoda se temelji na kinetičkoj kompeticiji: da bi prekinuo oksidaciju, antioksidans mora reagirati sa slobodnim radikalom brže od biomolekule. U fluorescencijskim metodama fluorescentna proba i antioksidans reagiraju s radikalom. Mjerenjem fluorescencijskog raspada krivulje uzorka u prisutnosti i odsutnosti antioksidansa i integriranjem površina ispod krivulja te njihovom usporedbom, možemo odrediti antioksidacijski potencijal ciljanog antioksidansa.

Testovi bazirani na HAT-u mogu se prikazati reakcijom:



X• - slobodni radikal

AH – donor vodika, antioksidans

Ovim testovima mjerimo sposobnost antioksidansa da doniranjem vodika „ugase“ radikale.

Testovi bazirani na SET-u temelje se na mjerenju sposobnosti kojom antioksidans reducira neku oksidativnu vrstu prijenosom elektrona. Prijenosom elektrona s antioksidansa na probnu tvar (oksidans) dolazi do promjene boje, čiji je intenzitet izravni pokazatelj koncentracije antioksidansa.

### ***Primjeri metoda:***

- **ORAC (*Oxygen radical absorption capacity*)**

Metoda mjeri antioksidacijski potencijal praćenjem gašenja peroksilnih radikala. Reakcijska smjesa sadrži izvor peroksilnih radikala, azo-spoj 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), fluorescentnu probu (okisabilni protein, npr. fluorescein) i standard (određeni antioksidans) kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Izvor radikala, AAPH, raspada se na temperaturi od 37° i na taj način nastaju peroksilni radikali. Nastali radikali u smjesi oksidiraju fluorescentnu probu pri čemu joj pada intenzitet fluorescencije. Dodani antioksidans gasit će nastale peroksilne radikale zbog čega će se reakcija gašenja fluorescencije usporavati. Kapacitet antioksidansa određen je količinom produkta nastalog tijekom vremena, dakle dobiva se usporedbom površine ispod krivulje (AUC) s *Troloxom* (vodotopljivi analog vitamina E).

Nedostaci ORAC metode su potrebna pH kontrola, dugotrajnost eksperimenta, ograničenost na peroksilne i hidroksilne radikale.

- **TRAP (*Total reactive antioxidant potential*)**

Sastoji se također od azo-komponente koja producira peroksilne radikale (AAPH), fluorescentne probe (R-fikoeritrin) i standarda (antioksidansa). Metoda koristi luminiscencijski spektrometar za mjerenje smanjenja fluorescencije probe tijekom reakcije peroksidacije. Ponovno pratimo smanjenje kemiluminiscencijskog signala zbog prisutnosti antioksidansa.

- **LDL – oksidacija**

Odnosi se na lipide niske gustoće.

*In vitro* testovi koriste bakrov sulfat kao pokretač procesa LDL oksidacije i lipidne peroksidacije koji se mogu pratiti UV-spektroskopijom i/ili kemiluminescencijom (Puhl i sur., 1994). Prisustvo antioksidansa u reakcijskoj smjesi usporavat će vrijeme oksidacije. Spomenuto vrijeme je pokazatelj antioksidacijskog potencijala.

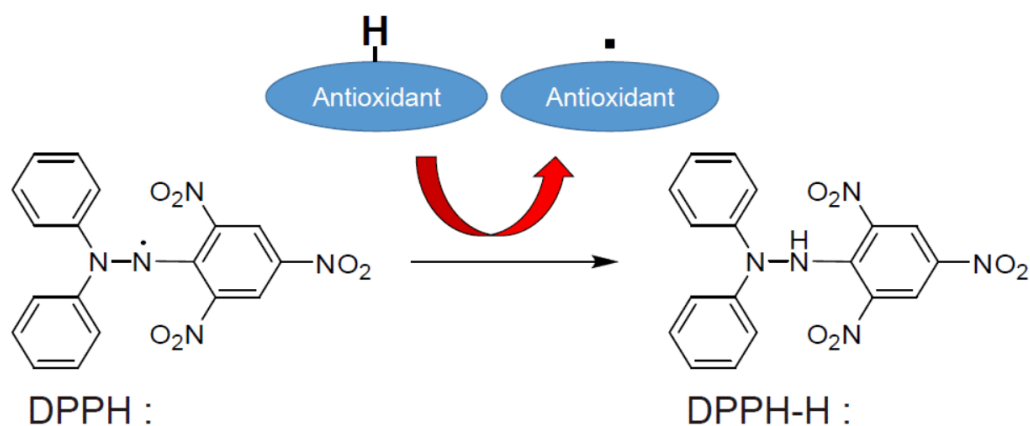
Velika prednost ovog testa je korištenje biološki značajne mete.



- **DPPH** (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikal)

DPPH• radikal stabilni je organski dušikov radikal i obojen je ljubičasto. U ovoj metodi mjeri se apsorbancija otopine nakon reakcije antioksidansa s radikalom. Reakcijski mehanizam (Slika 8) zasniva se na prijenosu elektrona, dok je HAT reakcija sekundarna. Prilikom reakcije dolazi do gubitka ljubičaste boje. Promjena apsorbancije mjeri se na valnoj duljini 515-528 nm, a njeno smanjenje proporcionalno je koncentraciji antioksidansa. Kao standard korišten je Trolox (Thaipong, 2006).

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala računa se kao postotak inhibicije radikala koji je proporcionalan koncentraciji antioksidansa, a drugi način izražavanja antioksidativnog kapaciteta je preko EC<sub>50</sub> vrijednosti, što označava koncentraciju antioksidansa potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH• za 50%.



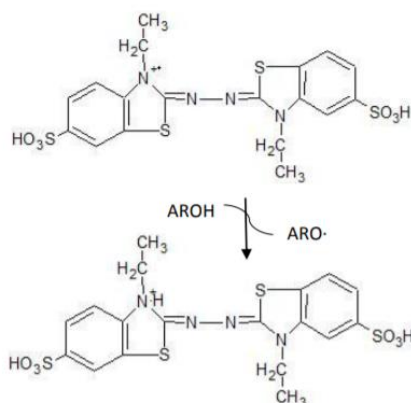
*Slika 7.* Reakcija DPPH radikala s antioksidansom prikazana strukturnim formulama (preuzeto iz Pyrzynska i Pekal, 2013)

- **ABTS metoda**

ABTS<sup>•+</sup> kation radikal nastaje oksidacijom 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS) peroksidazom u prisutnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Radikal apsorbira na valnoj duljini od 743 nm dajući plavo-zelenu boju.

ABTS<sup>•+</sup> radikal reagira s antioksidansima HAT i SET mehanizmima, što je prikazano na Slici 9. U reakciji radikala i antioksidansa dolazi do gubitka zelene boje uslijed oksidacije radikala u stabilan ABTS spoj, što se prati spektrofotometrijski.

Prednosti ove metode pred DPPH metodom su veća osjetljivost, primjena kod različitih pH vrijednosti i brza reakcija s uzorkom.



**Slika 8.** Reakcija ABTS radikala s antioksidansom prikazana strukturnim formulama (preuzeto iz Hernandez-Rodriguez i sur., 2019)

### 1.3.2. Metode redukcije metalnih iona

- **CUPRAC (*Cupric reducing antioxidant power*)**

Metoda se temelji na redukciji Cu(II) u Cu(I) u reakciji antioksidansa s neokuproinom, bakrovim kompleksom Cu(II)-Nc, kako je prikazano na Slici 10. Ovim kompleksom ispituju se i hidrofilni i lipofilni antioksidansi. Nakon 30 minuta reakcije mjeri se apsorbancija produkta Cu(I)-Nc na 450 nm.

- **FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

Metoda se temelji na redukciji kompleksa Fe(III) s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ). Žuto obojeni kompleks prelazi u plavo obojeni Fe(II)-TPZP. Intenzitet plave boje mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm. Izmjerena apsorbancija pokazuje količinu reduciranog željeza i dovodi se u vezu sa količinom antioksidansa (Pellegrini i sur, 2003).

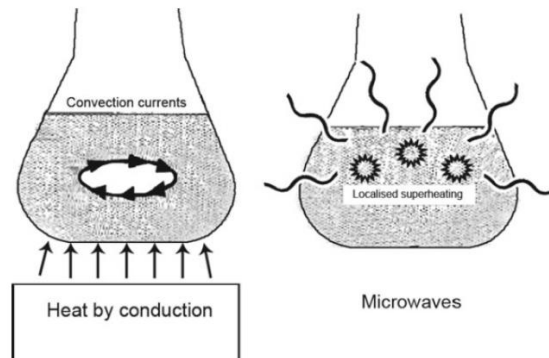
### 1.3.3. Ostale metode

- **Određivanje redukcijskog potencijala Folin-Ciocalteu reagensom**

Folin-Ciocalteu reagens sastoji se od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koje se u reakciji s fenolnim komponentama reduciraju u plavo obojene okside. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski na valnim duljinama 745-765 nm (Prior i sur., 2005), a intenzitet je proporcionalan koncentraciji reduktivnih komponenti.

## 1.4. Mikrovalna ekstrakcija (ME)

Mikrovalovi se u prehrambenoj industriji upotrebljavaju za pečenje, zagrijavanje, sušenje, odmrzavanje, dehidraciju, te za pasterizaciju i sterilizaciju mnogih namirnica. U novije vrijeme razvijena je i analitička metoda ekstrakcije koja koristi mikrovalove - **mikrovalna ekstrakcija**. Ovakav način ekstrakcije koristi se za analizu tragova organskih tvari u krutim uzorcima, za ekstrakciju prirodnih spojeva itd. Prednosti mikrovalne ekstrakcije pred klasičnom su smanjeno trajanje ekstrakcije, što rezultira smanjenom potrošnjom energije i smanjenim troškovima ekstrakcije (Abert i sur., 2008), korištenjem manjih količina otapala i poboljšanim ekstrakcijskim prinosom.



**Slika 9.** Usporedba zagrijavanja kondukcijom i mikrovalovima (preuzeto iz Blekić i sur., 2011)

Elektromagnetski valovi nastaju titranjem povezanog električnog i magnetskog polja koji se šire prostorom. Protok struje kroz žicu dovodi do stvaranja električnog i magnetskog polja koja okružuju vodič. Promjena smjera gibanja struje uzrokuje pulsiranje oba polja i stvaranje elektromagnetskih valova koji se šire okomito na smjer struje koja ih je izazvala (Chemat i sur., 2004). Mikrovalovi su elektromagnetski valovi u rasponu frekvencija od 1 GHz do 300 GHz (Wang i Weller, 2006). Energija koju proizvode mikrovalovi ne uzrokuje promjene u strukturi, već zbog titranja molekula dolazi samo do porasta temperature.

Ekstrakcija je metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Temelji se na različitoj topljivosti ciljane tvari u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcijom dobivamo tvar za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno dobivenu otopinu otpariti ili kristalizirati (Lianfu i Zelong, 2008).

**Mikrovalna ekstrakcija** metoda je u kojoj se energijom mikrovalova zagrijavaju otapalo i uzorak, čime se pospješuje prelazak analita iz uzorka u otapalo. Da bi se mikrovalna ekstrakcija mogla provesti, materijali koje analiziramo moraju imati odgovarajuća dielektrična svojstva. Ova svojstva posjeduju materijali čije molekule postaju električki nabijene (polarizirane) djelovanjem elektromagnetskog polja. Djelovanjem izmjeničnog elektromagnetskog polja (visokofrekventni EM valovi) na takve molekule (električne dipole) dolazi do njihovog naizmjeničnog zakretanja brzinom koja ovisi o frekvenciji. Takvo titranje molekula dovodi do njihovog međusobnog trenja, odnosno stvaranja topline. Sumirano, ako se materijal koji posjeduje dielektrična svojstva podvrgne djelovanju izmjeničnog elektromagnetskog polja, apsorbira dio energije i pretvara je u toplinsku energiju.

Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava prodiranje otapala u uzorak te na taj način potiče otapanje (Eskilsson i Bjourklund, 2000). Na Slici 11 prikazana je razlika zagrijavanja otopine mikrovalovima i kondukcijom.

U mikrovalnoj ekstrakciji važni su izbor otapala i temperatura. Izbor otapala ovisi o topljivosti željenog analita te interakciji između otapala i uzorka. Otapalo mora posjedovati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja mikrovalova (Bousbia i sur., 2009). Primjeri odgovarajućih otapala su etanol, metanol i voda, koji su dovoljno polarni da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom (Brachet i sur., 2002; Font i sur., 1998).

Temperatura je važan faktor jer povišenje temperature dovodi do boljeg ekstrakcijskog učinka. Izabrana snaga mikrovalova tijekom mikrovalne ekstrakcije mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature, što dovodi do razgradnje termolabilnih supstanci.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Procesom proizvodnje maslinovog ulja nastaju i, naizgled, neiskoristivi i štetni nusprodukti – komina masline i otpadna voda. Zbog problema zbrinjavanja, izrazito je važno pronaći načine njihove daljnje obrade. Komina masline bogata je polifenolima, koji imaju dokazana oksidacijska i protuupalna svojstva, i koji se mogu izolirati i dalje iskoristiti. Na taj način smanjuje se problem zbrinjavanja otpada te se dobivaju visokovrijedni proizvodi s dodanom vrijednošću. Pri tome je važno razviti postupke izolacije ciljanih komponenti koji će biti optimalni s ekološkog i ekonomskog aspekta. Stoga je cilj ovog rada optimirati proces mikrovalne ekstrakcije polifenola iz komine masline kombinacijom mikrovalne ekstrakcije i inkapsulacije ciklodekstrinima. Optimizacija procesa ekstrakcije trebala bi rezultirati skraćivanjem trajanja ekstrakcije, smanjenjem potrebne količine otapala te poboljšanjem prinosa ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju otapalom.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije:

- Etanol, p.a.; *Kemika d.o.o.*, Zagreb, Hrvatska
- Petroleter; *Kemika d.o.o.*, Zagreb, Hrvatska
- $\beta$ -ciklodekstrin; *Wacker Chemie GMBH*, Njemačka
- Metanol, p.a.; *Kemika d.o.o.*, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu fenol reagens; *Fluka*, Buchs, Švicarska
- Natrijev karbonat; *Kemika d.o.o.*, Zagreb, Hrvatska
- Galna kiselina; *Fluka*, Buchs, Švicarska
- Diamino-2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina); *Sigma*, St. Louis, SAD
- Kalijev persulfat; *Kemika d.o.o.*, Zagreb, Hrvatska
- Ultračista voda

#### 3.1.2. Oprema

- Milestone MLS 1200 Mega Microwave Digestion System with MDR technology (2450 MHz); *Milestone Inc.*, CT, SAD
- Analitička vaga, AB265-S; *Mettler Toledo*, Italija
- UV-VIS spektrometar UV 4-100; *ATI Unicam*, Cambridge, Velika Britanija
- Soxhlet aparatura; *Behr Labortechnik*, Düsseldorf, Njemačka
- Liofilizator; *Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH*, Njemačka
- Vortex mješalica, tip VTY-3000L; *Mixer UZUSIO*, Tokyo, Japan
- Falcon kivete
- Odmjerne tikvice, 10 mL

### **3.1.3. Priprema uzorka komine masline za daljnje eksperimente**

*Zamrznuta komina masline* odmrznuta je i prebačena u veliku petrijevku te je sušena u laboratorijskoj peći 36 sati na 50°C. Nakon toga je usitnjena u tarioniku i prosijana kroz sito poroziteta 1.25 mm da bi se uklonile koštice. Prosušena komina odmašćena je zatim korištenjem petroletera u aparaturi po Soxhlet-u. Tako pripremljen uzorak korišten je u svim daljnjim istraživanjima.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Ekstrakcija**

- **Mikrovalna ekstrakcija**

U kivete za mikrovalnu ekstrakciju izvaže se oko 100 mg prethodno obrađene komine masline. U kivete se otpipetira po 5 mL odgovarajućeg otapala za ekstrakciju. U okviru preliminarnih istraživanja proces mikrovalne ekstrakcije optimiran je variranjem trajanja ekstrakcije, snage mikrovalova i korištenog ekstrakcijskog sredstva (Tablica 1). Nakon utvrđivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije, istražen je utjecaj prisutnosti ciklodekstrina u reakcijskoj smjesi na prinose antioksidansa u dobivenim ekstraktima pri čemu su za ekstrakciju korišteni  $\beta$ -ciklodekstrin, hidroksiopropil- $\beta$ -ciklodekstrin i nasumično metilirani  $\beta$ -ciklodekstrin u koncentracijama 8 g/L i 16 g/L.

- **Klasična ekstrakcija (čvrsto-tekuće)**

Prema prethodno optimiranom postupku, oko 800 mg uzorka komine ekstrahira se u Falcon kiveti sa 400 mL 60%-tnog etanola. Ekstrakcija se provodi na termostatiranoj vodenoj kupelji s mućkalicom na 70 °C kroz 2 sata na 110 rpm.



- **Izrada suhih ekstrakata**

Nakon ekstrakcije, kivete s ekstraktima se ohlade u sustavu za hlađenje vodom. Ohlađeni ekstrakti se profiltriraju preko običnog filter papira i kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 10 mL i nadopune do oznake. Tekući ekstrakti zatim se prenesu u vakuum sušnicu (40°C, 0,9 bar) da se iz ekstrakta ukloni etanol te se podvrgavaju postupku sušenja smrzavanjem. Tako dobiveni suhi ekstrakti (**OPE**) koriste se za sva daljnja istraživanja.

**Tablica 1.** Uvjeti MAE tijekom procesa optimizacije postupka

Br. ponavljanja	$P$ [W]	$t_{\text{ekstrakcije}}$ [min]	$c(\text{EtOH})$ [%]
2	700	1	96
4	550	5,5	58
2	400	10	20
2	400	1	96
2	400	1	20
2	400	10	96
2	700	10	20
2	700	10	96
2	700	1	20

### 3.2.2 Priprema uzoraka za analizu antioksidativne učinkovitosti

Za analizu antioksidacijske učinkovitosti suhi ekstrakti otopljeni su u demineraliziranoj H<sub>2</sub>O kako je prikazano u Tablici 2. Odvage suhog ekstrakta se razlikuju, te su dodane različite količine ekscipijena da bi se dobili ekstrakti s jednakim sadržajem čistog ekstrakta komine (odvage su korigirane na masu ekscipijensa u liofilizatu). Pet ispitivanih uzoraka čine:

- ekstrakt dobiven mikrovalnom ekstrakcijom bez ciklodekstrina (NE)
- ekstrakt dobiven klasičnom ekstrakcijom u koji je dodan  $\beta$  – ciklodekstrin tako da mu je konačna koncentracija u ekstraktu 8 mg/mL ( $\beta$ CD-CE)

- ekstrakt dobiven mikrovalnom ekstrakcijom u koji je dodan  $\beta$  – ciklodekstrin tako da mu je konačna koncentracija u ekstraktu 8 mg/mL ( $\beta$ CD)
- ekstrakt dobiven mikrovalnom ekstrakcijom u koji je dodan hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin tako da mu je koncentracija u ekstraktu 16 mg/mL (HP $\beta$ )
- ekstrakt dobiven mikrovalnom ekstrakcijom u koji je dodan nasumično metilirani  $\beta$  – ciklodekstrin tako da mu je koncentracija u ekstraktu 16 mg/mL (RAMEB)

**Tablica 2.** Priprema otopina uzoraka za analizu antioksidativne učinkovitosti

Uzorci	$m_{\text{uzorka}}$ [mg]	$\gamma$ uzorka u 1,5 mL H <sub>2</sub> O [mg/mL]
NE	80,8	53,87
$\beta$ CD (8 mg/mL) - CE	135,2	90,13
$\beta$ CD (8 mg/mL) - MAE	79,7	53,13
HP $\beta$ (16 mg/mL)	192,4	128,27
RAMEB (16 mg/mL)	202,4	134,93

### 3.2.3. Određivanje ukupnog reduksijskog potencijala Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu metoda služi određivanju ukupnog reduksijskog potencijala. Temelji se na prijenosu elektrona s reduksijskih sredstava (fenolni spojevi) na molibden, koji redukcijom daje plave komplekse čija je maksimalna apsorpcija svjetlosti na 725 nm valne duljine. Reakcija se odvija u alkalnim uvjetima, a nastali kompleksi nepoznate su strukture. Intenzitet nastalog plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih spojeva, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (*Gallic Acid Equivalence, GAE*).

FC reagens je žute boje, a čine ga fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina. Nije specifičan za fenolne spojeve, tako da se prilikom korištenja ove metode za određivanje reduksijskog potencijala, moraju uzeti u obzir ili ukloniti interferencije.

- **POSTUPAK:**

200  $\mu$ L 20x razrijeđene otopine uzorka otpipetira se u Falcon kivetu, zatim se doda 150  $\mu$ L FC reagensa i 1,35 mL destilirane vode. Otopina se dobro promućka, te se nakon 5 minuta zaluži

sa 1,5 mL 6%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i ponovno dobro promućka. Smjesa se inkubira 30 minuta na 50 °C kako bi se reakcija ubrzala i pri tome se razvije plava boja. Nakon 30 minuta smjesa se hladi i mjeri se apsorbancija na valnoj duljini od 725 nm. Uzorci su analizirani u duplikatu. Koncentracije polifenola odrede se pomoću baždarnog dijagrama i izraze kao ekvivalenti galne kiseline.

#### *IZRADA OTOPINE $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :*

6 g bezvodnog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  otopi se u 80 mL vode i prokuha. Nakon hlađenja doda se par kristala  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i ostavi stajati 24 h. Otopina se nakon toga profiltrira kroz gusti filter papir i nadopuni u odmjernoj tikvici do 100 mL.

- **IZRADA BAŽDARNOG DIJAGRAMA:**

Izradimo otopinu galne kiseline koncentracije 4 mg/mL tako što otopimo 400 mg galne kiseline u 10 mL etanola i nadopunimo do 100 mL destiliranom vodom. 10 mL te otopine se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Na taj način smo dobili otopinu galne kiseline koncentracije 0,4 mg/mL koja se koristi za izradu otopina galne kiseline koncentracija od 0-160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Svakoju otopinu poznate koncentracije izmjeri se apsorbancija i na temelju dobivenih podataka izradi se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline – funkcija je linerna. Na temelju jednadžbe pravca može se izračunati ukupan sadržaj fenola izražen u ekvivalentima galne kiseline.

### **3.2.4. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala TEAC (ABTS) metodom**

TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) test temelji se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da neutralizira ABTS radikal kation (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) što rezultira smanjenjem apsorbancije reakcijske otopine. ABTS radikal kation je plavo zelene boje, a intenzitet obojenja smanjuje se gašenjem radikala. Obezbojenje je jače što je veća koncentracija antioksidansa. Apsorpcijski maksimumi na su valnim duljinama 645 nm, 734 nm i 815 nm (Miller i sur, 1993), te 415 nm.

ABTS radikal kation nastaje u reakciji ABTS-a (7 mM) i kalijevog persulfata (2,45 mM). Smjesa se drži u uvjetima bez svjetla 12-16 sati, jer je reakcija završena tek nakon 6 h. Nastala smjesa razrijedi se tako da joj je apsorbancija na 734 nm  $0,700 \pm 0,02$ . Tek kada smo napravili ovakvu otopinu u nju dodajemo antioksidans i pratimo gašenje radikala. Dakle, radikal kation

nastaje prije reakcije s antioksidansom, a ne tijekom. Time se isključuju moguće interferencije. Antioksidacijski potencijal izražava se kao ekvivalent Troloxa (TE), za što je potrebno izraditi baždarni dijagram.

- **POSTUPAK:**

0,5 mL otopine ABTS radikala razrijedi se s 20 mL destilirane vode, čime dobivamo apsorbanciju na 732 nm 0,724.

U dvije Eppendorf kivete otpipetira se po 150 µL adekvatno razrijeđenog uzorka, a u treću destilirana voda (kontrola). Uzorke analiziramo tako da u kivetu dodajemo 1750 µL prethodno napravljene otopine ABTS radikal kationa. U tom trenutku počnemo mjeriti vrijeme od 3 minute. Tijekom vremena kivetu vorteksiramo i sadržaj prebacujemo u kivetu spektrofotometra, te istekom 3 minute mjerimo apsorbanciju na 732 nm ( $A_{3min}$ ). S obzirom da je reakcija obezbojenja vrlo brza, maksimalnu apsorbanciju ( $A_{0min}$ ) je gotovo nemoguće izmjeriti. Zato se maksimalna apsorbancija određuje mjerenjem apsorbancije smjese koja sadrži 150 µL destilirane vode i 1750 µL ABTS radikal kationa. Uzorci su analizirani u duplikatu, a postotak gašenja radikala dobivamo formulom:

$$\Delta A (\%) = \left( \frac{A_{0min} - A_{3min}}{A_{0min}} \right) * 100$$

iz koje je vidljivo da je postotak gašenja radikala proporcionalan koncentraciji antioksidansa.

- **IZRADA BAŽDARNOG DIJAGRAMA:**

Potrebno je napraviti 20 mL ishodne otopine Troloxa (vodotopljivi oblik vitamina E) koncentracije 1 mg/mL u 96 % etanolu (IO1). Ishodna otopina 2 (IO2) koncentracije 10 µL/mL izrađuje se razrjeđenjem IO1 10 puta (2,5 mL razrijediti na 25 mL). Radne otopine izrađuju se razrjeđivanjem IO2 etanolom da se dobije raspon koncentracija 0-40 µg/mL. Mjerne otopine dobivaju se miješanjem radne otopine Troloxa sa otopinom ABTS radikala na isti način kako je opisano za uzorak. Apsoorbancija se mjeri 3 minute nakon miješanja na 732 nm. Postotak gašenja računa se prema gore navedenoj formuli i pokazuje se na baždarnom dijagramu u ovisnosti o koncentraciji Troloxa (mg/L).

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH testom

U ovom testu mjeri se sposobnost antioksidansa da neutralizira DPPH radikal. DPPH radikal ljubičasti je kromogen koji se reducira u hidrazin (DPPH-H) u reakciji s antioksidansom. Nastanje redoks para DPPH radikala, hidrazina, praćeno je promjenom boje u blijedožutu (Sanchez-Moreno, 2002). Reakcijski mehanizam zasniva se na prijenosu elektrona, dok je prijenos protona sekundarni reakcijski put, koji se odvija samo u jakim vodik-akceptorskim otapalima kao što su metanol i etanol, no i u tom slučaju reakcija se odvija vrlo sporo (Foti i sur., 2005). Na kinetiku reakcije utječu pH reakcijske smjese i otapalo. Ako je udio vode u otapalu veći od 60% dolazi do međusobne reakcije dvaju radikala. Time se smanjuje dostupnost DPPH radikala za reakciju s antioksidansom i dolazi do pada antioksidativnog kapaciteta.

Rezultat se izražava kao parametar učinkovite koncentracije ( $EC_{50}$ ). To je koncentracija antioksidansa koja uzorkuje 50 %-tno smanjenje početne koncentracije DPPH radikala (smanjenje početne apsorbancije ( $A_0$ ) otopine DPPH radikala). Sposobnost vezanja radikala obrnuto je proporcionalna parametru učinkovite koncentracije.

DPPH radikal (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je jedan od rijetkih stabilnih i komercijalno dostupnih organskih dušikovih radikala, te ima maksimum apsorpcije na 515 nm (Agric, 2005).

- **POSTUPAK:**

Svježa otopina DPPH priređena je u metanolu tako da koncentracija otopine bude  $1,826 \cdot 10^{-4}$  mol/L (0,18 mM). Radne otopine pripremaju se miješanjem različitih volumena uzoraka s različitim volumenima metanola, kako je prikazano u Tablici 3. Svaki je uzorak pripremljen u 6 različitih koncentracija. Mjerne otopine dobivamo miješanjem 1500  $\mu$ L otopine DPPH radikala i 500  $\mu$ L radne otopine. Dobro se promiješaju i inkubiraju na sobnoj temperaturi 30 minuta. Kontrolni uzorak ( $A_{0min}$ ; mjerna otopina bez antioksidansa) sadrži 1500  $\mu$ L otopine DPPH radikala i 500  $\mu$ L metanola. Uzorci su ispitivani u triplikatu. Mjeri se početna apsorbancija  $A_{0min}$  i apsorbancija nakon inkubacije  $A_{30min}$  na 515 nm valne duljine. Rezultati se prikazuju grafički, kao ovisnost postotka gašenja apsorbancije ( $\Delta A$ ) o koncentraciji uzorka (c mg/mL). Iz jednadžbe pravca izračuna se parametar učinkovite koncentracije ( $EC_{50}$ ) – koncentracija uzorka (antioksidansa) potrebna za 50 %-tno smanjenje početne koncentracije (apsorbancije,  $A_0$ ) DPPH radikala. Koncentracija uzorka izražava se u mg/mL. Ako je uzorak tekući, aproksimativno se uzima da 1 mL ekstrakta odgovara 1 g ekstrakta. Postotak gašenja apsorbancije ( $\Delta A$ ) računa se prema formuli:

$$\Delta A_{515\text{nm}} [\%] = \frac{A_{0\text{min}} - A_{30\text{min}}}{A_{0\text{min}}} \cdot 100$$

**Tablica 3.** Priprema radnih otopina za DPPH test

V(uzorka)/□L	V(MeOH)/□L	Razrjeđenje otopine uzorka metanolom
70	1930	29x
60	1940	33x
50	1950	40x
40	1960	50x
30	1970	67x
20	1980	100x

### 3.2.6 Statistička analiza

Za analizu podataka i grafičke prikaze istih korišten je GraphPad Prism 6.0 programski paket. U statističkoj obradi korišteni su parametrijski testovi: rezultati su prikazani kao aritmetička sredina, prikazana je standardna devijacija, a za usporedbu uzoraka korišten je Tukey-ov test višestruke usporedbe. Razina statističke značajnosti postavljena je vrijednost za  $p \leq 0,05$ . Mjerenja su provedena u duplikatu ili triplikatu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

- **Usporedba učinkovitosti mikrovalne i konvencionalne čvrsto-tekuće ekstrakcije**

Nakon provedenih ekstrakcija po principima opisanim u poglavlju Materijali i metode, uspoređena je učinkovitost konvencionalne (*CE*) i mikrovalne ekstrakcije (*ME*) usporedbom prinosa polifenola.

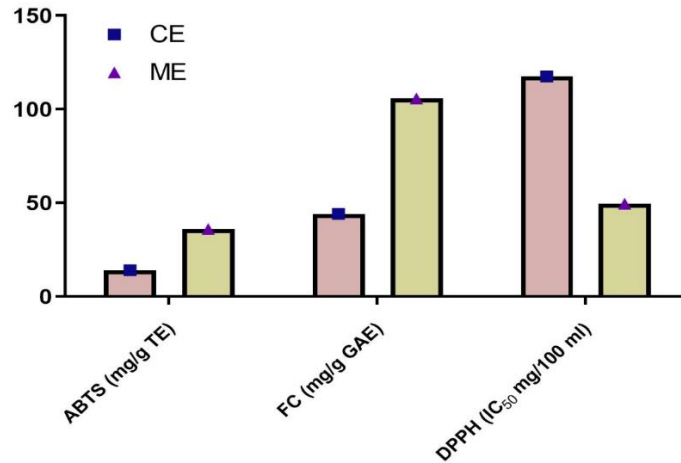
**Tablica 4.** Udjeli antioksidansa u ekstraktima dobivenih konvencionalnom i mikrovalnom ekstrakcijom dobiveni ABTS, FC i DPPH metodom

	CE			ME		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N
<b>ABTS (mg TE/ g OPE)</b>	14,004	0,330	2	36,002	0,073	2
<b>FC (mg GAE/ g OPE)</b>	44,211	0,878	2	105,852	2,273	2
<b>DPPH (IC<sub>50</sub> mg/ 100 mL)</b>	117,500	0,700	2	49,600	1,300	2

Oba uzorka sadrže suhi ekstrakt komine i  $\beta$ CD koncentracije 8 mg/mL. Rezultati su izraženi po masi čistog ekstrakta komine (g OPE). Rezultati provedenih analiza prikazani su u Tablici 4 i u grafičkom prikazu na Slici 13.

Antioksidacijski testovi provedeni na mikrovalnom ekstraktu pokazali su značajno povećanje prinosa antioksidansa. ABTS test prikazuje povećanje prinosa od 157%, povećanje ukupnog reduktivnog potencijala uzorka iznosi 139,4% dok je DPPH antiradikalna učinkovitost povećana za 136%. Korištenjem optimizirane mikrovalne ekstrakcije dobivamo značajno kvalitetnije ekstrakte u kraćem vremenskom periodu.

Navedeni statistički parametar standardne devijacije (SD) ukazuje na točnost dobivenih rezultata.



**Slika 10.** Usporedba učinkovitosti optimiranih postupaka mikrovalne i konvencionalne ekstrakcije obzirom na antioksidativnu aktivnost dobivenih ekstrakata

(Različita slova iznad stupića u grafičkom prikazu ukazuju na postojanje statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). CE- klasična ekstrakcija otapalom; ME – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; ABTS – ABTS antioksidativna aktivnost; FC – ukupni redukcijski potencijal; DPPH – DPPH antiradikalna aktivnost; TE – ekvivalenti Trolox-a; GAE – ekvivalenti galne kiseline; EC<sub>50</sub> – parametar učinkovite koncentracije; NE – nativni ekstrakt;  $\beta$ CD – beta ciklodekstrin; HP $\beta$  – hidrosilirani beta ciklodekstrin; RAMEB – nasumično metilirani beta ciklodekstrin)

- **Usporedba utjecaja različitih ciklodekstrina na kvalitetu ekstrakta**

Ekstraktima dobivenim mikrovalnom ekstrakcijom dodani su različiti ekscipijensi u svrhu ispitivanja utjecaja različitih CD na kvalitetu ekstrakta. Na temelju rezultata preliminarnih istraživanja u postupku ekstrakcije korišteni su:  $\beta$ CD koncentracije 8 mg/mL, HP $\beta$  koncentracije 16 mg/mL i RAMEB koncentracije 16 mg/mL. Za usporedbu, istražen je nativni ekstrakt (NE).



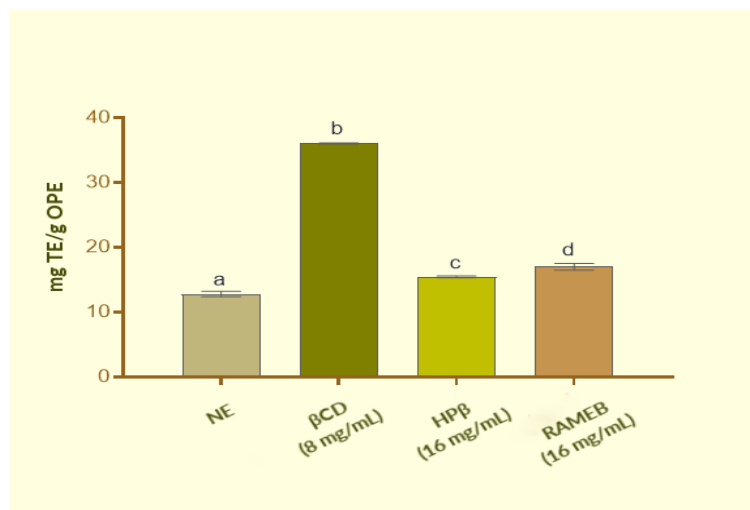
### ABTS antiradikalna učinkovitost ekstrakta komine masline

Nakon mjerenja apsorbancije svih uzoraka u duplikatu, prema formuli navedenoj u opisu metode računa se postotak gašenja apsorbancije ( $\Delta A$ ). Točne vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivamo iz baždarnog pravca, a izražene su kao ekvivalenti Troloxa (mg) po masi čistog ekstrakta komine masline (g OPE). Rezultati su prikazani u Tablici 5. Navedeni statistički parametar standardne devijacije (SD) ukazuje na točnost rezultata.

**Tablica 5.** ABTS antiradikalna aktivnost analiziranih ekstrakata

	mg/g TE	SD	N
NE	12,806	0,419	2
<b>βCD (8 mg/mL)</b>	36,002	0,073	2
<b>HPβ (16 mg/mL)</b>	15,437	0,133	2
<b>RAMEB (16 mg/mL)</b>	17,007	0,508	2

Usporednom svih uzoraka međusobno i provedenom statističkom analizom utvrđeno je da su razlike u sadržaju fenola u uzorcima značajne. Vrijednosti se kreću od 12,806 mg/g TE izmjereno u nativnom ekstraktu, do najviše vrijednosti 36,002 mg/g TE izmjereno u ekstraktu koji sadrži βCD. Uzorci koji sadrže HPβ i RAMEB također bilježe porast prinosa, ali nešto manje značajan. Najkvalitetniji je ekstrakt kojemu je dodan βCD, slijede ga ekstrakt s RAMEB, zatim HPβ, a najmanji sadržaj fenola određen je u nativnom preparatu.



**Slika 11.** Grafički prikaz utjecaja različitih ekscipijensa na ABTS antiradikalnu učinkovitost dobivenih suhih ekstrakata komine masline

(Različita slova iznad stupića u grafičkom prikazu ukazuju na postojanje statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). CE- klasična ekstrakcija otapalom; ME – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; ABTS – ABTS antioksidativna aktivnost; FC – ukupni redukcijski potencijal; DPPH – DPPH antiradikalna aktivnost; TE – ekvivalenti Trolox-a; GAE – ekvivalenti galne kiseline;  $EC_{50}$  – parametar učinkovite koncentracije; NE – nativni ekstrakt;  $\beta$ CD – beta ciklodekstrin; HP $\beta$  – hidrosilirani beta ciklodekstrin; RAMEB – nasumično metilirani beta ciklodekstrin)

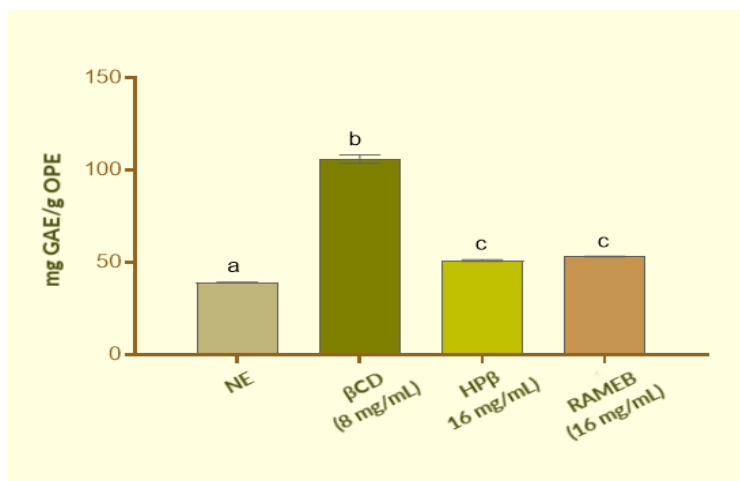
### Ukupni reduktivni potencijal ekstrakata komine masline

Rezultati istraživanja reduktivnog potencijala uzoraka izraženi su kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) po masi čistog ekstrakta komine masline (g OPE). Statistički parametar standardne devijacije (SD) računamo iz dobivenih koncentracija. Rezultati su prikazani u Tablici 6.

**Tablica 6.** Reduktivni potencijal analiziranih ekstrakata

	mg/g GAE	SD	N
NE	39,243	0,042	2
$\beta$ CD (8 mg/mL)	105,852	2,273	2
HP $\beta$ (16 mg/mL)	50,972	0,516	2
RAMEB (16 mg/mL)	53,158	0,164	2

Usporedbom svih uzoraka međusobno i statističkom obradom podataka utvrđeno je da je najznačajniji prinos fenola u uzorku s  $\beta$ CD. RAMEB i HP $\beta$  su također poboljšali prinose, ali u manjoj mjeri, a statistički njihova međusobna razlika nije značajna. Najniži izmjereni sadržaj fenola ponovno je u NE. Rezultati se kreću od 39,243 mg/g GAE izmjereno u nativnom uzorku, do 105,852 mg/g GAE u uzorku s  $\beta$ CD.



**Slika 12.** Grafički prikaz utjecaja različitih ekscipijensa na reduktivnu sposobnost dobivenih suhih ekstrakata komine masline

(Različita slova iznad stupića u grafičkom prikazu ukazuju na postojanje statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). CE- klasična ekstrakcija otapalom; ME – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; ABTS – ABTS antioksidativna aktivnost; FC – ukupni redukcijski potencijal; DPPH – DPPH antiradikalna aktivnost; TE – ekvivalenti Trolox-a; GAE – ekvivalenti galne kiseline; EC<sub>50</sub> – parametar učinkovite koncentracije; NE – nativni ekstrakt;  $\beta$ CD – beta ciklodekstrin; HP $\beta$  – hidrosilirani beta ciklodekstrin; RAMEB – nasumično metilirani beta ciklodekstrin)

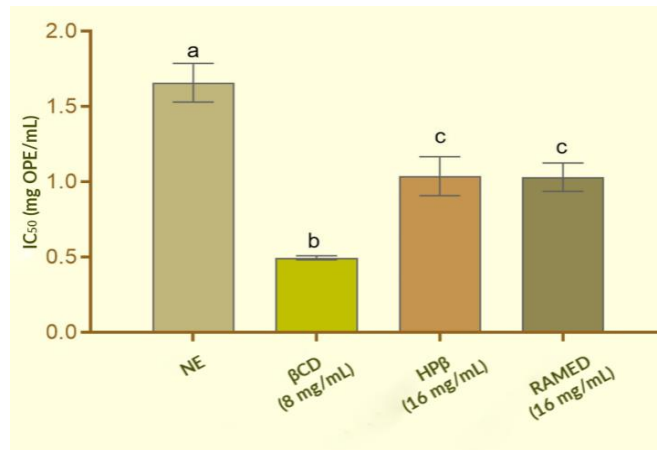
## DPPH metoda

Rezultati su izraženi kao parametri učinkovite koncentracije ( $EC_{50}$ ) i prikazani u Tablici 7.

**Tablica 7.** DPPH antiradikalna učinkovitost analiziranih ekstrakata

	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>
<b>NE</b>	1,659	0,129	2
<b>βCD (8 mg/mL)</b>	0,496	0,013	2
<b>HPβ (16 mg/mL)</b>	1,039	0,129	2
<b>RAMEB (16 mg/mL)</b>	1,032	0,094	2

Rezultati testa kreću se od vrijednosti 1,659 u nativnom uzorku do 0,496 u uzorku koji sadrži βCD. Ponovno zaključujemo da je ekstrakt koji sadrži βCD najkvalitetniji (ima najnižu  $EC_{50}$  vrijednost). Uzorci koji sadrže RAMEB i HPβ jednake su kvalitete jer je razlika u izmjerenoj antiradikalnoj učinkovitosti između ova dva uzorka statistički nevažna (1,039 u HPβ uzorku i 1,032 u RAMEB uzorku). Najmanja antiradikalna učinkovitost izmjerena je u NE.



**Slika 13.** Grafički prikaz utjecaja ekscipijensa na DPPH antiradikalnu učinkovitost dobivenih suhih ekstrakata komine masline

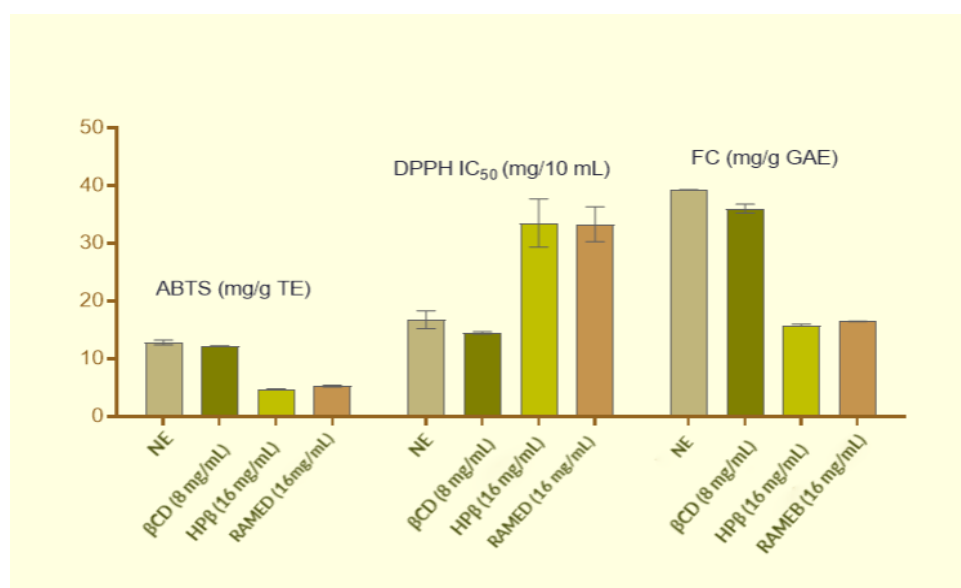
(Različita slova iznad stupića u grafičkom prikazu ukazuju na postojanje statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). CE- klasična ekstrakcija otapalom; ME – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; ABTS – ABTS antioksidativna aktivnost; FC – ukupni redukcijski potencijal; DPPH – DPPH antiradikalna aktivnost; TE – ekvivalenti Trolox-a; GAE – ekvivalenti galne kiseline; EC<sub>50</sub> – parametar učinkovite koncentracije; NE – nativni ekstrakt; βCD – beta ciklodekstrin; HPβ – hidroksilirani beta ciklodekstrin; RAMEB – nasumično metilirani beta ciklodekstrin)

- **Antioksidacijska aktivnost uzoraka izražena po ukupnoj masi OPE**

Rezultati svih provedenih testova izraženi su i po masi uzorka (OPE + ekscipijens) što je prikazano u Tablici 8. Na taj način moguće je usporediti antioksidativnu učinkovitost jednakih doza suhih ekstrakata.

**Tablica 8.** Prikaz rezultata svih metoda izraženih po masi uzorka

	ABTS (mg/g TE)			DPPH (IC <sub>50</sub> mg/10 mL)			FC (mg/g GAE)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
<b>NE</b>	12,806	0,419	2	16,770	1,550	2	39,243	0,042	2
<b>βCD (8 mg/mL)</b>	12,241	0,025	2	14,480	0,220	2	35,990	0,773	2
<b>HPβ (16 mg/mL)</b>	4,785	0,041	2	33,520	4,180	2	15,801	0,160	2
<b>RAMEB (16 mg/mL)</b>	5,272	0,157	2	33,280	3,020	2	16,479	0,051	2



**Slika 14.** Grafički prikaz utjecaja ekscipijensa na antioksidativnu aktivnost, izraženu po masi cjelovitog uzorka, kod svih provedenih testova

(Različita slova iznad stupića u grafičkom prikazu ukazuju na postojanje statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ). CE- klasična ekstrakcija otapalom; ME – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima; ABTS – ABTS antioksidativna aktivnost; FC – ukupni redukcijski potencijal; DPPH – DPPH antiradikalna aktivnost; TE – ekvivalenti Trolox-a; GAE – ekvivalenti galne kiseline; EC<sub>50</sub> – parametar učinkovite koncentracije; NE – nativni ekstrakt; βCD – beta ciklodekstrin; HPβ – hidrosilirani beta ciklodekstrin; RAMEB – nasumično metilirani beta ciklodekstrin)

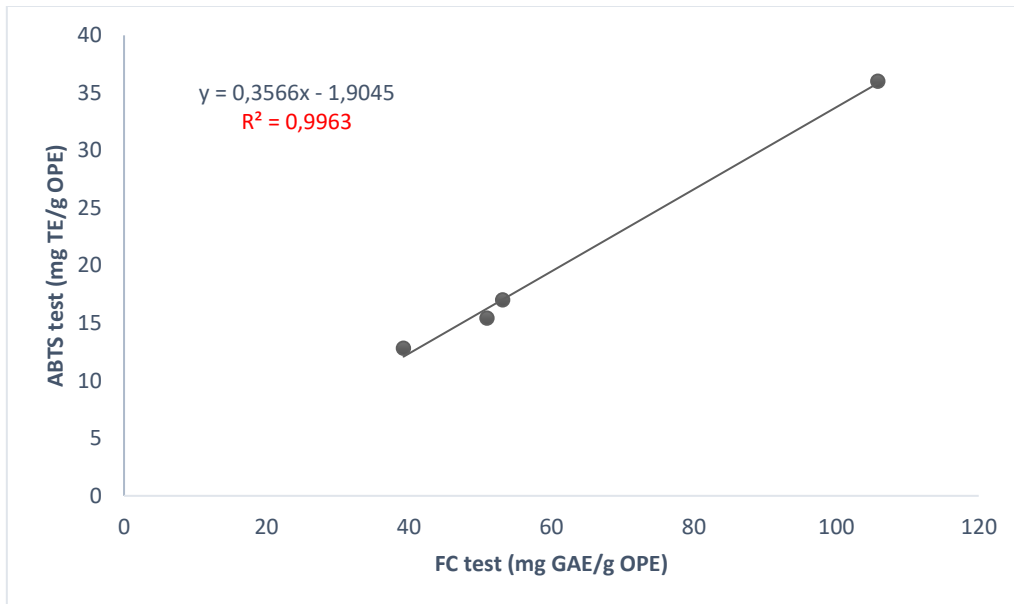
ABTS testom dobili smo rezultate koji se kreću od 4,785 mg/g TE za HPβ do 12,806 mg/g TE, u DPPH testu EC<sub>50</sub> vrijednosti se kreću od 14,480 mg/10 mL za HPβ do 33,520 mg/10 mL za βCD. FC test dao je rezultate koji se kreću od 15,801 mg/g GAE za HPβ do 39,243 mg/g GAE za nativni uzorak. Usporedbom rezultata zaključujemo da se primjenom uzorka s βCD postiže isti antioksidacijski učinak kao i kod nativnog uzorka, s tim da je koncentracija ekstrakta u formulaciji puno manja. Iako HPβ i RAMEB ekscipijensi imaju pozitivan učinak na prinose antioksidansa u ekstraktu, doze ekstrakta bi trebale biti dvostruko veće za postizanje istog antioksidativnog učinka kao kod nativnog preparata.

- **Korelacija dobivenih rezultata**

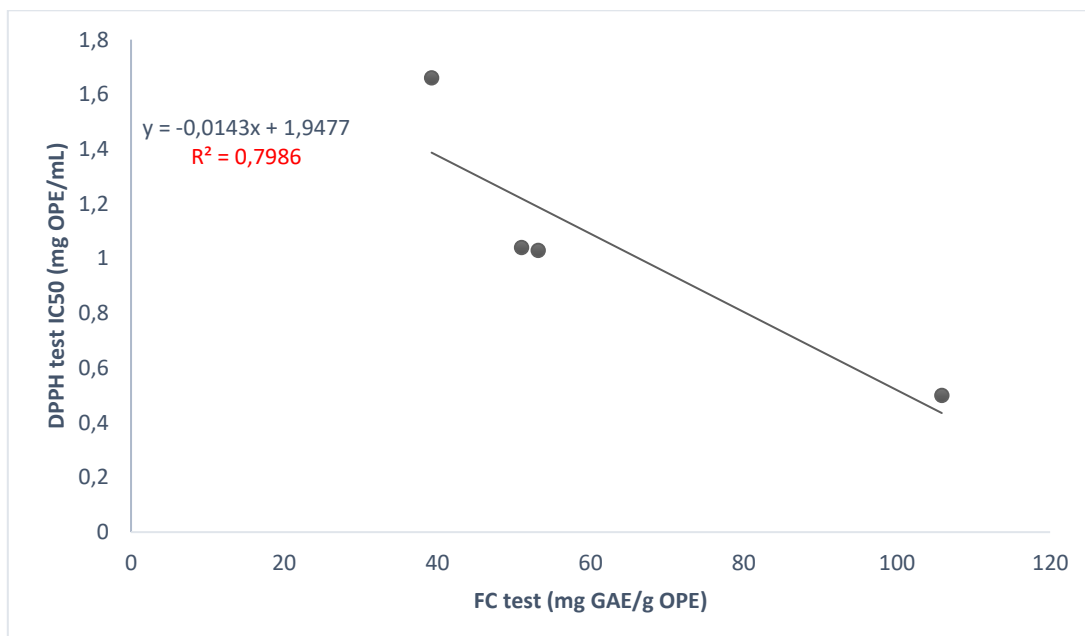
Folin-Ciocalteu metoda često se koristi za određivanje ukupnih fenola, jer su u određenim tipovima uzoraka upravo oni glavni nositelji redukcijskog potencijala. Koreliranjem rezultata dobivenih FC metodom sa rezultatima antiradikalne učinkovitosti uzoraka (ABTS i DPPH test) istražili smo doprinos polifenola OPE antiradikalnoj učinkovitosti OPE. Vrlo visoki koeficijent korelacije dobiven je za ABTS antiradikalni test i FC metodu. Time je dokazano da udio polifenola OPE proporcionalno uvjetuje antiradikalnu učinkovitost OPE – porastom jedne varijable povećava se i druga. Manje značajna negativna korelacija dobivena je za FC i DPPH testove – odnos je obrnuto proporcionalan. Manja značajnost korelacije ukazuje na doprinos drugih komponenti DPPH antiradikalnoj učinkovitosti analiziranih ekstrakata. Tablica 9. prikazuje rezultate provedenih metoda izraženih po masi OPE, a na Slikama 18 i 19 dobivene korelacije prikazane su grafički.

**Tablica 9.** Prikaz rezultata svih metoda izraženih po masi OPE

	FC (mg/g GAE)			ABTS (mg/g TE)			DPPH (IC <sub>50</sub> mg/mL)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
NE	39,24	0,04	2	12,81	0,42	2	1,66	0,13	2
βCD (8 mg/mL)	105,85	2,27	2	36,00	0,07	2	0,50	0,01	2
HPβ (16 mg/mL)	50,97	0,52	2	15,44	0,13	2	1,04	0,13	2
RAMEB (16 mg/mL)	53,16	0,16	2	17,01	0,51	2	1,03	0,09	2



*Slika 15.* Korelacija ABTS i FC testa



*Slika 16.* Korelacija DPPH i FC testa



## 4.2. Rasprava

- **Utjecaj mikrovalne ekstrakcije**

Optimirana mikrovalna ekstrakcija pokazala se učinkovitijom metodom u odnosu na konvencionalnu, što zaključujemo prema rezultatima provedenih antioksidacijskih testova. Zaključujemo da je uzrok prednosti mikrovalne ekstrakcije pred konvencionalnom ravnomjerna distribucija topline u mediju koji se zagrijava – mikrovalovi ravnomjerno zagrijavaju cijeli volumen sustava. Kod konvencionalne ekstrakcije prijenos topline nije ujednačen, već se toplina prenosi s područja više temperature sustava u područje niže temperature. U našem slučaju korištena je vodena kupelj. Ovakvim načinom reakcija je sporija te je dobiveni ekstrakt manje kvalitetan jer ne možemo postići optimalnu temperaturu u svim dijelovima sustava kojeg zagrijavamo. Povećane prinose polifenola u obje metode možemo pripisati korištenju ekscipijensa. Slični podaci su prikazani i u radovima drugih autora. Yu i sur. (2020) ekstrahirali su pet različitih komponenti iz listova smokve, između ostalog i polifenol rutin, s ciljem usporedbe kvalitete mikrovalne ekstrakcije i tradicionalnih metoda. Prinosi su bili veći kod ekstrakata dobivenih mikrovalnom ekstrakcijom. Xiaokang i sur. (2020) bavili su se optimizacijom uvjeta procesa ekstrakcije provodeći ispitivanja na shitake gljivi. Njihov rad istaknuo je brzi i jednolični transfer mase kao prednost mikrovalne ekstrakcije pred konvencionalnom. Takav transfer mase kod mikrovalne ekstrakcije posljedica je boljeg prodiranja otapala u uzorak. Calinescu i sur. (2017) u 10 minuta mikrovalne ekstrakcije ekstrahirali su jednaku količinu eteričnog ulja komorača kao i za 150 minuta konvencionalne ekstrakcije. Komorač su ispitivali i Akhtar i sur. (2020) te su došli do jednakih zaključaka: mikrovalnom ekstrakcijom dobivamo najveći prinos polifenola u najkraćem vremenu, u usporedbi sa Soxhelt ekstrakcijom i maceracijom.

- **Utjecaj cikodekstrina**

Usporedbom rezultata triju provedenih antioksidacijskih testova vidimo gotovo jednake rezultate: ekstrakt koji sadrži  $\beta$ CD kao ekscipijens sadrži najveći udio fenola. FC i DPPH radikal testovima utvrđeno je da je razlika u sadržaju fenola između RAMEB i HP $\beta$  ciklodekstrina nije statistički značajna, a na temelju sva tri testa zaključujemo da ekstrakt bez

ekscipijesna sadrži najmanji udio fenola. Ovaj fenomen možemo objasniti sposobnošću ciklodekstrina da stvaraju inkluzijske komplekse s makromolekulama, u ovom slučaju polifenolima. Stvaranjem inkluzijskih kompleksa povećava se stabilnost molekule stvaranjem intermolekularnih vodikovih veza u hidrofobnom području šupljine ciklodekstrina. Tako stabilizirani fenoli nisu podložni brzom razgradnji, na taj način ne gube komponente nositelje antioksidacijskih svojstava komine. Stvaranjem inkluzijskih kompleksa poboljšali smo i topljivost polifenola, što je važno jer se reakcije odvijaju u vodenoj otopini. Poboljšana topljivost se također odražava na poboljšanje antioksidacijskog potencijala. Nativni se uzorak kod svih ispitivanja istaknuo kao najmanje kvalitetan upravo zato jer nema ciklodekstrina koji bi stabilizirali polifenole i povećali im topljivost.

Ovakav učinak ciklodekstrina prikazan je u brojnim znanstvenim radovima. Celik i sur. (2011) ispitivali su antioksidacijski potencijal ružmarinske kiseline (RA) i različitih polifenola. Ružmarinska kiselina je polifenol slabo topljiv u vodi. Dokazano je stvaranje kompleksa RA-CD u omjeru 1:1, a CUPRAC metoda dokazala je povećanje antioksidacijskog kapaciteta kompleksa u odnosu na nekompleksiranu ružmarinsku kiselinu. Aree i Jongrungruangchok (2018) proveli su ispitivanje na polifenolima masline te dokazali inkapsulaciju oleuropeina, tirosola i hidroksitirosola ciklodekstrinima. Povećanje antioksidacijskog kapaciteta pripisano je stvaranju vodikovih veza između molekule gosta i molekule domaćina. Mourtzinos i sur. (2007) istražili su učinak ciklodekstrina na termalnu stabilnost komponenti ekstrakta maslinovog lista, između ostalog i oleuropeina. Dokazana je postojanost u uvjetima inače nepovoljne temperature zbog stvaranja inkluzijskih kompleksa u omjeru 1:1. Lucas-Abellan i sur. (2008) kompleksirali su resveratrol HP $\beta$  ciklodekstrinima. ORAC metodom dokazana je dvostruko veća antioksidativna aktivnost kompleksiranog resveratrola u odnosu na sustav bez ciklodekstrina. HP $\beta$  štiti resveratrol od brze oksidacije slobodnim radikalima, a antioksidativna aktivnost postiže maksimum kad je sav resveratrol kompleksiran.

Naše ispitivanje istaknulo je nemodificirani  $\beta$ CD kao ekscipijens najveće učinkovitosti. Možemo zaključiti da je uzrok tome struktura ciklodekstrina. Modificiranjem strukture, npr. metiliranjem, povećava se topljivost ciklodekstrina u vodi zbog pucanja intramolekulskih vodikovih veza. Ekscipijensi veće topljivosti manje će kompleksirati polifenole. Time će se smanjiti njihov udio i antireduktivna sposobnost. Nastaju metilirani, hidroksialkilirani i razgranati derivati.

Potpuna korelacija FC i ABTS testa dokazuje da su nositelji antiradikalne učinkovitosti u ABTS testu upravo polifenoli. Kod FC i DPPH testa imamo nepotpunu korelaciju iz čega zaključujemo da su za gašenje DPPH radikala važni i drugi antioksidansi iz OPE.

## 5. ZAKLJUČCI

Ovim radom istražena je primjena mikrovalne ekstrakcije kombinirana inkapsulacijom ciklodekstrinima u izradi ekstrakta komine masline. Međusobna kvaliteta ekstrakata, dobivenih klasičnom ekstrakcijom otapalom i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima, uspoređena je na temelju rezultata provedenih antioksidacijskih testova. Također je istražena učinkovitost primjene različitih ciklodekstrina ( $\beta$ CD, HP $\beta$  i RAMEB) u postupku ekstrakcije.

- Mikrovalnom ekstrakcijom dobiveni su kvalitetniji ekstrakti u odnosu na ekstrakte dobivene klasičnom ekstrakcijom. Djelovanjem energije mikrovalova pod određenom temperaturom dobivamo veći prinos polifenola u kraćem vremenu.
- Dodatak određenih ekscipijensa mijenja kvalitetu ekstrakta. Uzorak sa  $\beta$ -CD kao ekscipijensom pokazao se kao najkvaliteniji, dok je prinos polifenola najmanji u nativnom uzorku.
- Takav učinak ciklodekstrina objašnjavamo njihovom sposobnošću stvaranja inkluzijskih kompleksa.
- Kao najbolji ekscipijens pokazao se  $\beta$ -ciklodekstrin, kojeg slijede hidroksipropilirani i metilirani  $\beta$ -CD. Zaključujemo da je uzrok tome manja topljivost nemodificiranog ciklodekstrina.
- Prema FC i DPPH testu nema značajne razlike u kvaliteti ekstrakata koji sadrže HP $\beta$  i RAMEB ekscipijense.
- ABTS i FC test su u korelaciji, dok su ABTS i DPPH, te FC i DPPH u manje značajnoj negativnoj korelaciji.
- Potpuna korelacija ABTS i FC testa dokazuje da su polifenoli glavni nositelji ABTS antiradikalne učinkovitosti u suhom ekstraktu komine masline.

## 6. LITERATURA

Abert VM, Fernandez X, Visinoni F, Chemat F. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J Chrom A*, 2008, 1190, 14-17.

Albuquerque JA, Gonzalez J, Garcia D, Cegarra J. Agrochemical characterization of „alperujo“, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technol*, 2004, 91, 195-200.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 2002, 127, 183-198.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 1998, 78, 547-581.

Besenard G, Rubio de Casas R, Christin PA, Vargas P. Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Annals of Botany*, 2009, 104(1), 145-160.

Bousbia N, Vian AM, Ferhat MA, Petitcolas E, Meklati BY, Chemat F. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem*, 2009, 114, 355-362.

Brachet A, Christen P, Veuthey JL. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem Anal*, 2002, 13(3), 162-169.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens-Wiss Technol*, 1995, 28, 25-30.

Chemat S, Lagha A, Amar HA, Chemat F. Ultrasound assisted microwave digestion, *Ultrason Sonochem*, 2004, 11, 5-8.

Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of pharmacology and Toxicology*, 1999, 39, 67-101.

Eskilsson S, Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chrom A*, 2000, 902(1), 227–250.

Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci Tech*, 2010, 21, 510-524.

Fernández-Bolaños J, Rodriguez G, Rodriguez R, Heredia A, Guillen R, Jimenez A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of the two-phase olive oil processing or „alperujo“. *J Agri Food Chem*, 2002, 50(23), 6804-6811.

Fki I, Bouaziz M, Sahnoun Z, Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorgan Med Chem*, 2005, 59, 5362-5370.

Font N, Hernandez F, Hogendoorn EA, Baumann RA, Van Zoonen P. Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J Chrom A*, 1998, 26(9-10), 798.

Foti MC, Daquino G, Gersci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with DPPH radical in alcoholic solutions. *J Org Chem*, 2004, 13, 2309-2314.

Garcia-Castello E, Cassano A, Criscuoli A, Conidi C, Drioli E. Recovery and concentration of polyphenols from olive millwastewaters by integrated membrane system. *Water Res*, 2010, 1821(3), 3883-3892.

Green PS. A revision of *Olea L.* (Oleaceae). *Kew Bulletin*, 2002, 384, 90-140.

Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr*, 2003, 67, 544-551.

Jug M, Bećirević-Laćan M. Cyclodextrin-based pharmaceuticals. *HAZU*, 2008, 499, 9-26.

Lianfu Z, Zelong L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem*, 2008, 53, 731–737.

López S, Pacheco YM, Bermudez B, Abia R, Muriana FJG. Olive oil and cancer. *Grasas Aceites*, 2004, 12(6), 33-41.

Luaces P, Romero C, Gutierrez F, Sanz C, Pérez AG. Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil. *J Sci Food Agric*, 2007, 134(9), 2721-2727.

Maestro-Durán R, Leon-Cabello R, Ruiz-Gutierrez V, Fiestas P, Vazquez-Roncero A. Glucosidos fenólicos amargos de las semillas del olivo. *Grasas Aceites*, 1994, 16(7), 332-335.

McNamara CJ, Anastasiou CC, O'Flaherty V, Mitchell R. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int Biodeter Biodegr*, 2008, 25(12), 127-134.

Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 1993, 84, 407-412.

Moral PS, Méndez VR. Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites*, 2006, 12, 47-55.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*, 2000, 57(5), 1235-1247.

Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr*, 2003, 140, 2812-2819.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*, 2006, 61(50), 429-445.

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005, 870(2), 4290-4302.

Puhl M, Waeg G, Esterbauer H. Method to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol*, 1994, 56, 425-440.

Radić K, Jurišić Dukovski B, Vitali Čepo D. Influence of pomace matrix and cyclodextrine encapsulation on olive pomace polyphenols' bioaccessibility and intestinal permeability. *Nutrients*, 2020, 12(3), 123-669.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoid and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20, 933-956.

Rodríguez G, Lama A, Rodríguez R, Jiménez A, Guillén R, Fernández-Bolaños J. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technol*, 2008, 107, 5261-5229.

Roig A, Cayuela ML, Sanchez-Monedero MA. An overview on olive mill wastes and their valorization methods. *Waste Manage*, 2006, 175, 960-969.

Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agric Food Chem*, 2003, 7(5-6), 2532-2538.

Sesli M, Yeğenoğlu ED. RAPD-PCR analysis of cultured type olives in Turkey. *African J Biotechnol*, 2009, 104(1), 3418-3423.

Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 2015, 96(1), 820-897.

Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 2010, 55(20), 4067-4097.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos , Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Agric Food Chem*, 2006, 98(22), 670-675.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Internation Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 52(12), 44-84.

Više nadmorske visine – kvalitetnije ulje?, 2019, pristupljeno 21.04.2020.

Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 95(4), 300-312.

Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 8418-8426.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Proizvodnju maslinovog ulja iz plodova masline karakterizira nastanak velikih količina ekotoksičnog otpada - komine masline i otpadnih voda, čije odlaganje predstavlja izazov u ekološkom i ekonomskom smislu. S druge strane, ekstrakt komine masline sadrži značajne količine bioaktivnih antioksidansa te se u tom smislu može smatrati vrijednom sekundarnom sirovinom. Ovim radom istražena je učinkovitost mikrovalne ekstrakcije spregnute inkapsulacijom ciklodekstrinima u dobivanju ekstrakata komine masline. Primjenom postupka optimirane mikrovalne ekstrakcije dobiveni su značajno kvalitetniji ekstrakti u kraćem vremenu i uz manji utrošak otapala, u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom otapalom. Ispitan je utjecaj različitih ciklodekstrina na mjereni antioksidacijski potencijal. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da inkapsulacija ciklodekstrinima rezultira dodatnim porastom prinosa antioksidansa, ovisno o vrsti primijenjenog ciklodekstrina, pri čemu se  $\beta$ - ciklodekstrin pokazao kao najbolji ekscipijens.

Olive oil production is characterized by the production of a large amount of ecotoxic waste - olive pomace and wastewater, the disposal of which is a challenge in ecological and economic terms. On the other hand, olive pomace extract contains significant amounts of bioactive antioxidants and in this sense can be considered a valuable secondary raw material. This paper investigates the efficiency of microwave extraction coupled by encapsulation with cyclodextrins in obtaining olive pomace extracts. Using the optimized microwave extraction process, significantly better quality extracts were obtained in a shorter time and with lower solvent consumption, compared to conventional solvent extraction. The influence of different cyclodextrins on the measured antioxidant potential was investigated. The results of the conducted research show that encapsulation with cyclodextrins results in an additional increase in antioxidant yield, depending on the type of cyclodextrin used, with  $\beta$ -cyclodextrin proving to be the best excipient.

## 8. PRILOZI

### 8.1. *Popis kratica*

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina

$\beta$ CD –  $\beta$ - ciklodekstrin

CD – ciklodekstrin

CE – konvencionalna/klasična ekstrakcija

DPPH – 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil

FC – Folin-Ciocalteu

GAE – gallic acid equivalence/ ekvivalent galne kiseline

HAT – hydrogen atom transfer

HP $\beta$  – hidroksipropil –  $\beta$ - ciklodekstrin

ME – mikrovalna ekstrakcija

NE – nativni ekstrakt

OPE – suhi ekstrakt komine masline

OMWW – olive mill wastewater/ otpadna voda

RAMEB – nasumično metilirani ciklodekstrin

ROS – reaktivne kisikove vrste

SD – standardna devijacija

SET – single electron transfer

TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity

TROMW – two-phase olive mill waste/ otpad dvofaznog mlina

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### PRIMJENA MIKROVALNE EKSTRAKCIJE I ENKAPSULACIJE U IZRADI EKSTRAKTA KOMINE MASLINE

Ana Domin

#### SAŽETAK

Proizvodnju maslinovog ulja iz plodova masline karakterizira nastanak velikih količina ekotoksičnog otpada - komine masline i otpadnih voda, čije odlaganje predstavlja izazov u ekološkom i ekonomskom smislu. S druge strane, ekstrakt komine masline sadrži značajne količine bioaktivnih antioksidansa te se u tom smislu može smatrati vrijednom sekundarnom sirovinom. Ovim radom istražena je učinkovitost mikrovalne ekstrakcije spregnute inkapsulacijom ciklodekstrinima u dobivanju ekstrakata komine masline. Primjenom postupka optimirane mikrovalne ekstrakcije dobiveni su značajno kvalitetniji ekstrakti u kraćem vremenu i uz manji utrošak otapala, u usporedbi s klasičnom ekstrakcijom otapalom. Ispitan je utjecaj različitih ciklodekstrina na mjereni antioksidacijski potencijal. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da inkapsulacija ciklodekstrinima rezultira dodatnim porastom prinosa antioksidansa, ovisno o vrsti primijenjenog ciklodekstrina, pri čemu se  $\beta$ - ciklodekstrin pokazao kao najbolji ekscipijens.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 7 grafičkih prikaza, 9 tablica i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, antioksidacijski potencijal, mikrovalna ekstrakcija, enkapsulacija, ciklodekstrini

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Mario Jug**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Nutritional Chemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### APPLICATION OF THE COMBINED PROCESS OF MICROWAVE EXTRACTION AND ENCAPSULATION WITH CYCLODEXTRINS IN THE PRODUCTION OF OLIVE POMACE EXTRACT

**Ana Domin**

#### SUMMARY

Olive oil production is characterized by the production of a large amount of ecotoxic waste - olive pomace and wastewater, the disposal of which is a challenge in ecological and economic terms. On the other hand, olive pomace extract contains significant amounts of bioactive antioxidants and in this sense can be considered a valuable secondary raw material. This paper investigates the efficiency of microwave extraction coupled by encapsulation with cyclodextrins in obtaining olive pomace extracts. Using the optimized microwave extraction process, significantly better quality extracts were obtained in a shorter time and with lower solvent consumption, compared to conventional solvent extraction. The influence of different cyclodextrins on the measured antioxidant potential was investigated. The results of the conducted research show that encapsulation with cyclodextrins results in an additional increase in antioxidant yield, depending on the type of cyclodextrin used, with  $\beta$ -cyclodextrin proving to be the best excipient.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 7 figures, 9 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Key words: olive pomace, antioxidant potential, microwave assisted extraction, encapsulation, cyclodextrins

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lovorka Vujić, Ph.D.**, Assistant professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Jug, Ph.D.**, Full professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september, 2020.