# Određivanje antioksidativne aktivnosti komine masline metodom izbjeljivanja beta karotena

**Krajnović, Rahela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:353485

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

**Rahela Krajnović**

# Određivanje antioksidativne aktivnosti komine masline metodom izbjeljivanja β-karotena

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Biokemija 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 se mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu i stručnom vodstvu tijekom izdrade ovog rada te na poticanju velikog interesa za područje Biokemije prehrane. Također se zahvaljujem asistentici Kristini Radić, mag. pharm., koja mi je strpljivo približila i olakšala izvođenje eksperimentalnog rada. Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, strini, braći, obitelji, prijateljima i dečku na velikoj podršci koju su mi pružali tijekom studija.

# SADRŽAJ

1. UVOD ..... 1
1.1. Antioksidansi ..... 1
1.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti ..... 1
1.2.1. Kemijske metode ..... 1
1.2.1.1. Metode gašenja radikala/reaktivnih kisikovih specija ..... 1
1.2.1.1.1. Metode bazirane na HAT-mehanizmu ..... 2
1.2.1.1.1.1. ORAC metoda ..... 2
1.2.1.1.1.2. TRAP metoda ..... 3
1.2.1.1.1.3. Metoda izbjeljivanja krocina ..... 4
1.2.1.1.2. Metode bazirane na ET-mehanizmu ..... 4
1.2.1.1.2.1. TEAC metoda ..... 4
1.2.1.1.2.2. DPPH metoda ..... 5
1.2.1.2. Neradikal-metode bazirane na redoks potencijalu ..... 5
1.2.1.2.1. FRAP metoda ..... 6
1.2.1.2.2. CUPRAC metoda ..... 6
1.2.1.3. Kapacitet keliranja metala ..... 6
1.2.2. Metode mjerenja stupnja lipidne peroksidacije ..... 7
1.2.2.1. TBA metoda ..... 8
1.2.2.2. MA/HPLC metoda ..... 8
1.2.2.3. MA/GC metoda ..... 8
1.2.2.4. Metoda izbjeljivanja β-karotena ..... 8
1.2.3. Biološki modeli za određivanje antioksidativne aktivnosti ..... 9
1.2.3.1. Metoda inhibicije oksidacije LDL-kolesterola ..... 9
1.2.3.2. Metoda inhibicije oksidacije i kidanja DNA ..... 10
1.2.3.3. Stanične metode ..... 10
1.2.3.3.1. Metoda inhibicije hemolize ..... 10
1.2.3.3.2. CAA metoda ..... 11
1.2.3.4. *In vivo* modeli ..... 11
1.2.3.4.1. Reducirani glutation (GSH) ..... 12
1.2.3.4.2. Glutation peroksidaza (GSHPx) ..... 12

1.2.3.4.3. Glutation-S-transferaza (GSt) ..... 12
1.2.3.4.4. Superoksid-dismutaza (SOD) ..... 13
1.2.3.4.5. Katalaza (CAT) ..... 13
1.2.3.4.6. γ-glutamil transpeptidaza (GGT) ..... 13
1.2.3.4.7. Glutation reduktaza (GR) ..... 13
1.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti u modelima hrane ..... 14
1.2.4.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti u jestivim uljima ..... 15
1.2.4.1.1. Mjerenje potrošnje kisika ..... 15
1.2.4.1.2. Mjerenje promjene supstrata ..... 15
1.2.4.1.3. Mjerenje oksidacijskih procesa ..... 16
1.2.4.1.3.1. Peroksidni broj ..... 16
1.2.4.1.3.2. Konjugirani oksidacijski produkti ..... 16
1.2.4.1.3.3. TBARS ..... 17
1.2.4.1.3.4. p-anisidin vrijednost (p-AnV) ..... 17
1.2.4.1.3.5. Ukupni karbonilni spojevi ..... 17
1.2.4.1.3.6. Sekundarni hlapljivi produkti ..... 17
1.2.4.1.3.7. OSI ..... 18
1.2.4.1.3.8. Mjerenje slobodnih radikala ..... 18
1.2.4.1.4. Mjerenje promjena u sustavu tijekom oksidacije ..... 19
1.2.4.2. Mjerenje antioksidativne aktivnosti u emulzijskim modelima ..... 20
1.2.4.2.1. Metoda izbjeljivanja β-karotena ..... 20
1.2.4.2.2. Drugi emulzijski modeli ..... 21
1.2.4.3. Mjerenje antioksidativne aktivnosti u mišićnim modelima hrane ..... 21
1.2.4.3.1. Modeli za evaluaciju antioksidativne učinkovitosti ..... 22
1.3. Komina masline ..... 23
2. OBRAZLOŽENJE TEME ..... 24
3. MATERIJALI I METODE ..... 25
3.1. Materijali ..... 25
3.1.1. Kemikalije ..... 25
3.1.2. Instrumenti i oprema ..... 26
3.2. Metode ..... 27
3.2.1. Priprema uzoraka ..... 27

3.2.2. Metoda izbjeljivanja β-karotena ..... 28
3.2.2.1. Princip metode ..... 28
3.2.2.2. Priprema Britton pufera, 100 mM, pH 6.5 ..... 28
3.2.2.3. Priprema reagensa (emulzije) ..... 28
3.2.2.4. Postupak ..... 29
3.2.2.5. Mjerenje apsorbancije ..... 30
3.2.3. Statističke metode ..... 30
4. Rezultati i rasprava ..... 31
4.1. Rezultati ..... 31
4.2. Rasprava ..... 37
5. ZAKLJUČCI ..... 41
6. LITERATURA ..... 42
7. SAŽETAK/SUMMARY ..... 44

# 1. UVOD

## 1.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje imaju sposobnost odgoditi ili inhibirati oksidacijske procese do kojih dolazi pod utjecajem atmosferskog kisika ili reaktivnih kisikovih specija (ROS). Koriste se za stabilizaciju polimernih produkata, petrokemikalija, prehrambenih proizvoda, kozmetike i farmaceutskih proizvoda. Sudjeluju i u obrambenom mehanizmu ljudskog organizma protiv patoloških procesa uzrokovanih slobodnim radikalima (Pisoschi i Negulescu, 2011). Antioksidativna aktivnost može se pratiti mnoštvom testova temeljenih na različitim antioksidativnim mehanizmima, uključujući prijenos atoma vodika (HAT), prijenos jednog elektrona (ET), reducirajuću sposobnost i keliranje metala, uz mnoge druge. Za odabir odgovarajuće metode evaluacije antioksidativnog potencijala za željenu namjenu važno je razumijevanje principa mehanizama te prednosti i nedostataka mjernih testova. Prikladnu metodu ili kombinaciju metoda izrazito je bitno odabrati kako bismo dobili uvid u stvarni potencijal antioksidansa, bilo kao dodatka hrani ili kao čimbenika poboljšanja ljudskog zdravlja (Shadidi i Zhong, 2015).

## 1.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

### 1.2.1. Kemijske metode

Kemijske metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti jednostavne su, brze, automatizirane i široko rasprostranjene u evaluaciji novih antioksidativnih sastavnica ili ekstrakata prirodnih produkata/nusprodukata (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.1.1. Metode gašenja radikala/reaktivnih kisikovih specija (ROS, engl. Reactive Oxygen Species)

U jednostavnim "nelipidnim" sustavima dostupno je mnogo testova za direktno mjerenje *prijenosa vodikovog atoma* ili *prijenosa jednog elekrona* s potencijalnih antioksidanasa na slobodne radikale. Antioksidativne aktivnosti prikazane ovom grupom metoda povezuju se s njihovim kapacitetom gašenja određenih vrsta radikalnih specija, od koje su neke umjetno dobivene i biološki irelevantne. Stoga su metode kritizirane, jer ne odražavaju stvarnu

situaciju oksidacije hrane ili situaciju *in vivo*. Unatoč tome, ove metode daju informacije o unutarnjem antioksidativnom potencijalu uz minimalne vanjske interferencije. Za ove testove potrebni su: kemijski sustav koji sadrži oksidans (slobodne radikale ili ROS), proba koja se oksidira (ne nužna za sve testove) i antioksidans koji se istražuje (Shadidi i Zhong, 2015). Neke tipične reaktivne kisikove specije (ROS) su superoksid ($O_2^{\bullet}$), kisikov singlet ($^1O_2$), kisikov triplet ($^3O_2$), ozon ($O_3$), hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$), alkoksilni radikal ($RO^{\bullet}$) i peroksilni radikal ($ROO^{\bullet}$) (Moon i Shibamoto, 2009).

Ovisno o kemijskoj reakciji, testovi pripadaju dvjema kategorijama, onima baziranima na prijenosu vodika (HAT) i testovima prijenosa jednog elektrona (ET). Proton kombinirani ET i HAT testovi mogu se odvijati paralelno, u tom slučaju dominantan će mehanizam ovisiti o strukturi i svojstvima antioksidansa, topljivosti, koeficijentu razdjeljenja, kao i o sustavu otapala. Antioksidativne aktivnosti prikazuju se inhibicijom oksidacije probe ili ekvivalentima referentnog antioksidansa, primjerice Troloxa, askorbinske kiseline ili drugih. Shadidi i Zhong (15) navode da se oksidacija probe mjeri različitim detekcijskih tehnologijama, među njima su spektrofotometrijske, fluorimetrijske, kemiluminiscencijske, EPR (elektronska paramanetska rezonancija), FT-IR (Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija), NMR (nuklearna magnetska rezonancija) i amperometrijske metode.

HAT reakcije su brze i obično se odvijaju uz međudjelovanje peroksilnih radikala. Mogu se prikazati kako slijedi:

$X^{\bullet} + AH \rightarrow XH + A^{\bullet}$ ;

gdje je $X^{\bullet}$ - slobodni radikal, AH - pretpostavljeni antioksidans koji djeluje kao donor vodikovog atoma (Litescu i sur., 2010).

### 1.2.1.1.1. Metode bazirane na HAT-mehanizmu

#### 1.2.1.1.1.1. ORAC metoda (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity)

ORAC prati antioksidativnu inhibiciju oksidacije uzrokovane peroksilnim radikalom, slobodnim radikalom pronađenim kod lipidne oksidacije hrane i bioloških sustava. Peroksilni radikali dobiveni generiranjem reagiraju s fluorescentnom probom što rezultira gubitkom fluorescencije (Shadidi i Zhong, 2015). U prisutnosti antioksidansa gašenje fluorescencije je inhibirano. Inhibicija se računa u odnosu prema 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilnoj kiselini (Troloxu). Trolox se koristi kao referentno sredstvo, vodotopljivi je

vitamin s dokazanom antioksidativnom aktivnošću prema ROS-ovima (Litescu i sur., 2010). Ukupna površina ispod padajuće krivulje fluorescencije (razlika površine ispod krivulje uz antioksidans i površine ispod krivulje bez antioksidansa) može biti izračunata kao indikator antioksidativnog kapaciteta gašenja peroksilnih radikala. Često korišteni generatori peroksilnih radikala u ORAC testovima su azo-spojevi, hidrofilni AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) i lipofilni AIBN, ABAP, AMVN. AAPH se, primjerice, mora termički raspasti u prisustvu kisika da bi stvorio radikal (Shadidi i Zhong, 2015), tako da je generiranje radikala osjetljivo na temperaturu. Ova metoda može koristiti β-fikoeritrin (β-PE) ili fluorescein kao ciljne probe (Alam i sur., 2013). Predložene su novije fluorescentne probe, Nile blue, pirogalol crvena i p-aminobenzojeva kiselina (Shadidi i Zhong, 2015) zbog pogrešnih interpretacija i neustaljenih rezultata uz uporabu starijih. Iako je originalno razvijena za mjerenje hidrofilnih antioksidanasa, ORAC metoda je prilagođena za detekciju lipofilnih antioksidanasa promjenom izvora radikala i otapala (Shadidi i Zhong, 2015).

Antioksidansi mogu stvarati kelate s metalima, što vodi podcijenjivanju kapaciteta gašenja slobodnih radikala. Metalni kelator, EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) može biti od pomoći za izbjegavanje te interferencije (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.1.1.1.2. TRAP metoda (engl. Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay)

Jedna je od prvih metoda korištenih za određivanje potpunog antioksidativnog kapaciteta krvne plazme ili seruma. Specije uključene u TRAP metodu su peroksilni radikali generirani termolizom AAPH i tvari koje se peroksidiraju, a sadržane su u plazmi ili drugim biološkim tekućinama. AAPH se dodaje u plazmu u kojoj se sastavnice koje se oksidiraju promatraju kroz potrošnju kisika na površini kisikove elektrode. Princip mjerenja je inhibicija oksidacije prisustvom antioksidansa. Vremenski interval indukcije reakcije (*lag faza*) uspoređuje se s vremenskim intervalom referentnog spoja, Troloxa. Glavni nedostatak metode je nestabilnost kisikove elektrode (Litescu i sur., 2010). Kako bi se prevladalo ovo ograničenje, metoda je unaprijeđena korištenjem fluorescentne ciljne probe te se sposobnost plazme da zaštiti β-fikoeritrin (β-PE) od oksidacije peroksilnim radikalom prati fluorimetrijski (Magalhães i sur., 2008).

### 1.2.1.1.1.3. Metoda izbjeljivanja krocina

Krocin je prirodni karotenoid prisutan u nekim cvjetovima roda *Crocus* i *Gardenia*. Otapanjem u vodi tvori narančastu otopinu. Korištenjem krocina kao fluorescentnog markera, ovom metodom se određuje antioksidativni kapacitet uzorka. Ako se AAPH radikal doda u otopinu krocina, dolazi do izbjeljivanja. U prisustvu antioksidansa, brzina izbjeljivanja se smanjuje i antioksidativnu učinkovitost moguće je izračunati pomoću funkcije inhibicije izbjeljivanja (Litescu i sur., 2010).

Sve tri opisane metode (ORAC, TRAP i metoda izbjeljivanja krocina) mogu se prilagoditi automatiziranim metodologijama visoke propusnosti i to korištenjem čitača mikrotitarskih ploča (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.1.1.2. Metode bazirane na ET-mehanizmu

ET (transfer jednog elektrona; single electron transfer) metode se koriste u ocjenjivanju redukcijske sposobnosti antioksidansa prema specifičnom oksidansu. ET reakcije obično su spore, zahtijevaju veći vremenski period i odvijaju se u više koraka kao što je prikazano:

$X^{\bullet} + AH \rightarrow X^{-} + AH^{\bullet+}$

$AH^{\bullet+} + H_2O \rightarrow A^{\bullet} + H_3O^{+}$

$X^{-} + H_3O^{+} \rightarrow XH + H_2O$

$M(III) + AH \rightarrow AH^{+} + M(II)$ ;

gdje je $X^{\bullet}$ - slobodni radikal, AH – pretpostavljeni antioksidans sposoban prenijeti elektron, M – 3d metal spodoban inicirati lančanu reakciju (Litescu i sur., 2010).

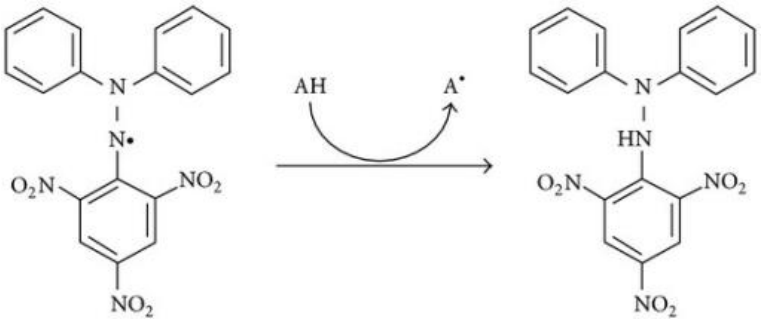
#### 1.2.1.1.2.1.TEAC metoda (engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Metoda mjeri antioksidativnu sposobnost gašenja radikalnog kationa $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), plavo-zelenog kromofora s maksimumom apsorpcije na 724 nm, čiji intenzitet opada u prisustvu antioksidansa. $ABTS^{\bullet+}$ generira se u prisustvu jakog oksidansa (metmioglobin u originalnoj upotrebi, kasnije zamijenjen kalijevim persulfatom). Iako je TEAC metoda klasificirana kao ET metoda, HAT mehanizam također se primjenjuje. Mjera obezbojenja plavo-zelene boje, kvantificirana kao smanjenje apsorbancije na 724 nm, ovisi o trajanju reakcije, unutarnjoj antioksidativnoj aktivnosti i koncentraciji

uzorka. Rezultati se prikazuju kao ekvivalenti Troloxa. Ova se metoda, kao i ostale metode gašenja radikala može prilagoditi tehnologiji s mikropločama i FI (flow injection) tehnologiji. Može se kombinirati s HPLC-om za traženje zasebnih antioksidanasa iz složene mješavine. $ABTS^{\bullet+}$ je topljiv u hidrofilnim i lipofilnim medijima (Shadidi i Zhong, 2015) te je metoda pogodna za hidrofilne i lipofilne antioksidanse (Alam i sur., 2013).

### 1.2.1.1.2.2. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metoda

$DPPH^{\bullet-}$ je stabilan slobodni radikal zahvaljujući svojstvu delokalizacije slobodnog elektrona, zbog kojeg molekula ne dimerizira, kao što bi bio slučaj kod ostalih radikala (Alam i sur., 2013). Radikal apsorbira vidljivu svjetlost na 515 nm što se vidi kao crveno-ljubičasto obojenje, dok se u proton-donorskoj otopini generira njegov reducirani oblik (neradikalni) s gubitkom ljubičaste i pojavom blijedo-žute boje. Reakcija kreće s prijenosom elektrona, dok je prijenos protona zapravo sekundarna reakcija do koje dolazi u otapalima s jakim vodikovim vezama kao što su metanol i etanol. Dobar izbor za analizu lipofilnih i hidrofilnih antioksidanasa je otopina 50% (v/v) voda/etanol. U slučaju proton-donorskog otapala, natjecanje za doniranje vodika između antioksidansa i otapala može dovesti do lažno pozitivnih rezultata (Litescu i sur., 2010).




Slika 1. Reakcija vezanja protona na $DPPH^{\bullet-}$ (Texiera i sur., 2013).

### 1.2.1.2. Neradikal-metode bazirane na redoks potencijalu

Antioksidansi su poznati i kao reducensi. Njihova elektron-donorska sposobnost, osim što im omogućuje gašenje slobodnih radikala i drugih ROS-ova, također im daje sposobnost redukcije višeg valentnog stanja elementa u niže valentno stanje. Redoks potencijal mjeri se redoks reakcijama različitih metalnih iona, npr. željeza, bakra, kroma, cerija i drugih. Važno je odabrati prikladan metal koji je toliko jak da oksidira antioksidanse od interesa, ali ne i druge reducense iz matriksa hrane kao što su limunska kiselina i reducirajući šećeri. Ove

metode mogu se klasificirati kao ET metode, a odvijaju se u jednostavim kemijskim uvjetima nešto niže biološke važnosti u usporedbi s metodama baziranim na gašenju radikala (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.1.2.1. FRAP metoda (antioksidativna moć redukcije feri-iona, engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

FRAP je tipična ET metoda koja mjeri antioksidansom uzrokovanu redukciju kompleksa feri-ion ($Fe^{3+}$) - ligand u intentivno plavo obojeni fero- ($Fe^{2+}$) kompleks, u kiselom mediju. Antioksidativna aktivnost određuje se porastom apsorbancije na 593 nm, a rezultati se prikazuju kao mikromolarni $Fe^{2+}$ ekvivalenti standardnog antioksidansa. Kao ligand originalno se koristio tripiridiltriazin (TPTZ), a korištene zamjenske varijante su ferozin (za evaluaciju askorbinske kiseline) i kalijev fericijanid. Nedostatak metode, nemogućnost korištenja antioksidansa čiji je redoks potencijal niži u usporedbi s $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ (npr. antioksidansi koji sadrže -SH skupine), rješen je dodatkom surfaktanta natrij dodecil-sulfata uz podešavanje pH na 1.7. Metoda se odabirom voda/aceton otapala može prilagoditi mjerenju i hidrofilnih i lipofilnih antioksidanasa (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.1.2.2. CUPRAC metoda (kapacitet antioksidativne redukcije bakra; engl. Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

Ova metoda varijanta je FRAP metode, umjesto željeza koristi se bakar kao oksidans. Mjeri se reducirajuća moć antioksidansa u prijelazu $Cu^{2+}$-iona u $Cu^{+}$-ion. Ligand koji olakšava praćenje apsorbancije je neokuproin (Nc; 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin). $Cu^{2+}$-Nc kompleks reducira se djelovanjem antioksidansa u $Cu^{+}$-Nc, kromofor s maksimumom apsorpcije na 450 nm. Koristi se za ispitivanje antioksidativne aktivnosti fenolnih spojeva, u slobodnoj i vezanoj formi. Aceton/voda medij s dodatkom metil-β-ciklodekstrina koristi se za simultano određivanje lipofilnih i hidrofilnih antioksidanasa (Shadidi i Zhong, 2015).

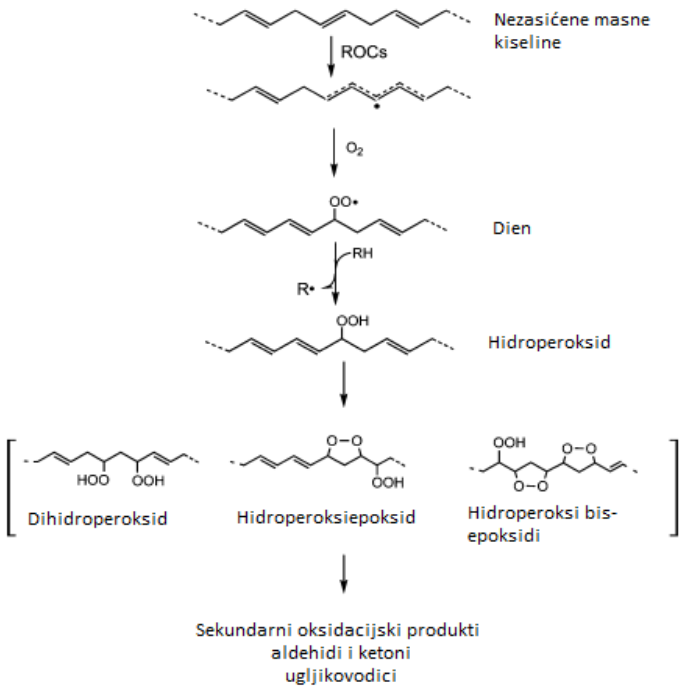
### 1.2.1.3. Kapacitet keliranja metala

Poznato je da prijelazni metali stimuliraju oksidaciju lipida Fentonovom reakcijom ili razgradnjom lipidnih hidroperoksida u reaktivnije peroksilne i alkoksilne radikale. Neki antioksidansi, kao što su flavonoidi, moćni su kelatori metala te jednostavno deaktiviraju metalne prooksidanse. Antioksidansi formiraju kompleks s metalnim ionima, tako da je kapacitet keliranja metala indikator antioksidativne aktivnosti, obično u kombinaciji s drugim

metodama. Mjeri se kelirajući efekt antioksidansa prema fero- ($Fe^{2+}$) ionu. Ferosulfat i ferozin najčešće su korišteni izvori fero-iona. Smanjenje apsorbancije na 485 nm (za ferosulfat) ili na 562 nm (za ferozin) nakon dodatka antioksidansa upućuje na stvaranje kompleksa metal-antioksidans. U većini slučajeva kapacitet keliranja metala izražava se u ekvivalentima EDTA, standardnog metalnog kelatora (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.2. Metode mjerenja stupnja lipidne peroksidacije

Oksidativna razgradnja lipida (lipidna peroksidacija) čest je uzrok stanične smrti, što može uzrokovati peroksidativno oštećenje tkiva u upali, rak te toksičnost ksenobiotika i starenje (Alam i sur., 2013). Jedan od najpoznatijih mehanizama lipidne peroksidacije je primjer s nezasićenim masnim kiselinama, kao što su linolna, linolenska, arahidonska i druge ω-3 masne kiseline. Slika 2. prikazuje pretpostavljeni mehanizam lipidne peroksidacije i nastajanja sekundarnih produkata oksidacije. Lipidna peroksidacija inicirana je ROS-specijama. ROS privlači vodikov atom iz metilenske grupe nezasićene masne kiseline te se posljedično formira peroksilni radikal. Većina ovih metoda prati stvaranje hidroperoksida ili specifičnih sekundarnih produkata oksidacije (Moon i Shibamoto, 2009).




Slika 2. Pretpostavljeni mehanizam lipidne peroksidacije (Moon i Shibamoto, 2009).

### 1.2.2.1. TBA metoda (tiobarbiturna kiselina; engl. Thiobarbituric Acid)

Malonaldehid (MA) široko se upotrebljavao za procjenu antioksidativne aktivnosti u lipidno-peroksidirajućim sustavima. MA je koristan biomarker finalnog stadija lipidne peroksidacije iako ga je teško analizirati u lipidnim sustavima zbog njegove topljivosti u vodi i tendencije polimerizaciji u vodenoj otopini. U ovoj metodi kolorimetrijom se promatra UV-apsorpcija MA-TBA produkta na 535 nm. Kasnije se uvela i spektrofotometrija za istraživanje farmaceutskih ulja. TBA, osim s MA, reagira s mnogim drugim karbonilima nastalima lipidnom peroksidacijom, nazvanima TBARs (TBA reacting substances). Poznati antioksidansi kao BHT (butilhidroksitoluen), vitamin A ili vitamin C koriste se kao pozitivne kontrole u metodi (Moon i Shibamoto, 2009).

### 1.2.2.2. MA/HPLC metoda

Za određivanje točne količine MA koristi se HPLC metoda (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti). Preporučena je za biološke uzorke kao što su serum i plazma. Nedostatak ove metode je nešto manja osjetljivost spektrofotometrijskog detektora nego što je to slučaj s GC (plinska kromatografija) detektorima. Razvojem LC/MS (tekućinska kromatografija/masena spektrometrija) metode može se postići veća učinkovitost HPLC analize adukta MA-TBA (Moon i Shibamoto, 2009).

### 1.2.2.3. MA/GC metoda

Ova metoda se početno razvila za analizu hlapljivih karbonilnih spojeva, uključujući MA, formiran UV-radijacijom u ulju kukuruza i goveđoj masti. MA derivati (MA-monokarbonili, -α,β-nezasićeni aldehidi i -β-dikarbonili) mogu se analizirati GC-om posebno opremljenim s dušik-fosfor detektorom (NPD) (Moon i Shibamoto, 2009).

### 1.2.2.4. Metoda izbjeljivanja β-karotena

Poznato je da β-karoten reagira s peroksilnim radikalima stvarajući epokside, dakle gasi radikale i djeluje kao antioksidans. Zbog tog se počeo koristiti u metodi zajedno s lipidima. Lipidi kao što je linolna kiselina, stvaraju peroksilne radikale u prisutnosti $O_2$ i ROS. Peroksilni radikal reagira s β-karotenom stvarajući stabilni β-karoten radikal, a količina tog radikala kasnije se smanjuje u ispitivanoj otopini (Moon i Shibamoto, 2009). Slobodni radikali nastali oksidacijom linolne kiseline dovode do obezbojenja β-karotena, koje se može pratiti s vremenom na 470 nm. Prisutnost antioksidansa može smanjiti obezbojenje β-karotena

(Shadidi i Zhong, 2015). Linolna kiselina oksidira se lipooksigenazom ili toplinskim tretmanom (Moon i Shibamoto, 2009).

### 1.2.3. Biološki modeli za određivanje antioksidativne aktivnosti

Uz to što se upotrebljavaju za očuvanje kvalitete i kao aditivi u prehrambenim proizvodima, antioksidansi su od velikog interesa među zdravstvenim profesionalcima i to zbog njihove zaštitne uloge u organizmu protiv stresa, stresom povezanih bolesti i zdravstvenih poremećaja. Za procjenu antioksidanasa u borbi protiv oksidativnog stresa koriste se *in vitro*, *ex vivo* te *in vivo* biološki modeli. Međusobno se ti modelni sustavi razlikuju u vrsti supstrata, inicijatora oksidacije, reakcijskih uvjeta i oksidacijskih markera (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.3.1. Metoda inhibicije oksidacije LDL-kolesterola

Oksidirani LDL (low density lipoprotein) koji sadrži i lipidne oksidacijske produkte i oksidirane apoproteinske čestice doprinosi svim stadijima ateroskleroznog procesa te tako potiče aterogene efekte. Antioksidansi mogu inhibirati oksidaciju LDL-a gašenjem slobodnih radikala i drugih ROS-ova, keliranjem prooksidativnih metala i vezanjem na apolipoprotein B, što omogućuje antioksidansu pristup lipidima i prevenciju interakcije s prooksidansima. U ovoj metodi, oksidacija LDL-kolesterola inducira se prijelaznim metalima kao što je $Cu^{2+}$ ili peroksilnim radikalima generiranima termalnim raspadom AAPH. Potonji inicijator smatra se preferiranim ispred bakrenog iona zbog svoje biološke relevantnosti. Supstrat (LDL-C), inicijator (metalni ion, peroksil-radikal) i antioksidansi inkubiraju se na fiziološkoj temperaturi od 37°C te se nastajanje konjugiranih diena prati spektrofotometrijski na 234 nm, periodički ili u završnoj točki. Antioksidativna aktivnost izražava se kao postotak inhibicije stvaranja konjugiranih diena u usporedbi s kontrolom koja ne sadrži antioksidanse. Alternativno se oksidativno stanje LDL-kolesterola može mjeriti i stvaranjem TBARs-a kao MA-ekvivalenata. Kako bi se minimalizirale interferencije sastavnica iz hrane koje također apsorbiraju na 234 nm, koristi se "blank" kontrola bez LDL supstrata (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.3.2. Metoda inhibicije oksidacije i kidanja DNA

Oksidativni stres u stanicama vodi oštećenju DNA, koje je obuhvaćeno mutagenezom i karcinogenezom te drugim patološkim procesima, pa tako i starenjem. Antioksidativni učinak na cijepanje DNA lanca inducirano slobodnim radikalima određuje se u superzavijenom plazmidnom pBR322 DNA modelnom sustavu, gdje se kidanje DNA lanca inducira hidroksilnim i peroksilnim radikalima. Ovi radikali su glavni izvor biološki relevantnih ROS-ova odgovornih za oksidativno oštećenje DNA, posebice mitohondrijske DNA. Hidroksilni radikali generiraju se Fentonovom reakcijom fero-iona s vodikovim peroksidom, dok se peroksilni radikali generiraju uz pomoć AAPH. Nakon inkubacije s radikalima i antioksidansima na 37°C, DNA frakcije separiraju se gel elektroforezom, a vrpce identificiraju nakon vizualizacije. I otvorena cirkularna forma DNA nastala jednolančanim kidanjem, i linearna forma nastala dvolančanim kidanjem mogu se smatrati produktima oksidacije DNA, s tim da je otvorena cirkularna forma dominantnija. Koncentracije nativne (superzavijene) i pokidanih DNA frakcija dobivaju se denzitometrom iz intenziteta ili gustoće odgovarajućih vrpci. Moguće je da antioksidansi inhibiraju rezanje DNA kombinacijom mehanizama gašenja radikala i keliranja fero-iona te se njihova učinkovitost može računati kao retencija DNA (postotak očuvane neoksidirane i superzavijene DNA) (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.3.3. Stanične metode

Razvoj *in vitro* kemijskih metoda i uporaba biološki relevantnih makromolekularnih modela omogućila je evaluaciju intrinzične oksidativne aktivnosti, no testovi ne uspijevaju predvidjeti antioksidativnu aktivnost *in vivo* u različitim uvjetima. Kako nije uvijek jednostavno mjeriti učinkovitost antioksidansa direktno na životinjama i ljudima u početnim probirima, preporučuje se prvo koristiti stanične modele za opsežnije razumijevanje antioksidativne aktivnosti na staničnoj razini (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.3.3.1. Metoda inhibicije hemolize

Eritrociti su, kao specifični prenositelji kisika krvlju, neprestano izloženi oksidativnom stresu. ROS-ovi, a posebno vodikov peroksid kao normalan stanični metabolit, može inicirati oksidaciju proteina (hemoglobina) i lipida (ugl. kolesteril-estera), vodeći do narušavanja staničnog oblika i membranske strukture te konačno do hemolize. Kao inicijatori oksidacije koriste se vodikov peroksid i peroksilni radikali. Nakon inkubacije s inicijatorom i

antioksidansom na 37°C, postotak hemolize se određuje periodično centrifugiranjem i spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije oslobođenog hemoglobina u supernatantu na 524 nm. Inhibicija hemolize antioksidansima izračunava se prema kontroli koja ne sadrži antioksidanse. Novija modifikacija metode koristi automatiziran čitač mikrotitarskih ploča što omogućuje simultano mjerenje velikog broja uzoraka. U toj modifikaciji, postotak hemolize određuje se zamućenjem (turbiditetom) suspenzije eritrocita bez centrifugiranja (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.3.3.2. CAA (stanična antioksidativna metoda; engl. Celular Antioxidant Assay)

CAA je razvijena za kvantitativno mjerenje antioksidativne sposobnosti inhibicije oksidacije u stanicama. CAA preuzima prednosti obiju metoda, staničnih kultura i kemijskih testova, i to uvođenjem fluorescentne probe u stanice. HepG2 humani hepatokarcinom veže 2',7'-diklorofluorescin diacetat (DCFH-DA) i on se aktivira u DCFH staničnom deacetilacijom kataliziranom esterazama. DCFH osjetljiv je na ROS-ove (vodikov peroksid i peroksilni radikal) i na RNS-ove (reaktivne dušikove specije; dušikov oksid i peroksinitrit) te zbog toga nastaje oksidacijski produkt DCF koji zbog ekscitacije fluorescira. CAA koristi ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan)) kao generator peroksilnih radikala. Antioksidansi apsorbirani u stanici mogu ugasiti peroksilne radikale što dovodi do nižeg stupnja oksidacije i oslabljenog porasta fluorescencije. Smatra se da CAA nudi brojne prednosti za procjenu antioksidanasa u biološkim modelima. Upotrebljava se biološki relevantan supstrat, koriste niske razine oksidansa, a staničnо preuzimanje antioksidanasa korelira s bioraspoloživošću *in vivo*. CAA je također automatizirana tehnologijom čitanja mikrotitarskih ploča. Predložena je kao standardizirana metoda za mjerenje antioksidativne aktivnosti u stanici kako bi se smanjile varijacije među laboratorijima (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.3.4. *In vivo* modeli

U svim *in vivo* metodama uzorci se daju testnim životinjama (miševima, štakorima) u točnom režimu doziranja kako je opisano određenim metodama. Nakon određenog vremenskog perioda, životinje se obično žrtvuju, a krv i tkiva se koriste za analizu (Alam i sur., 2013).

### 1.2.3.4.1. Reducirani glutation (GSH)

GSH je intracelularni reducens i važan je u katalizi, metabolizmu i transportu. Štiti stanice od slobodnih radikala, peroksida i ostalih toksičnih spojeva. Nedostatak GSH u lećama dovodi do nastanka katarakte. Glutation također ima važnu ulogu za bubrege i sudjeluje u transportnom sustavu koji je povezan s reapsorpcijom aminokiselina. Tkivnom homogenatu se dodaje 20%-tna trikloroctena kiselina i EDTA da se istalože tkivni proteini. Smjesa se zatim centrifugira, a supernatantu se dodaje Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina pripremljena u fosfatnom puferu s otopinom natrijevog citrata). Otopine se mjere na 412 nm u usporedbi s "blank" otopinom. Vrijednosti apsorbancije se uspoređuju sa standardnom krivuljom poznatog GSH (Alam i sur., 2013).

### 1.2.3.4.2. Glutation peroksidaza (GSHPx)

GSHPx je selenoenzim koji je u jetri prisutan u citosolu (2/3) i u mitohondriju (1/3). Katalizira reakcije hidroperoksida s GSH kojima nastaju glutation disulfid (GSSG) i redukcijski produkti hidroperoksida. Mjerenje GSHPx se podrazumijeva posebno kod pacijenata koji su zbog bilo kojeg razloga izloženi oksidativnom stresu; niska aktivnost ovog enzima jedan je od ranih pokazatelja poremećaja ravnoteže prooksidans/antioksidans. U kivete s fosfatnim puferom dodaju se otopina glutation reduktaze, $NaN_3$, $Na_2EDTA$, NADPH, citosolna frakcija dobivena centrifugom i voda. Reakcija započinje dodatkom $H_2O_2$, a pretvorba NADPH u NADP promatra se stalnim bilježenjem promjene apsorbancije na 340 nm. Enzimska aktivnost GSHPx izražava se u miligramima proteina (Alam i sur., 2013).

### 1.2.3.4.3. Glutation-S-transferaza (GSt)

Smatra se da GSt ima fiziološku ulogu u iniciranju detoksikacije potencijalnih alkilirajućih agenasa, uključujući farmakološke aktivne spojeve. GSt enzimi kataliziraju reakciju takvih spojeva s SH-skupinom glutationa, neutralizirajući tako njihova elektrofilna mjesta i prevodeći ih u produkte topljivije u vodi. Reakcijska otopina natrijevog fosfata, GSt, 1-kloro-2,4-dinitrobenzena kao supstrata i odgovarajuća količina citosola inkubiraju se na 37°C. Porast apsorbancije na 340 nm mjeri se spektrofotometrijski (Alam i sur., 2013).

#### 1.2.3.4.4. Superoksid-dismutaza (SOD)

Antioksidativna aktivnost određuje se u lizatu eritrocita pripremljenom iz 5%-tne suspenzije eritrocita. Pufer Tris-HCl, EDTA i pirogalol dodaju se lizatu. Porast apsorbancije bilježi se na 420 nm spektrofotometrom. Jedinica enzimske aktivnosti je 50%-tna inhibicija brzine autooksidacije pirogalola, a brzina se određuje promjenom apsorbancije na 420 nm u minuti. Aktivnost SOD izražava se jedinicama/mg proteina (Alam i sur., 2013).

#### 1.2.3.4.5. Katalaza (CAT)

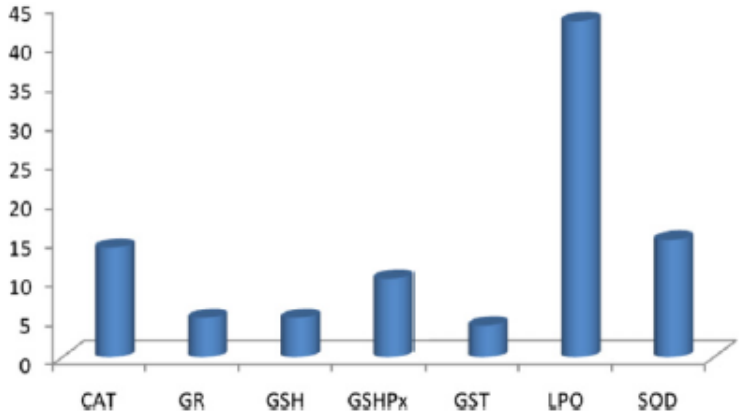
Aktivnost katalaze može se određivati metodom u eritrocitnom lizatu. Lizat se dodaje u kivetu s fosfatnim puferom i vodikovim peroksidom. Aktivnost katalaze mjeri se na 240 nm spektrofotometrom tijekom 1 minute. Jedinica aktivnosti jednaka je jednom milimolu $H_2O_2$ raspadnutog u minuti i aktivnost je izražena u jedinicama/mg proteina (Alam i sur., 2013).

#### 1.2.3.4.6. γ-glutamil transpeptidaza (GGT)

Uzorak seruma dodaje se otopini supstrata koja sadrži glicilglicin, $MgCl_2$ i γ-glutamil-p-nitroanilid u Tris-u (slobodna baza). Mješavina se inkubira na 37°C i apsorbancija očitava na 405 nm. Aktivnost GGT mjeri se iz vrijednosti apsorbancije (Alam i sur., 2013).

#### 1.2.3.4.7. Glutation reduktaza (GR)

Sveprisutni tripeptid glutation (GSH), najbrojniji tiol niske molekularne mase u gotovo svim stanicama, uključen je u širok spektar enzimskih reakcija. Glavna uloga GSH je ona reducirajuća u oksidacijsko-redukcijskim procesima, uloga koja rezultira nastajanjem glutation disulfida (GSSG). Termolabilni sustav sposoban reducirati GSSG otkriven je u jetri. GR je enzim koji izravno reducira GSSG. Jetre žrtvovanih štakora režu se i homogeniziraju. Homogenat se centrifugira. Centrifugiraju se i peleti. Supernatant se spaja s prethodnim talogom centrifuge. Udruženi materijal se opet centrifugira. Brzina oksidacije NADPH uz GSSG koristi se kao standardna mjera enzimske aktivnosti. Reakcijski sustav se sastoji od GSSG, NADPH, EDTA, pufera i odgovarajućeg sadržaja uzorka GR koji će promijeniti apsorbanciju 0.05-0.03/min. Kao jedinica aktivnosti GR koristi se oksidacija 1μM NADPH/min. Specifična aktivnost izražava se u jedinicama/mg proteina (Alam i sur., 2013).




Slika 3. Učestalost korištenja pojedinih *in vivo* metoda određivanja antioksidativne aktivnosti (Alam i sur., 2013).

## 1.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti u modelima hrane

*In vitro* metode često ne koreliraju sa sposobnošću tvari da inhibiraju oksidativno kvarenje hrane. Aktivnost antioksidanasa u hrani ne ovisi samo o njihovoj kemijskoj reaktivnosti (gašenju slobodnih radikala, keliranju), već i o fizičkom smještaju, interakciji s drugim komponentama hrane i uvjetima okoline (npr. pH). Jedan od glavnih čimbenika koji utječu na aktivnost antioksidanasa koji gase slobodne radikale u hrani jest razdjeljenje između lipida i vode. Polarni antioksidansi su efektivniji u uljima jer se mogu nakupljati na granici zrak-ulje ili u reverznim micelama unutar ulja, mjestima gdje će doći do najviše reakcija lipidne oksidacije zbog visokih koncentracija kisika i prooksidanasa. U emulzijama polarni antioksidansi teže odvajanju u vodenu fazu gdje pak ne mogu zaštititi lipide. Suprotno tome, pretežno nepolarni antioksidansi efektivniji su u emulzijama jer se zadržavaju u uljnim kapljicama i/ili na granici ulje-voda, mjestima gdje se odvijaju interakcije između hidroperoksida na površini kapljica i prooksidanasa (npr. prijelaznih metala) u vodenoj fazi. Tendencija lipofilnih antioksidanasa da bolje funkcioniraju u hrani s visokim sadržajem vode, a polarnih da su najefektivniji u ulju, naziva se "antioksidativnim paradoksom" (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1. Mjerenje antioksidativne aktivnosti u jestivim uljima

Masno ulje, triacilgliceroli i slobodne masne kiseline ili njihovi alkil-esteri tipični su modelni sustavi za mjerenje antioksidativne učinkovitosti. Metode se razlikuju, ali dijele zajednički princip. Npr. postizanje važećeg oksidativnog stanja modelnog sustava u prisutnosti i odsutnosti antioksidansa. Lipidna oksidacija mjeri se na brojne načine, uključujući mjerenje supstrata, oksidansa/inicijatora/intermedijera i konačnih produkata. Kvantifikacija gubitka reaktanata, potrošnje kisika te nastajanja primarnih ili sekundarnih oksidacijskih produkata najprikladniji su markeri ovisno o stupnju oksidacije (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.4.1.1. Mjerenje potrošnje kisika

Potrošnja kiskika u inicijalnim fazama oksidacije lipida rezultira porastom mase ulja ili padom tlaka kisika iznad uzorka (ili koncentracije). Jedna od najstarijih metoda je zagrijavanje ulja uz periodično testiranje porasta mase. Da bi se izbjegao utjecaj promjene mase uzrokovan hlapljivim spojevima, uzorci se mogu predgrijati u inertnoj atmosferi. Predlaže se da se ovoj tehnici pridoda sofisticiranije kontinuirano praćenje mase i promjena energije termogravimetrijom/diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom. Ova metoda najprikladnija je za evaluaciju visoko nezasićenih ulja, kao što su morska i biljna ulja s visokim sadržajem polinezasićenih masnih kiselina kao supstrata oksidacije. Potrošnja kisika može se mjeriti i direktno, praćenjem smanjenja tlaka kisika. Koristeći "headspace" metodu, uljni uzorci s i bez antioksidansa stavljaju se u zatvorenu komoru s određenim nepromjenjivim sadržajem "headspace" kisika (kisika iznad uzorka) na povišenoj temperaturi, oko 100°C. Smanjenje tlaka u komori uzrokovano potrošnjom kisika mjeri se kontinuirano i bilježi automatski. Promjena tlaka mjeri elektronički, a moguće je mjeriti potrošnju kisika i elektrokemijski (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.4.1.2. Mjerenje promjene supstrata

Oksidativno stanje uljnog modelnog sustava može se kvantitativno procijeniti mjerenjem gubitka inicijalnog supstrata. Nezasićene masne kiseline glavni su reaktanti čiji se sadržaj značajno mijenja tijekom oksidacije. Metilni esteri masnih kiselina (FAME) koriste se za određivanje sadržaja masnih kiselina plinskom kromatografijom. Dok neke metode koriste omjer različitih grupa masnih kiselina, druge prate promjene određene masne kiseline (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3. Mjerenje oksidacijskih procesa

Oksidacija masti /ulja, triacilglicerola i slobodnih masnih kiselina ili njihovih alkilnih estera dovidi do kontinuiranog nastajanja primarnih i sekundarnih oksidacijskih produkata (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.4.1.3.1. Peroksidni broj

Peroksidni broj (PV) indikator je početka oksidativnih promjena, a antioksidativna inhibicija nastajanja ili djelovanja ovih nestabilnih specija može se koristiti za procjenu antioksidativne aktivnosti. Razvijene su brojne metode za određivanje peroksidnog broja, a najčešće korištene su jodometrijska titracija, spektrofotometrijsko mjerenje kompleksa s feri-ionom i infracrvena spektroskopija. Jodometrijska titracija bazira se na oksidaciji jodid ($I^-$) iona u jod ($I_2$) hidroperoksidom. Slobodni jod titrira se uz standardiziranu otopinu natrijeva tiosulfata i škrob koji je indikator završne točke. PV se izražava u miliekvivalentima kisika po kilogramu. Modifikacije ove metode navedene su u Tablici 1. gdje se uočavaju upotreba drugih reagenasa i detekcijske metode (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.4.1.3.2. Konjugirani oksidacijski produkti

Uz hidroperoksid kao marker, konjugirani dieni i trieni također mogu biti indikatori oksidacijskog stupnja i inhibicije antioksidansom. Zbog činjenice da su polinezasićene masnoće i ulja generalno "isprekidani" metilenom po prirodi, oksidacijom nastaju konjugirani dieni i trieni, što se može mjeriti spektrofotometrijski na 234 nm i 268 nm u UV-regiji. Porast UV-apsorpcije teoretski upućuje na nastanak primarnih oksidacijskih produkata. Antioksidativna aktivnost može se procijeniti mjerenjem *lag faze* ili postotkom inhibicije u prisutnosti antioksidansa. Ova metoda ima manju specifičnost i osjetljivost od mjerenja peroksidnog broja. Mjerenja peroksidnog broja i konjugiranih diena mjere samo primarne oksidacijske produkte. Oni su nestabilni i raspadaju se u stabilnije sekundarne, kao što su različiti karbonili, kao aldehidi i ketoni. Primarni oksidacijski produkti sami ne daju dovoljno dokaza pa se obično kombiniraju sa mjerenjima sekundarnih oksidacijskih produkata za obuhvatniju sliku oksidacijskog procesa (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3.3. TBARs (spojevi koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom)

Sekundarni oksidacijski produkti nastaju raspadom hidroperoksida, a TBARs-i su dobro poznati markeri oksidacije u ranoj fazi oksidacije i osjetljivosti analitičke metode. TBARs-i se prikazuju kao malonaldehid (MA) ekvivalenti. MA, produkt raspada polinezasićenih masnih kiselina, reagira s TBA (tiobarbiturnom kiselinom) i tvori ružičasti MA-TBA kompleks s maksimumom apsorpcije na 530-535 nm. TBARs naziv uključuje sve tvari koje reagiraju s TBA sličnim mehanizmom kao MA, a to su alkanali, 2-alkenali, 2,4-alkdienali, ketoni, ketosteroidi, kiseline, esteri i dr. TBARs je među najčešće korištenim testovima oksidacije u uljima i mastima, no manjak mu je osjetljivost i specifičnost. Interferencije se mogu stvoriti prisustvom proteina, saharoze, uree, piridina, pirimidina i dr. u kompliciranijim matriksima hrane (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3.4. p-Anisidin vrijednost (p-AnV)

Ova metoda još je jedna metoda mjerenja sadržaja aldehidnih oksidacijskih produkata (uglavnom 2-alkenala i 2,4-alkdieanala) nastalih raspadom hidroperoksida. Temeljena je na obojenoj reakciji p-metoksianilina (anisidina) i aldehidnih spojeva u kiselim uvjetima koji daju žućkaste produkte s apsorpcijom na 350 nm. p-AnV vrijednost pouzdan je pokazatelj oksidacijom uzrokovane užeglosti u mastima i uljima (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3.5. Ukupni karbonilni spojevi

Ova metoda utemeljena je na absorbanciji karbonilnih derivata nastajanjem kolorimetrijskog 2,4-dinitrofenilhidrazina. Obojeni produkt analizira se spektrofotometrijski. Treba uzeti u obzir da karbonili nastali oksidacijom drugih komponenti (kao proteina) iz modela hrane mogu doprinijeti kolorimetrijskoj reakciji te vrijednost ukupnih karbonila može ispasti veća (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3.6. Sekundarni hlapljivi produkti

Za ulja bogata omega-6-masnim kiselinama kao što su većina biljnih ulja, heksanal je glavni hlapljivi produkt oksidacije, a za morska ulja bogata omega-3-masnim kiselinama glavni produkt je propanal. Plinskom kromatografijom opremljenom sa "headspace" uzorkivačem određuju se sekundarni hlapljivi produkti (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3.7. OSI (indeks stabilnosti ulja; engl. Oil Stability Index)

Ova metoda mjeri stvaranje sekundarnih hlapljivih kiselina, uglavnom mravlje i octene, nastalih oksidacijom na visokim temperaturama, istovremeno s hidroperoksidima. Nadalje, drugi sekundarni produkti kao alkoholi i karbonili mogu se dalje oksidirati do karboksilnih kiselina. Mjerenje se odvija praćenjem promjene električne vodljivosti pri prolasku eluensa oksidiranih ulja kroz vodu. OSI se definira kao točka maksimalne promjene oksidacijske brzine, koja se povezuje s povećanjem vodljivosti nastankom hlapljivih organskih kiselina u procesu lipidne oksidacije. Metoda zahtijeva viši stupanj oksidacije (peroksidni broj > 100) za postizanje mjerljivih rezultata (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.1.3.8. Mjerenje slobodnih radikala

Oksidacijski stupnjevi ulja i masti u prisustvu i odsustvu antioksidansa mogu se mjeriti i direktno detekcijom stvaranja radikala i to upotrebom EPR (elektronska paramagnetska rezonancija) spektroskopije. Međutim kratak poluživot i niska ravnotežna koncentracija visokoreaktivnih lipidnih radikala otežava njihovu detekciju pri koncentracijama nižim od $10^{-9}$ M minimalne prepoznatljive koncentracije. Kako bi se svladao ovaj problem, koriste se različiti pristupi, pulsna radioliza, UV-fotoliza, sustav kontinuiranog protoka i "spin trapping", među kojima je potonji najšire korišten. "Spin trapping" omogućuje nakupljaje detektabilnih koncentracija dulje-živućih radikala dodatkom uzorka sa "spin trapping" agensom, koji reagira sa slobodnim radikalima i formira stabilnije spinske adukte. Najčešći "spin trapping" agensi su nitrozo spojevi i nitroni. Međutim priopćeno je da svi ti agensi korišteni u EPR metodi pokazuju i prooksidativne, i antioksidativne učinke što može dati pogrešne rezultate antioksidativne aktivnosti (Shadidi i Zhong, 2015).

Tablica 1. Metode određivanja oksidacijskih produkata ( Shadidi i Zhong, 2015).

| **Ime metode** | **Oksidacijski markeri** | **Reagens** | **Detekcija** | **Izražavanje antioksidativne aktivnosti** |
|---|---|---|---|---|
| Peroksidni broj | Hidroperoksid | Kalijev jodid Tiocijanat ili ksilenol narančasti Trifenilfosfin | Titracija Spektrofotometrija FTIR* | % inhibicije |
| Konjugirani dieni | Konjugirani dieni | Tiobarbiturna kiselina | Spektrofotometrija | % inhibicije |
| TBAR | MDA ekvivalenti | | | |
| p-anisidin vrijednost | 2-alkenali i 2,4-alkdienali | Anisidin | Spektrofotometrija | % inhibicije |
| Ukupni karbonili | Karbonilni spojevi | 2,4-Dinitrofenilhidrazin | Spektrofotometrija | % inhibicije |
| Sekundarni hlapljivi produkti | Hlapljivi spojevi (heksanal, propanal) | | "Headspace" GC | % inhibicije |
| Indeks stabilnosti ulja (OSI) | Hlapljive organske kiseline | | Mjerenje vodljivosti | Indukcijsko vrijeme, faktor zaštite |
| Mjerenje slobodnih radikala | Slobodni radikali | α-Fenil-terc-butilnitron | EPR** | % inhibicije |

* Fourier-transformirana infracrvena
** Elektronska paramagnetska rezonancija

## 1.2.4.1.4. Mjerenje promjena u sustavu tijekom oksidacije

Dok većina metoda mjeri nastanak oksidacijskih produkata ili potrošnju reaktanata, nekoliko metoda prati promjene čitavog sustava tijekom oksidacije bez ciljanja određenih specija. Te su metode NMR i DSC. Visokorezolucijska $^{1}$H NMR spektroskopija koristi se za evaluaciju oksidativnog kvarenja masti i ulja. Princip NMR-a je u tome što vodikovi atomi u jakom magnetskom polju apsorbiraju radijacijsku energiju u radiofrekventnom području, ovisno o njihovom molekularnom okruženju, koje se mijenja tijekom oksidacije. Preciznije, vodikovi atomi (proton, $^{1}$H) pozicionirani na različitim položajima u triacilglicerolima i slobodnim masnim kiselinama mogu se izračunati iz NMR spektra i mogu se dobiti omjeri alifatskih/olefinskih protona (Rao) i alifatskih/dialilmetilenskih protona (Rad). Oba omjera ravnomjerno rastu tijekom lipidne peroksidacije, jer su alilni i bis-alilni položaji oksidacijska reaktivna mjesta. Slabljenje rasta omjera upućuje na antioksidativnu učinkovitost u modelnim

sustavima ulja ili masnih kiselina. $^{13}$C NMR i $^{31}$P NMR također su moćni alati za predviđanje oksidativne stabilnosti ulja. $^{13}$C NMR procjenjuje lipidnu oksidaciju promatranjem promjena lanaca ugljika u triacilglicerolima i masnim kiselinama, otkrivajući specifična mjesta gdje dolazi do oksidativne degradacije. Osjetljivost $^{13}$C NMR-a je manja od $^{1}$H NMR-a. NMR istovremeno mjeri primarne i sekundarne oksidativne promjene te nudi specifične informacije o mjestima oksidacije u supstratnoj molekuli. DSC je drugi uređaj koji prati oksidacijske procese u smislu promjene energije. Tijekom lipidne oksidacije, ulja i masti prolaze brojne termalno-inducirane prijelaze, kao što je prijelaz kisika na nezasićene masne kiseline (egzoterman proces). DSC specifično mjeri temperaturne i toplinske tokove u funkciji vremena i temperature. Metoda koristi izotermalne ili neizotermalne uvjete i tok kisika kao plina za pročišćavanje uz kalorimetrijsko mjerenje primanja topline (endotermno) ili oslobađanja topline (egzotermno) u/iz uljnog sustava koji prolazi oksidacijski proces. Oksidacijske krivulje uzorka dobivaju se s različitim vremenom zagrijavanja, a dramatični porast razvijene topline vidi se pojavom oštre egzotermne krivulje tijekom inicijacije oksidacije. Dodatak antioksidansa može poboljšati oksidativnu stabilnost modelnog sustava (Shadidi i Zhong, 2015).

#### 1.2.4.2. Mjerenje antioksidativne aktivnosti u emulzijskim modelima

Pokazalo se da se antioksidansi ponašaju drukčije kad se koriste u različitim medijima. Dakle, njjihova učinkovitost u uljima ne mora se nužno reflektirati na ulje/voda emulzije. Štoviše, uvidjelo se da je veliki omjer površine prema volumenu (svojstvo emulzija) prirodna pojava, dok je nizak omjer površine prema volumenu manje uobičajen u hrani i biološkim sustavima. Mnogi prehrambeni lipidi nalaze se u obliku ulje-u-vodi emulzija (npr. mlijeko, majoneza, dresinzi, umaci, pića, sladoled itd.) koje su osjetljivije na oksidaciju od ulja zahvaljujući većoj površini između faza koja potpomaže interakciju ulja s prooksidansima iz vodene faze (Shadidi i Zhong, 2015).

##### 1.2.4.2.1. Metoda izbjeljivanja β-karotena

Princip metode opisan je u *poglavlju 1.2.2.4.,* na 8. stranici kao dio metoda mjerenja stupnja lipidne peroksidacije, a osim toga metoda je kao dio ovog diplomskog rada obrađena u poglavlju *3. Materijali i metode*.

### 1.2.4.2.2. Drugi emulzijski modeli

Drugi modeli su emulzije biljnog ulja u vodi (npr. suncokretovog ili sojinog ulja u vodi), ribljeg ulja u vodi ili masnih kiselina u vodi. Većina oksidacijskih markera spomenutih kod uljnih modelnih sustava također je prikladna i za U/V emulzije. Tipični testovi uključuju mjerenje peroksidnog broja, TBARs-a i hlapljivih heksanala i propanala, između ostalih (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.3. Mjerenje antioksidativne aktivnosti u mišićnim modelima hrane

Mišićno tkivo je sastavljeno od različitih endogenih komponenti koje mogu ubrzati (prooksidansi) ili inhibirati (antioksidansi) oksidacijske procese (Decker i sur., 2005).
Lipidi su sastavni dio obrađene hrane dobivene iz cijelih tkiva kao što je većina brze hrane i velikim su dijelom odgovorni za pogoršanje kvalitete te hrane. Za takve lipide svojstven je velik omjer površine i volumena i obično se smatraju vrlo polarnim medijem. Takva hrana uglavnom zahtijeva različite vrste antioksidanasa zahvaljujući sklonosti prema oksidaciji tijekom pretkuhavanja i dugog vremena skladištenja. Oksidacija lipida u mišićnoj hrani odvija se različitim mehanizmima, a važnu ulogu u oksidativnoj stabilnosti imaju interakcija s drugim komponentama (kao što su protein, hem, metal i sol) te obrada i skladišni uvjeti. Na primjer, raspad mišićne membrane homogenizacijom omogućuje kisiku da prodre unutar tkiva i ubrza lipidnu peroksidaciju. Slično tome, kuhanje uzrokuje razgradnju hema i otpuštanje željeza. Ne-hemsko željezo je aktivni katalizator odgovoran za ubrzanu oksidaciju lipida u zagrijanom mesu (Shadidi i Zhong, 2015). Oksidativna stabilnost skeletnih mišića može se razlikovati među životinjama (Decker i sur., 2005). Proteini iz mesa su također podložni oksidaciji tijekom termalnog procesa, a nastajanje karbonilnih spojeva vodi do narušavanja kvalitete. Dodatak antioksidansa može inhibirati oksidaciju lipida i proteina. Oni mogu biti dodani u različitim fazama obrade, a njihova učinkovitost ocjenjuje se mjerenjem razlika u stupnjevima oksidacijskih markera s i bez antioksidanasa.
*TBARs i hlapljivi produkti iznad uzorka* (heksanal, propanal i dr.) česti su oksidacijski markeri za mišićne sustave. Mjerenje TBARs-a u takvim sustavima nešto se razlikuje od onog u ulju, zahvaljujući matriksnoj strukturi koja je klopka za karbonilne lipide i proteinske oksidacijske produkte. TBA reagira direktno s mesnim uzorkom, slijedi ekstrakcija TBA-MA i srodnih adukata te na kraju spektrofotometrijska analiza. Alternativno, MA ekvivalentni TBARs-a ekstrahiraju se parnom destilacijom ili solvent ekstrakcijom, a tek zatim ekstrakt reagira s TBA reagensom, da bi se kasnije mjerila apsorbancija obojenog produkta. Destilacijska

metoda generalno se smatra manjkavom u smislu preciznosti i reproducibilnosti, te su zbog toga metode direktne reakcije TBA s uzorcima hrane sve popularnije za određivanje TBARs-a u mesu. Hlapljivi heksanal iznad uzorka ("headspace" heksanal) za meso i perad te propanal za ribu, često su korišteni oksidacijski markeri kao indikatori antioksidativne aktivnosti. Mjerenje hlapljivih spojeva je jednostavo, brzo i precizno, s minimalnim zahtjevima obrade uzorka; oni se u mišićnom tkivu mogu direktno mjeriti bez ekstrakcije ili kolorimetrijske reakcije. Unatoč tome, mora se uzeti u obzir mogući gubitak hlapljivih spojeva tijekom obrade mesa i skladištenja ili pretvorbe u tercijarne oksidacijske produkte. Preporučuje se korištenje ove metode u kombinaciji s drugim oksidacijskim testovima zbog stvaranja obuhvatnije slike o antioksidativnoj učinkovitosti (Shadidi i Zhong, 2015).

### 1.2.4.3.1. Modeli za evaluaciju antioksidativne učinkovitosti

*1. Mljevena mišićna hrana*. Mljevena mišićna hrana može biti odličan izbor za evaluaciju antioksidativne učinkovitosti. Nažalost, te metode su često vremenski zahtjevne jer endogeni antioksidansi uzrokuju značajnu lag fazu prije nastajanja oksidacijskih produkata. Ta duga lag faza može značiti da kvarenje zbog rasta mikroba može nastupiti i prije oksidativne užeglosti. Određivanje mehanizma antioksidativnog djelovanja može biti teško u mišićnoj hrani zbog kompleksne i dinamičke prirode mišićne hrane (npr. gubitak antioksidanasa i nastajanje prooksidanasa tijekom skladištenja). Iz tog razloga, u nekim slučajevima je bolje da mišićni sustavi sadrže prooksidanse kako bi se analiza antioksidativnog učinka završila prije nego što započne mikrobna degradacija.

*a. Kuhana mljevena mišićna hrana.* Termička obrada uzrokuje brzo nastupanje lipidne oksidacije u mišićnoj hrani, što poznajemo kao "okus podgrijavanja". Stoga je ovaj model odličan za evaluaciju antioksidanasa. On se koristi kad su proizvodi od interesa termički obrađeni, jer se aktivnost antioksidanasa u kuhanim proizvodima razlikuje od one u sirovim.

b. *Sirova mljevena mišićna hrana.* Ovisno o oksidativnoj stabilnosti mišićne hrane, mikrobno kvarenje događa se često prije samog oksidativnog kvarenja. Jedina iznimka su posebne vrste ribe (npr. skuša). Iz tog razloga se antioksidativna evaluacija mora provoditi u uvjetima smrzavanja. Mnogo mišićne hrane je zasoljeno, primjer su kobasice. Dodatak soli (1-2%) u mljeveni mišić može ubrzati lipidnu oksidaciju, čak i u uvjetima smrzavanja. Evaluacija antioksidansa u zasoljenom modelu može se provoditi 2-4 mjeseca u smrznutim uvjetima skladištenja ovisno o oksidativnoj stabilnosti hrane. Evaluacija u nezasoljenoj mišićnoj hrani trajala bi znatno duže, obično više od jedne godine skladištenja.

*2. Isprani mišićni sustavi.* Ispiranje skeletnih mišića uklanja vodotopljive antioksidanse i prooksidanse. Zaostalo isprano tkivo sadrži miofibrilne proteine i membranske fosfolipide. Isprani bakalar kao primjer takvog sustava ima nekoliko prednosti, visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, nudi mjerljive brzine lipidne oksidacije u razumnom vremenu te je lišen mitohondrija i prooksidativnog hema, izvora reaktivnih kisikovih specija. Isprani goveđi, svinjeći ili pileći mišići mogu se također koristiti, ali oni bi imali sporiji razvoj oksidacijskih produkata, koji bi se teže dobili u nedostatku hema i mitohondrija.

*3. Izolirana mišićna membrana.* Frakcije mikrosomalne membrane mogu se koristiti kao supstrat za lipidnu oksidaciju i antioksidativne studije. Dodatak $FeCl_3$, NADH i ADP učinkovito stimulira stvaranje mikrosomalnih oksidacijskih produkata. Membranski vezana reduktaza pretvara $Fe^{3+}$ u njegovu aktivnu formu, $Fe^{2+}$. NADH je kofaktor reduktaze, ADP kelira željezo. Keliranje željeza ADP-om povećava topljivost metala i mijenja oksidacijsko-redukcijski potencijal tako da potiče oksidaciju lipida. Nedostaci ovog modela su zahtjevi za svježe umrtvljenim tkivom za izolaciju membrane te nedostatak miofibrilnih proteina u preparatu (Decker i sur., 2005).

## 1.3. Komina masline

Komina masline je čvrsti nusprodukt dobiven ekstrakcijom maslinovog ulja. Čine ju kožica, pulpa i koštica masline. Komina sadrži još male količine ulja, tzv. ulje komine masline koje se može odvojiti od komine u daljnjim procesima (Trgovčević, 2016). Ona sadrži različite fenolne sastavnice koje se mogu podijeliti u nekoliko skupina: jednostavni fenoli (tirozol i hidroksitirozol) i derivati cimetne kiseline; flavonoidi (npr. apigenin, luteolin i rutin); sekoiridoidi (npr. oleuropein, oleuropeinski aglikoni i dekarboksimetilni aglikonski izomeri oleuropeina) (Vitali Čepo i sur., 2017). Ekstrakcija fenolnih sastavnica iz komine masline ima potencijal smanjiti štetnost za okoliš koja može biti prouzrokovana otpadnim frakcijama masline i može također omogućiti još jedan izvor prihoda za proizvođače maslinovog ulja (Goldsmith i sur., 2014). Oleuropein ima nekoliko farmakoloških učinaka, među kojima je i antioksidativni (Omar, 2010). Ispitivanje antioksidativnog učinka komine metodom izbjeljivanja β-karotena prikazano je detaljno u ovom diplomskom radu.

# 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Komina masline otpad je koji zaostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja koji se zbog svoje ekotoksičnosti ne smije neprocesuiran odlagati u okoliš te se uglavnom, kao sekundarna sirovina, koristi za dobivanje energije (peleti i sl.) Kemijski sastav komine masline karakterizira visok udio polifenola, istih onih koje nalazimo u maslinovom ulju te uz koje se vežu brojni pozitivni biološki učinci. Upravo stoga kominu masline treba promatrati kao dostupan izvor biološki visokovrijednih spojeva koji imaju potencijal primjene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (aditivi i nutriceutici). Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je po prvi puta istražiti mogućnosti primjene ekstrakta komine masline kao antioksidansa u β-karoten-linoleat emulzijskom model sustavu. Odabrani sustav pogodan je za predviđanje antioksidativne aktivnosti u kompleksnim matricama hrane ili biološkim sustavima. Suhi ekstrakti komine masline pripremljeni su bez ili uz dodatak različitih vrsta/koncentracija ciklodekstrina kao pomoćnih tvari kako bi se procijenile mogućnosti dodatne optimizacije antioksidativnog učinka primjenom odgovarajućih vrsta/koncentracija ciklodekstrina.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Kemikalije

- Borna kiselina, $H_3BO_3$, analitičke čistoće, ≥99.8% (Sigma Aldrich)
- Etanol, $C_2H_5OH$, 96% , za analizu (Grammol)
- Hidroksipropilirani derivat β-ciklodekstrina (HP-β-CD) (Wacker Chemie, Njemačka)
- Kloroform, za analizu, stabiliziran etanolom (Carlo Erba)
- Ledena octena kiselina, za analizu, 99,5% (Alkaloid Skopje)
- Linolna kiselina, prikladna za stanične kulture (Sigma)
- Nasumično metilirani derivat β-ciklodekstrina, RAMEB-CD (Wacker Chemie, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, NaOH, analitičke čistoće, ≥98% (Sigma Aldrich)
- Ortofosforna kiselina, $H_3PO_4$, min. 85%, pro analysi (Kemika)
- Trolox, (±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, 97%-tne čistiće (Aldrich)
- Tween 40 (Sigma)
- Ultračista voda (MiliQ $H_2O$)
- β-ciklodekstrin, β-CD (Wacker Chemie, Njemačka)
- β-karoten : Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material (Sigma Aldrich)
- γ-ciklodekstrin, γ-CD, 96%-tne čistoće (Fluorochem)

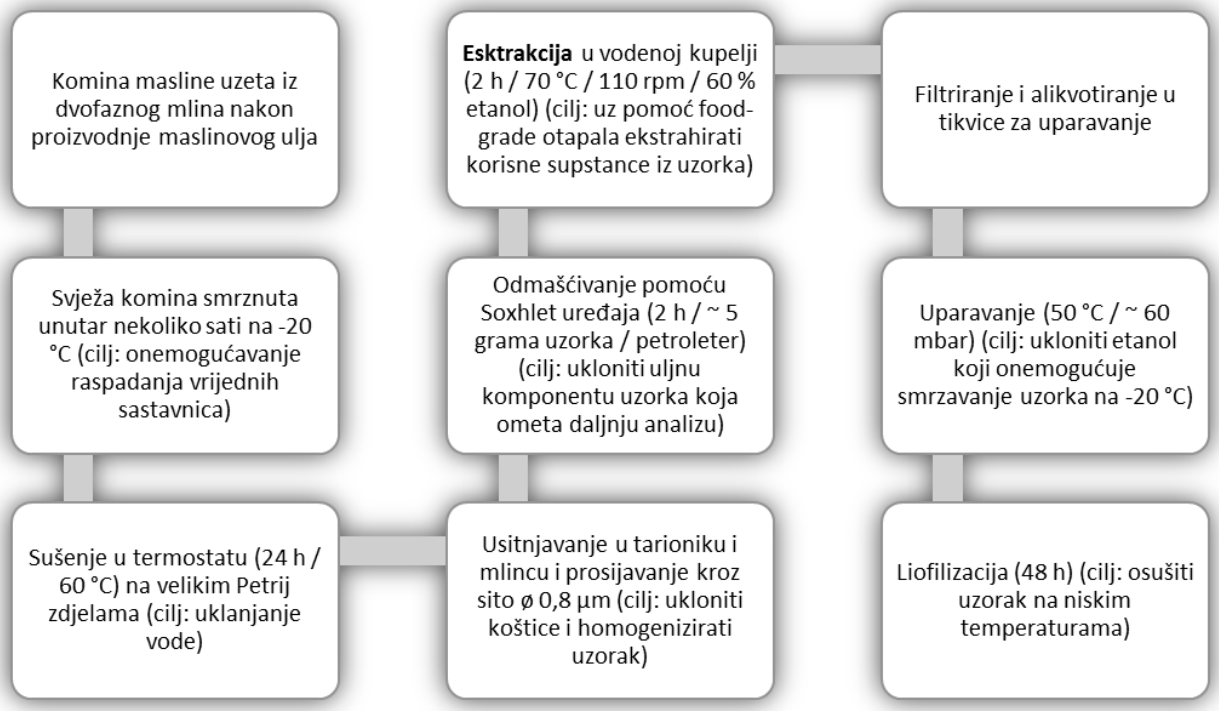
### 3.1.2. Instrumenti i oprema

- Analitička vaga, Metler Toledo AB265S
- Falcon epruvete, 50 mL
- Odmjerna tikvica, 100 mL
- Čitač mikrotitarskih pločica, Perkin Elmer, Multimode Plate Reader – Victor X3
- pH metar, Metrohm Swiss Made 702 SM Titrino Ex 20$^{o}$C 20 mL
- Polipropilenska ploča ravnog dna s 96 jažica kapaciteta 330 µL, Thermo Scientific 130188 BioLite 96 1/Sleeve
- Rotacijski uparivač, Buchi Rotavapor R-200
- Termostatirana kupelj s mućkalicom, tip 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Njemačka
- Tikvice okruglog dna
- Vortex miješalica, tip VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema uzoraka

Postupak pripreme gotovih uzoraka upotrebljenih za ispitivanje antioksidativne aktivnosti u β-karoten-linoleat emulzijskom sustavu prikazan je na Slici 4.




Slika 4. Shema pripreme ekstrakata komine masline.

Tablica 2. Izrada ekstrakata komine masline upotrebom različitih vrsta i količina ekscipijensa.

| Oznaka uzorka | Vrsta ciklodekstrina | Masena koncentracija komine / $gL^{-1}$ | Masena koncentracija ciklodekstrina / $gL^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| N | - | 20 | 0 |
| B | β | 20 | 8 |
| HPB | Hidroksipropil-β | 20 | 8 |
| HPB* | Hidroksipropil-β | 20 | 16 |
| RAMEB | Nasumično metilirani β | 20 | 8 |
| RAMEB* | Nasumično metilirani β | 20 | 16 |
| G | γ | 20 | 8 |
| G* | γ | 20 | 16 |

Tablica 3. Stock otopine uzoraka.

| Masena koncentracija ciklodekstrina / $gL^{-1}$ | Masena koncentracija suhog ekstrakta / $gL^{-1}$ |
|---|---|
| 0 | 50 |
| 8 | 90 |
| 16 | 130 |

## 3.2.2. Metoda izbjeljivanja β-karotena

### 3.2.2.1. Princip metode

Metoda se odvija u vodenoj emulziji linolne kiseline i β-karotena koja je dobar izbor jer je biološki relevantna. Zagrijavanjem reakcijskog medija na 50°C promovira se spontana oksidacija linolne kiseline u prisustvu kisika, tj. nastanak peroksilnih radikala linolne kiseline. Peroksilni radikali reagiraju s β-karotenom pri čemu dolazi do obezbojenja β-karotena koje se može pratiti spekrofotometrijski na 450 nm. S vremenom je obezbojenje β-karotena sve veće, kako se on sve više troši za gašenje peroksilnih radikala. Prisutnost nekog drugog jačeg antioksidansa može smanjiti obezbojenje β-karotena natječući se s njim za vezanje peroksilnih radikala.

### 3.2.2.2. Priprema Britton pufera, 100 mM, pH 6.5

Odvaže se 2,48 g borne kiseline te se kvantitativno prenese u tikvicu od 1000 mL,
zatim se dodaje 2,3 mL ledene octene kiseline i 2,73 mL fosfatne kiseline (w= 85%). U tako pripremljenu otopinu, otopinom NaOH, c=0,2 M, podešen je pH uz pomoć pH-metra.

### 3.2.2.3. Priprema reagensa (emulzije)

Čitavi postupak odvija se u tami jer je β-karoten fotoosjetljiv. β-karoten (4 mg), linolna kiselina (0,5 mL) i Tween 40 (4g) pomiješaju se s 20 mL kloroforma u tikvici okruglog dna, snažno miješajući suspenziju. Kloroform se upari na rotacijskom uparivaču na temperaturi nižoj od 50°C u kratkom vremenskom periodu kako bi se spriječila oksidacija lipida (40°/ ~15 min). U uljnu suspenziju se doda 10 mL Britton pufera u Milli-Q vodi prethodno zagrijanog na 45°C (Količina emulzije dovoljna za ispunjavanje 90 jažica mikroploče). Apsorbancija ove emulzije na 450 nm približno je 1.4.

### 3.2.2.4. Postupak

Postupak se odvija na polipropilenskoj ploči ravnog dna s 96 jažica kapaciteta 330 µL, a na uređaju čitaču mikrotitarskih pločica računalno se izradi protokol za mjerenje. Na njemu se odredi temperatura od 50°C (zagrijavanje na tu temperaturu promovira oksidaciju linolne kiseline) i postavi brzo mućkanje od 10 sekundi. Mjerenje apsorbancije odvija se simultano za sve ispunjene mikrotitarske pločice, a u svakoj pločici apsorbancija se mjeri 200 minuta u razmacima od 5 minuta, kako bismo dobili vrijednosti apsorbancije za $t_1=0$ i $t_{n+1}=t_n + 5$ min. Pločice se pune uzorcima navedenim u Tablici 2., to su nativni uzorci i uzorci kojima su dodani ciklodekstrini. U Tablici 4. jažice popunjene uzorcima označene su svijetlo plavom bojom. Svi uzorci razrjeđeni su Britton puferom 400 x. U jažice s uzorcima dodaje se 50 µL ispitivanog razrjeđenog uzorka i 250 µL pripremljenog reagensa (emulzije). U jažice onačene tamno plavom bojom umjesto uzorka se dodaje 50 µL referentnog antioksidansa, Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) i 250 µL emulzije. Trolox se dodaje u rastućoj koncentraciji izraženoj u mmol/L (0,125; 0,5; 0,1). U tablici je Trolox označen slovom *T* uz pripadajuće brojčane koncentracije. Rastući koncentracijski niz Troloxa služi za dobivanje kalibracijske krivulje. Jažice u kojima je uzorak zamijenjen puferom predstavljaju kontrolu i označene su slovima *CTR*. Vanjske jažice se ne analiziraju zbog mogućnosti isparavanja. Za svaki uzorak i svaku koncentraciju Troloxa popunjavaju se tri jažice (n=3), a za uzorak γ–ciklodekstrina (c=16 g/L) šest jažica (n=6).

Tablica 4. Shema ispunjavanja jažica mikroploče.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | N | N | N | B | B | B | HPB | HPB | HPB | HPB* | |
| C | | HPB* | HPB* | RAMEB | RAMEB | RAMEB | RAMEB* | RAMEB* | RAMEB* | G | G | |
| D | | G | G* | G* | G* | G* | G* | G* | T 0,125 | T0,125 | T0,125 | |
| E | | T0,25 | T0,25 | T0,25 | T0,1 | T0,1 | T0,1 | CTR | CTR | CTR | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

### 3.2.2.5. Mjerenje apsorbancije

Apsorbancija uzoraka u mikrotitarskim pločicama na 450 nm mjerena je na čitaču mikrotitarskih ploča (*uređaj Multimode Plate Reader – Victor X3)*. Uređaj omogućuje podešavanje temperature i miješanje uzoraka te je povezan s računalnim programom u kojem se izrađuje protokol za mjerenje. Vrijednosti apsorbancije uređaj mjeri svakih 5 minuta za svaku ispunjenu jažicu u vremenu od 200 minuta.

## 3.2.3. Statističke metode

Srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja izračunati su korištenjem programa *Microsoft Excel*. Razlike srednjih vrijednosti skupina ispitane su analizom varijance (ANOVA), čime je utvrđena značajna razlika između skupina ($p < 0.05$) te je značajnost međusobnih razlika pojedinih skupina analizirana višestrukim usporednim Tukey's testom (program *GraphPad*).

# 4. Rezultati i rasprava

## 4.1. Rezultati

Kao što je opisano u poglavlju *3. Materijali i metode,* obezbojenje β-karotena pratilo se promjenom apsorbancije na 450 nm kroz vrijeme od 200 min. Za kvatifikaciju rezultata odabran je nekinetički pristup jer se analizom rezultata apsorbancije u ovisnosti o vremenu u programu *Graph Pad* pokazalo da nema značajnih razlika u kinetici između različitih koncentracija Troloxa te između Troloxa i ispitivanih uzoraka. Nekinetički pristup uključivao je računanje parametra *R* (engl. response; odgovor).

Odgovor *R* prema formuli:

$$R = 1 - \frac{S_0}{S_t};$$

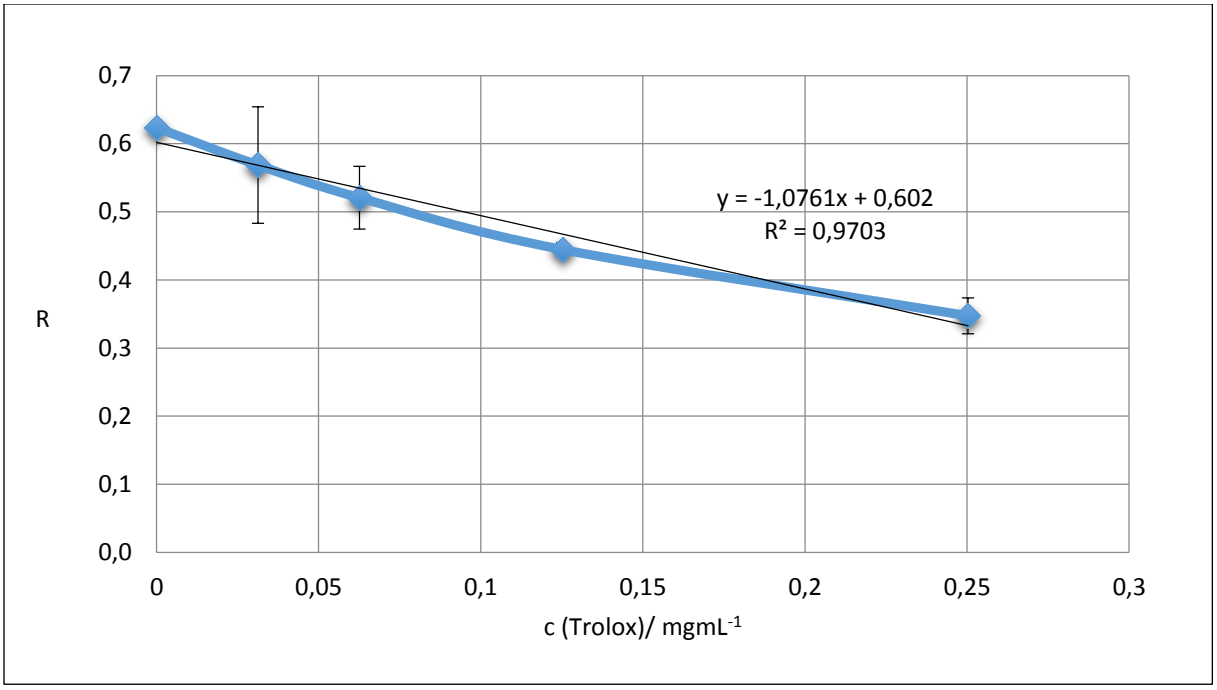
gdje su $S_o$ i $S_t$ apsorbancije u 0. tj. 120. minuti mjerenja.

Iz izmjerenih apsorbancija, dobiveno je da je apsorbancija uzoraka pala na 70% od početne vrijednosti oko 120. minute te je to vrijeme (t = 120 min) uzeto za kvantifikaciju antioksidativne aktivnosti parametrom *R*.

Iz baždarnog pravca ovisnosti *R* o koncentraciji Troloxa se izračunaju mg Trolox ekvivalenata za svaki uzorak. Potrebno je pronaći jednadžbu tog pravca kako bi se za R vrijednost svih pojedinih uzoraka mogli izračunati ekvivalenti Troloxa.

Tablica 5. Vrijednosti za izradu baždarnog pravca.

| **Vrijednosti za x-os** koncentracija Troloxa/mM *kontrola | R; odgovor | **Vrijednosti za y-os** Prosječna vrijednost | SD | RSD |
|---|---|---|---|---|
| 0* | 0,622 | 0,624 | 0,00 | 0,4 |
| 0* | 0,625 | | | |
| 0,125 | 0,629 | 0,569 | 0,09 | 15,1 |
| 0,125 | 0,508 | | | |
| 0,25 | 0,456 | 0,488 | 0,05 | 9,4 |
| 0,25 | 0,521 | | | |
| 0,5 | 0,452 | 0,445 | 0,01 | 2,4 |
| 0,5 | 0,437 | | | |
| 1 | 0,329 | 0,347 | 0,03 | 7,6 |
| 1 | 0,366 | | | |




Slika 5. Kalibracijska krivulja Troloxa dobivena iz ovisnosti R ( u 120. minuti) o koncentraciji Troloxa.

Iz kalibracijske krivulje oblika *y*=a*x*+b, tj. *x*=(y-b)/a (Slika 5.) izračunaju se ekvivalenti Troloxa (*TE*) za *R* vrijednosti svih pojedinih uzoraka prema formuli:

$$TE = -\frac{(R-b)}{a}\ ;\ ,$$

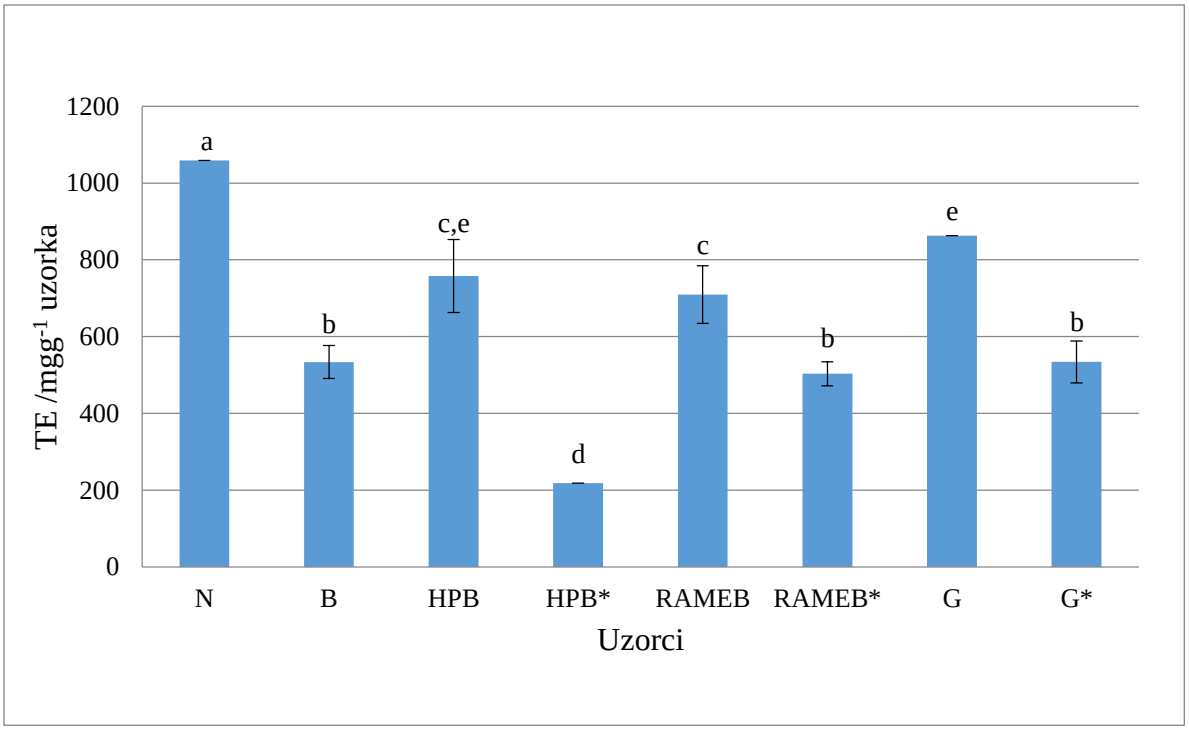
gdje su *TE* ekvivalenti Trolox-a, *R* odgovor, *a* nagib pravca i *b* odsječak na y-osi

Tablica 6. Antioksidativna aktivnost analiziranih suhih ekstrakata komine.

| **UZORAK** | **N** | **c/mgmL$^{-1}$** | **c razrijeđenja/ mgmL$^{-1}$** | **AVG TE/ mgg$^{-1}$ uzorka** | **SD** | **RSD/%** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N | 3 | 50 | 0,125 | 1059 | 0 | 0,0 |
| B | 3 | 90 | 0,225 | 534 | 43 | 8,0 |
| HPB | 3 | 90 | 0,225 | 758 | 95 | 12,5 |
| HPB* | 3 | 130 | 0,325 | 218 | 0 | 0,0 |
| RAMEB | 3 | 90 | 0,225 | 709 | 75 | 10,6 |
| RAMEB* | 3 | 130 | 0,325 | 503 | 31 | 6,2 |
| G | 3 | 90 | 0,225 | 863 | 0 | 0,0 |
| G* | 6 | 130 | 0,325 | 534 | 55 | 10,3 |

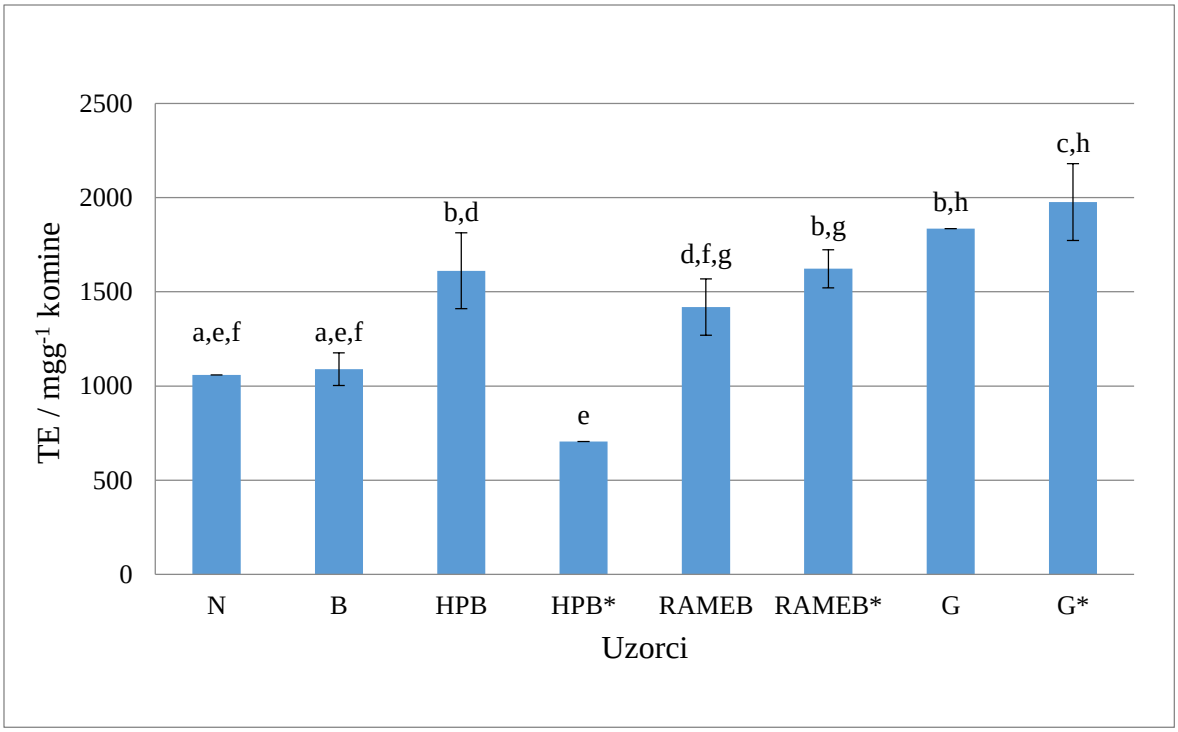
Tablica 7. Antioksidativna aktivnost analiziranih suhih ekstrakata komine korigirana s obzirom na udio ekscipijensa, odnosno komine u uzorku.

| **UZORAK** | **AVG TE/ $mgg^{-1}$ uzorka** | **udio komine u uzorku** | **AVG TE/ $mgg^{-1}$ komine u uzorku** | **SD** | **RSD/ %** |
|---|---|---|---|---|---|
| N | 1059 | 1 | 1059 | 0 | 0 |
| B | 534 | 0,49 | 1089 | 87 | 8,0 |
| HPB | 758 | 0,47 | 1612 | 202 | 12,5 |
| HPB* | 218 | 0,31 | 704 | 0 | 0,0 |
| RAMEB | 709 | 0,50 | 1419 | 150 | 10,6 |
| RAMEB* | 503 | 0,31 | 1623 | 101 | 6,2 |
| G | 863 | 0,47 | 1836 | 0 | 0,0 |
| G* | 534 | 0,27 | 1977 | 204 | 10,3 |




Slika 6. Antioksidativna aktivnost ekstrakata komine masline (srednja vrijednost ± standardna devijacija). Stupići s različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0.05$).

Legenda: N - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; B - uzorak komine pripremljen dodatkom β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; HPB* - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$; RAMEB - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; RAMEB* - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$; G - uzorak komine pripremljen dodatkom γ-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; G* - uzorak komine pripremljen dodatkom γ-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$.




Slika 7. Antioksidativna aktivnost ekstrakata komine masline (srednja vrijednost ± standardna devijacija) korigirana s obzirom na udio ekscipijensa u uzorku. Stupići s različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0.05$).

Legenda: N - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; B - uzorak komine pripremljen dodatkom β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; HPB* - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$; RAMEB - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; RAMEB* - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$; G - uzorak komine pripremljen dodatkom γ-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; G* - uzorak komine pripremljen dodatkom γ-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$.

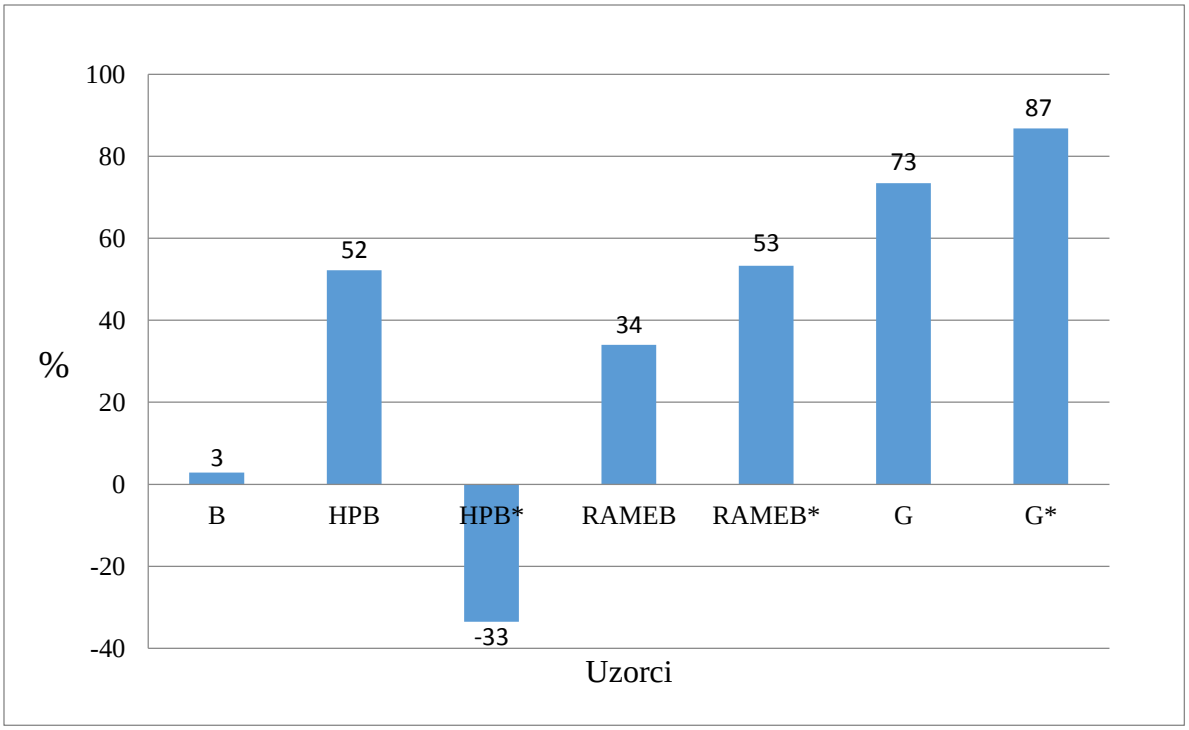
## 4.2. Rasprava

Metoda određivanja antioksidativne aktivnosti u emulzijskom sustavu β-karotena i linolne kiseline odabrana je prvenstveno zbog toga što model emulzije bolje reflektira uvjete u sustavima hrane i biološkim sustavima od jednostavnih kemijskih testova koji se najčešće provode u otopini. Naime, kako navode Shadidi i Zhong (15), mnogo masne hrane (kao što su umaci, sladoledi, mlijeko i slično) nalazi se upravo u obliku emulzije, a antioksidansi se, osim za očuvanje zdravlja ljudskog organizma, koriste i u prehrambenoj industriji kako bi produljili rok trajanja proizvoda. Linolna je kiselina, kao prirodan sastojak bioloških sustava, izvor peroksilnih radikala u ovoj metodi, a kako bi se potaknulo nastajanje tih radikala, reakcijski sustav se zagrijava na 50°C. Temperatura je ključan čimbenik početka reakcije te se u obzir moraju uzeti eventualne razlike temperature među jažicama. Temperaturna razlika u vanjskim jažicama može uzrokovati isparavanje otapala te se zbog toga te jažice ne analiziraju i u njih se dodaje samo voda. Time se izbjegava smanjenje reproducibilnosti metode.

Rezultati analize antioksidativne aktivnosti metodom izbjeljivanja β-karotena pokazali su kakva je učinkovitost ekstrakta komine u antioksidativnoj zaštiti β-karotena u emulzijskom sustavu linolne kiseline ta kakav je učinak različitih vrsta i koncentracija ciklodekstrina na učinkovitost ekstrakta komine kao antioksidansa. Ciklodekstrini (CD) su korišteni prilikom izrade suhih ekstrakata primarno u cilju poboljšanja tehnoloških svojstava prašaka. Naime prirodni ekstrakti vrlo često nakon sušenja ne pokazuju zadovoljavajuće tehnološke karakteristike: higroskopni su te su ljepljive i gumaste konzistencije, što otežava njihovu karakterizaciju i primjenu kao prehrambenih aditiva i nutraceutika (Sansone i sur., 2011). Osim toga, tijekom procesa ekstrakcije i sušenja može doći do razgradnje (termo)labilnih supstanci što u konačnici dovodi do smanjene biološke vrijednosti suhog ekstrakta. Kako bi se poboljšala tehnološka svojstva i biološka vrijednost suhih ekstrakata, procesi ekstrakcije i sušenja često se provode u prisutnosti farmaceutskih nosača kao što su ciklodekstrini. Prednosti njihove primjene u izradi suhih ekstrakata komine masline, a u smislu poboljšanja tehnoloških svojstava utvrđeni su ranije, u radu Albaharia i suradnika (2). Međutim nije poznat njihov utjecaj na antioksidativnu aktivnost dobivenih suhih ekstrakata.

Rezultati istraživanja iskazani po gramu ekstrakta na Slici 6. pokazali su da nativni uzorak, bez ciklodekstrina kao ekscipijensa, ima najveći antioksidativni učinak, dok je učinak uzoraka sa dodatkom ciklodekstrina značajno manji i to proporcionalno masenom udjelu ciklodekstrina u pojedinom ekstraktu. S obzirom na činjenicu da ciklodekstrini sami po sebi

ne posjeduju značajnu antioksidativnu aktivnost, ovakvi podaci su i očekivani; nativni uzorak zapravo je i najkoncentriraniji, dok svi ostali uzorci, zbog razrjeđenja, pokazuju nižu antioksidativnu aktivnost. Kako bismo procjenili postoji li značajniji učinak pripreme ekstrakta u prisutnosti ciklodekstrina na antioksidativnu aktivnost konačnog suhog produkta, potrebno je dobivene rezultate korigirati s obzirom na udio ciklodekstrina u uzorku (Slika 7.). Iz Slike 7. vidljivo je da, osim hidroksipropil-β-CD masene koncentracije 16 $gL^{-1}$, svi ciklodekstrini povećavaju antioksidativni učinak, a značajan učinak povećanja primijećen je padajućim nizom kod γ-CD (16 $gL^{-1}$), γ-CD (8 $gL^{-1}$), nasumično metiliranog β-CD (16 $gL^{-1}$) te hidroksipropil-β-CD (8 $gL^{-1}$). β-CD i nasumično metilirani β-CD (8 $gL^{-1}$) neznačajno povećavaju antioksidativni učinak komine. Negativan učinak hidroksipropil-β-CD (16 $gL^{-1}$) može se povezati s mogućim stvaranjem agregata nastalog kompleksa hidroksipropil-β-CD i polifenola komine pri većoj koncentraciji ciklodekstrina čime je polifenolima otežan pristup radikalima koji izbjeljuju β-karoten. Stvaranje agregata ciklodekstrina opisuju Jansook i suradnici (7).




Slika 8. Utjecaj ciklodekstrina na antioksidativnu aktivnost ekstrakata komine masline u odnosu na nativni ekstrakt (postotak povećanja).

Legenda: stupčasti grafikoni prikazuju postotak povećanja antioksidativne aktivnosti (mg TE u g komine) uzoraka s ciklodekstrinima u odnosu na nativni uzorak; N - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; B - uzorak komine pripremljen dodatkom β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; HPB* - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$; RAMEB - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; RAMEB* - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$; G - uzorak komine pripremljen dodatkom γ-CD koncentracije 8 $gL^{-1}$; G* - uzorak komine pripremljen dodatkom γ-CD koncentracije 16 $gL^{-1}$.

Na Slici 8. još je jednom vidljivo je da najveći doprinos povećanju antioksidativne aktivnosti ima γ-ciklodekstrin koncentracije 16 $gL^{-1}$, zatim γ-ciklodekstrin koncentracije 8 $gL^{-1}$, nasumično metilirani β-ciklodekstrin (16 $gL^{-1}$) te hidroksipropil-β-ciklodekstrin (8 $gL^{-1}$). Mercader-Ros i suradnici (10) navode da antioksidativna aktivnost dodatkom ciklodekstrina može porasti zbog zaštite antioksidansa od brze oksidacije slobodnim radikalima, te se može pretpostaviti da je i za antioksidanse u sastavu komine učinak ciklodekstrina bio sličan. Ciklodekstrini su sposobni ublažiti nepoželjna svojstva raznih spojeva formiranjem inkluzijskih kompleksa. Korištenje inkapsuliranih polifenola umjesto slobodnih, rješava probleme vezane uz njihovu stabilnost, prekriva neugodan okus ili miris te također povećava bioraspoloživost i poluživot sastavnica *in vitro* i *in vivo* (Fang i Bhandari, 2010). Literatura Spajić (16) koja je istraživala učinak dodatka istih vrsta i koncentracija ciklodekstrina kao i u

ovom radu na kominu masline, pokazala je da je uzorak s γ-ciklodekstrinom postigao najmanji antioksidativni učinak, a metil-β (16 $gL^{-1}$), hidroksipropil-β (16 $gL^{-1}$) i β-ciklodekstrin (8 $gL^{-1}$) najveći. U toj literaturi korištene su drukčije metode ispitivanja antioksidativne aktivnosti pa je to moguć razlog razlikama između rezultata. Potrebno je provesti dodatna istraživanja učinka ciklodekstrina na antioksidativnu aktivnost ekstrakata komine i standardizirati metodu izbjeljivanja β-karotena kako bi se postiglo usuglašavanje rezultata. Potrebu za standardizacijom ističe i rad Dawidowicz i Olszowy (3).

Iz ovog diplomskog rada proizlazi zaključak da γ-ciklodekstrin, nasumično metilirani β-ciklodekstrin i hidroksipropil-β-ciklodekstrin imaju najpovoljniji i značajan učinak na antioksidativnu aktivnost ekstrakta komine, dodajući prvenstvo odabira niže koncentracije (8 $gL^{-1}$) hidroksipropil-β-ciklodekstrina i to kako bi se izbjegao mogući nepovoljan efekt stvaranja agregata nastalih kompleksa te zbog ekonomičnosti pripreme ekstrakta.

# 5. ZAKLJUČCI

- Rezultati istraživanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata komine u β-karoten-linoleat emulzijskom model sustavu pokazali su da svi uzorci ostvaruju značajnu antioksidativnu aktivnost.
- Usporedbom dobivenih rezultata zaključeno je da vrsta ciklodekstrina korištenog u pripremi suhog ekstrakta značajno utječe na antioksidativnu aktivnost.
- Rezultati su pokazali da svi ciklodekstrini, osim hidroksipropil-β-ciklodekstrina masene koncentracije 16 $gL^{-1}$, povećavaju antioksidativni učinak te da njihov učinak, osim u slučaju hidroksipropil-β-ciklodekstrina, ne ovisi o koncentraciji ciklodekstrina u uzorku.
- Najveći antioksidativni učinak postigao je uzorak s γ-ciklodekstrinom, zatim s nasumično metiliranim β-ciklodekstrinom i hidroksipropil-β-ciklodekstrinom (8 $gL^{-1}$).
- Pozitivni učinci ciklodekstrina mogu se objasniti sposobnošću ciklodekstrina da s polifenolima stvaraju inkluzijske komplekse te ih na taj način štite od razgradnje tijekom procesa ekstrakcije/sušenja; nadalje prisutnost ciklodekstrina može utjecati na topljivost polifenola u različitim medijima te na taj način poboljšati učinkovitost inače hidrofilnih polifenola u unutarnjoj fazi/na granici faza U/V emulzijskog sustava.
- Negativan učinak više koncentracije hidroksipropil-β-ciklodekstrina, može se objasniti mogućim stvaranjem agregata nastalih kompleksa ciklodekstrina i polifenola komine čime je polifenolima otežan pristup radikalima koji izbjeljuju β-karoten

# 6. LITERATURA


1. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 2013, 21, 143–152.

2. Albaharia P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brnčić M, Rimac Brnčić S, Vitali Čepo D. Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT- Food Sci and Technol*, 2018, 92, 22-31.

3. Dawidowicz AL, Olszowy M. Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β-carotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. *Eur Food Res Technol*, 2010, 231:835-840.

4. Decker EA, Warner K, Richards MP, Shadidi F. Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 4303-4310.

5. Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols. *Trends Food Sci Technol*, 2010, 21, 510-523.

6. Goldsmith CD, Stathopolous CE, Golding JB, Roach PD. Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *Int Food Research J*, 2014, 21(1), 101-109.

7. Jansook P, Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins as solubilizers: Formation of complex aggregates. *J Pharm Sci*, 2010, 99 (2), 719-729.

8. Litescu SC, Eremia S, Radu GL. Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. *Bio-Farms for Nutraceutical*, 2010, 18, 241-249.

9. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 613, 1-19.

10. Mercader-Ros MT, Lucas-Abellan C, Fortea MI, Gabaldon JA, Nunez-Delicado E. Effect of HP-β-cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *J Agric Food Chem*, 2010, 118, 769-773.

11. Moon JK, Shibamoto T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J Agric Food Chem*, 2009, 57, 1655-1666.

12. Omar SH. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, *Sci Pharm*, 2010, 78, 133.

13. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*, 2011, 1:106.

14. Sansone F, Mencherini T, Picerno P, d'Amore M, Aquino RP, Lauro MR, Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *J Food Eng*, 2011, 105, 468–476.

15. Shadidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18(B), 757-781.

16. Spajić M. Utjecaj ciklodekstrina na antioksidacijsku učinkovitost ekstrakta komine masline, 2017., https://urn.nsk.hr, pristupljeno 22.2.2018.

17. Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res Int*, 2013, 251754.

18. Trgovčević M, Optimizacija kombiniranog postupka ultrazvučne ekstrakcije i enkapsulacije za ekstrakciju polifenola masline, 2016., https://repozitorij.pharma.unizg.hr, pristupljeno 22.2.2018.

19. Vitali Čepo D, Albahari P, Zovko Končić M, Radić K, Jurmanović S, Jug M. Solvent extraction and chromatographic determination of polyphenols in olive pomace. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 2017, 6(1), 7-14.

# 7. SAŽETAK

Komina masline otpad je koji zaostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja koji se zbog svoje ekotoksičnosti ne smije neprocesuiran odlagati u okoliš. Kemijski sastav komine masline karakterizira visok udio polifenola uz koje se vežu brojni pozitivni biološki učinci. Cilj ovog diplomskog rada bio je po prvi puta istražiti mogućnosti primjene ekstrakta komine masline kao antioksidansa u β-karoten-linoleat emulzijskom model sustavu jer taj model bolje reflektira uvjete u sustavima hrane i biološkim sustavima od jednostavnih kemijskih modela. Princip metode zasniva se na obezbojenju β-karotena peroksiksilnim radikalima linolne kiseline koje se prati spektrofotometrijski na 450 nm, a prisutnost antioksidanasa iz komine može smanjiti obezbojenje β-karotena kompeticijskim vezanjem peroksilnih radikala. Ispitana je antioksidativna aktivnost ekstrakata komine bez i s dodatkom različitih vrsta (β-CD, hidroksipropil-β-CD, nasumično metilirani β-CD i γ-CD) i koncentracija ciklodekstrina (8 i 16 $gL^{-1}$) te je kao referentni antioksidans odabran Trolox. Vrijednosti apsorbancije mjerene su svakih 5 minuta u vremenu od 200 minuta. Za kvantifikaciju rezultata odabran je parametar R (odgovor) te je za njegovo izračunavanje uzeto vrijeme od 120 min, tj. vrijeme kad je apsorbancija uzoraka pala na 70% početne vrijednosti. Iz baždarnog pravca ovisnosti R o koncentraciji Trolox-a izračunati su mg Trolox ekvivalenata (TE) za svaki uzorak. Svi uzorci komine ostvarili su značajnu antioksidativnu aktivnost. Zaključeno je da vrsta ciklodekstrina korištenog u pripremi suhog ekstrakta značajno utječe na antioksidativnu aktivnost. γ-ciklodekstrin, nasumično metilirani-β-ciklodekstrin i hidroksipropil-β-ciklodekstrin pokazali su najpovoljniji i značajan učinak na antioksidativnu aktivnost ekstrakta komine u β-karoten-linoleat sustavu.

KLJUČNE RIJEČI: komina masline, β-karoten-linoleat, antioksidativna aktivnost, ciklodekstrini

# 7. SUMMARY

Olive pomace is the waste generated from olive oil production and should not be left in unprocessed form during disposal due to its ecotoxicity. Chemical composition of olive pomace is characterised by high content of polyphenols that are linked with numerous positive biological effects. The goal of this paper was to examine the possibilities of using olive pomace extracts as antioxidants in β-carotene-linoleate emulsion model system for the first time. This model was chosen since it represents more realistically the conditions in food matrices and biological systems in comparison to simple chemical models. Method is based on β-carotene bleaching, caused by peroxyl radicals of linoleic acid, which is monitored spectrophotometrically at 450 nm. Presence of olive pomace antioxidants can reduce β-carotene bleaching by competitive quenching of peroxyl radicals. Antioxidant activity of pomace extracts formulated with or without different types (β-CD, hydroxypropyl-β-CD, randomly methylated β-CD and γ-CD) and different concentration (8 and 16 $gL^{-1}$) of cyclodextrins was examined, and Trolox was used as the referent antioxidant. Apsorbance was measured in 5 minutes intervals during the 200 min period. Parameter R (response) was chosen for quantification of results at 120 min, which is the time when apsorbance decreased to 70% of its initial value. Trolox equivalent (TE) values were calculated for each sample using the calibraton curve of TE concentration – response dependancy. All samples showed significant antioxidant activity. It is concluded that the type of cyclodextrin used in dry extract preparation has significant effect on antioxidant activity. γ-cyclodextrin, randomly methylated β-cyclodextrin and hydroxypropyl-β-cyclodextrin showed most favorable effect on antioxidant activity of pomace extract in β-carotene-linoleate system.

KEY WORDS: olive pomace, β-caroten-linoleate, antioxidant activity, cyclodextrins

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

# ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI KOMINE MASLINE METODOM IZBJELJIVANJA β-KAROTENA

**Rahela Krajnović**

## SAŽETAK

Komina masline otpad je koji zaostaje nakon proizvodnje maslinovog ulja koji se zbog svoje ekotoksičnosti ne smije neprocesuiran odlagati u okoliš. Kemijski sastav komine masline karakterizira visok udio polifenola uz koje se vežu brojni pozitivni biološki učinci. Cilj ovog diplomskog rada bio je po prvi puta istražiti mogućnosti primjene ekstrakta komine masline kao antioksidansa u β-karoten-linoleat emulzijskom model sustavu jer taj model bolje reflektira uvjete u sustavima hrane i biološkim sustavima od jednostavnih kemijskih modela. Princip metode zasniva se na obezbojenju β-karotena peroksiksilnim radikalima linolne kiseline koje se prati spektrofotometrijski na 450 nm, a prisutnost antioksidanasa iz komine može smanjiti obezbojenje β-karotena kompeticijskim vezanjem peroksilnih radikala. Ispitana je antioksidativna aktivnost ekstrakata komine bez i s dodatkom različitih vrsta (β-CD, hidroksipropil-β-CD, nasumično metilirani β-CD i γ-CD) i koncentracija ciklodekstrina (8 i 16 $gL^{-1}$) te je kao referentni antioksidans odabran Trolox. Vrijednosti apsorbancije mjerene su svakih 5 minuta u vremenu od 200 minuta. Za kvantifikaciju rezultata odabran je parametar R (odgovor) te je za njegovo izračunavanje uzeto vrijeme od 120 min, tj. vrijeme kad je apsorbancija uzoraka pala na 70% početne vrijednosti. Iz baždarnog pravca ovisnosti R o koncentraciji Trolox-a izračunati su mg Trolox ekvivalenata (TE) za svaki uzorak. Svi uzorci komine ostvarili su značajnu antioksidativnu aktivnost. Zaključeno je da vrsta ciklodekstrina korištenog u pripremi suhog ekstrakta značajno utječe na antioksidativnu aktivnost. γ-ciklodekstrin, nasumično metilirani-β-ciklodekstrin i hidroksipropil-β-ciklodekstrin pokazali su najpovoljniji i značajan učinak na antioksidativnu aktivnost ekstrakta komine u β-karoten-linoleat sustavu.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 8 grafičkih prikaza, 7 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, β-karoten-linoleat, antioksidativna aktivnost, 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. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of nutritional chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OLIVE POMACE BY THE β-CAROTENE BLEACHING METHOD

**Rahela Krajnović**

## SUMMARY

Olive pomace is the waste generated from olive oil production and should not be left in unprocessed form during disposal due to its ecotoxicity. Chemical composition of olive pomace is characterised by high content of polyphenols that are linked with numerous positive biological effects. The goal of this paper was to examine the possibilities of using olive pomace extracts as antioxidants in β-carotene-linoleate emulsion model system for the first time. This model was chosen since it represents more realistically the conditions in food matrices and biological systems in comparison to simple chemical models. Method is based on β-carotene bleaching, caused by peroxyl radicals of linoleic acid, which is monitored spectrophotometrically at 450 nm. Presence of olive pomace antioxidants can reduce β-carotene bleaching by competitive quenching of peroxyl radicals. Antioxidant activity of pomace extracts formulated with or without different types (β-CD, hydroxypropyl-β-CD, randomly methylated β-CD and γ-CD) and different concentration (8 and 16 $gL^{-1}$) of cyclodextrins was examined, and Trolox was used as the referent antioxidant. Apsorbance was measured in 5 minutes intervals during the 200 min period. Parameter R (response) was chosen for quantification of results at 120 min, which is the time when apsorbance decreased to 70% of its initial value. Trolox equivalent (TE) values were calculated for each sample using the calibraton curve of TE concentration – response dependancy. All samples showed significant antioxidant activity. It is concluded that the type of cyclodextrin used in dry extract preparation has significant effect on antioxidant activity. γ-cyclodextrin, randomly methylated β-cyclodextrin and hydroxypropyl-β-cyclodextrin showed most favorable effect on antioxidant activity of pomace extract in β-carotene-linoleate system.

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

Thesis includes: 45 pages, 8 figures, 7 tables and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, β-caroten-linoleate, antioxidant activity, 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
**Marija Grdić Rajković**, **Ph.D.** *Assistant Profesor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2018.